

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der I. Medizinischen Klinik
des Zentrums für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

T-Zell-Reaktionen bei Autoimmuner Hepatitis

Dissertation

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

vorgelegt von

Marcial Sebode
aus Northeim

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.12.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	PD Dr. J. Herkel
Prüfungsausschuss: zweite/r Gutachter/in:	Prof. Dr. A. Lohse
Prüfungsausschuss: dritte/r Gutachter/in:	Prof. Dr. B. Fleischer

Meinen Eltern für Ihre langjährige Unterstützung und Liebe

Inhaltsverzeichnis

I. Arbeitshypothese	1
II. Einleitung	2
1. Autoimmune Hepatitis	2
1.1 Geschichtlicher Hintergrund	2
1.2 Definition, Diagnostik und Therapie	2
1.3 Epidemiologie, Genetik und Assoziationen	3
1.4 Autoantikörper	4
1.5 Pathogenetische Aspekte	7
1.6 Tiermodelle	11
2. Primär sklerosierende Cholangitis, Primär biliäre Zirrrose und Overlap-Syndrome	13
3. Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	15
4. Regulatorische T-Zellen	20
5. Th17-Zellen	22
6. Vorarbeiten und Überblick über die Versuche dieser Arbeit	24
III. Material und Methoden	25
1. Material	25
1.1 Humanes Vollblut	25
1.2 Versuchstiere	26
1.3 Materialien für die Synthetisierung des humanen/ murinen SLA/LP-Proteins	26
1.4 Materialien für den Nachweis des SLA/LP-Proteins	27
1.5 Materialien für den murinen Transferversuch	27
1.6 Materialien für feingewebliche Untersuchungen	28
1.7 Materialien für Zellkulturen	28
1.8 Antigene und Mitogene	29
1.9 Antikörper, Liganden und Zytokine	29
1.10 Materialien für ELISA	30
1.11 Puffer, Gele und Medien	30
1.12 Chemikalien	32
1.13 Sonstiges	32

1.14	Geräte.....	33
1.15	Software.....	34
2.	Methoden.....	34
2.1	Synthetisierung des humanen/ murinen SLA/LP-Proteins.....	34
2.1.1	Transformation eines SLA/LP-Plasmids in einen kompetenten Bakterienstamm.....	34
2.1.2	Aufschluß des SLA/LP-Proteins.....	35
2.1.3	His-tag/Metallchelate-Chromatographie.....	36
2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	37
2.1.5	Dialyse.....	37
2.1.6	Nachweis des SLA/LP-Proteins.....	37
2.2	Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen zur Induktion einer Hepatitis im Mausmodell.....	40
2.2.1	Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen	40
2.2.2	Entnahme und Paraffin-Einbettung der murinen Lebern.....	42
2.2.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der murinen Lebern.....	43
2.2.4	Transaminasenmessungen.....	44
2.3	Analyse von SLA/LP-spezifischen Zelllinien.....	44
2.3.1	Zellisolation.....	44
2.3.2	Erythrozytenlyse mittels ACK-Puffer.....	45
2.3.3	Kultivierung der Zelllinien.....	46
2.3.4	Stimulation der Zelllinien.....	46
2.3.5	Einfrieren von Zellen.....	48
2.3.6	Auftauen von Zellen.....	48
2.3.7	Restimulationen der Zelllinien.....	49
2.3.8	Färbung von Oberflächen-Antigenen der Zelllinien.....	50
2.3.9	Intrazelluläre Zytokinfärbung der Zelllinien.....	51
2.3.10	Zellanalyse mittels FACS	51

2.4	FACS-Analyse von TLR-stimulierten Zellen.....	52
2.4.1	Stimulation, Kultivierung und Restimulation von TLR- stimulierten Zellen.....	52
2.5	FACS-Analyse von regulatorischen T-Zellen (T _{reg}).....	54
2.5.1	Färbung von Oberflächen-Antigenen von regulatorischen T-Zellen (T _{reg}).....	54
2.5.2	Intrazelluläre Färbung des ranskriptionsfaktors Foxp3.....	54
2.6	ELISA-Analyse von TLR-stimulierten Zellen.....	55
2.7	Statistische Auswertung.....	55
IV.	Ergebnisse.....	56
1.	Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymph- knotenzellen im Mausmodell.....	56
2.	Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	61
3.	Analyse von SLA/LP-spezifischen Zelllinien.....	63
4.	Analyse von peripheren regulatorischen T-Zellen.....	75
5.	Analyse von Zytokinen und T-Zellen nach TLR-Stimulation.....	81
V.	Diskussion.....	88
1.	Genetischer Hintergrund und Effektorzellen im Mausmodell.....	88
2.	SLA/LP-spezifische T-Zellen.....	89
3.	Regulatorische T-Zellen.....	91
4.	Zytokine und T-Zellen nach TLR-Stimulation.....	93
VI.	Zusammenfassung.....	96
VII.	Abkürzungsverzeichnis.....	97
VIII.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	99
IX.	Literaturverzeichnis.....	101
X.	Danksagungen.....	115
XI.	Lebenslauf.....	116
XII.	Eidesstattliche Erklärung.....	117

I. Arbeitshypothese

Die Autoimmune Hepatitis (AIH) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung der Leber, deren Ätiologie ungeklärt ist. Es gibt Hinweise dafür, dass T-Zellen an der Pathogenese der AIH beteiligt sind. In dieser Arbeit sollten T-Zell-Reaktionen für die AIH beschrieben werden und dazu wurde in mehreren Versuchen das Antigen „soluble liver antigen/liver pancreas antigen“ (SLA/LP) verwendet. Die gegen das SLA/LP-Protein gerichteten Autoantikörper lassen sich spezifisch bei AIH-Patienten nachweisen, sodass die Hypothese nahelegt, dass dieses Autoantigen bei grundlegenden immunologischen Abläufen der Erkrankung eine Rolle spielt.

Anhand von Transferversuchen von Abwehrzellen wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob sich durch SLA/LP-stimulierte Lymphknotenzellen eine Hepatitis im Mausmodell induzieren lässt. Der Einfluß des genetischen Hintergrundes der Mäuse auf die Entzündungsreaktion wurde dabei untersucht. Laborinterne Vorarbeiten im murinen Organismus hatten eine proinflammatorische, Th17-begünstigende Immunantwort gegenüber dem SLA/LP-Protein gezeigt. Nun sollten bei AIH-Patienten die T-Zell-Reaktionen gegen dieses Antigen analysiert und entzündliche Effektorantworten charakterisiert werden. Auch eine Kompromittierung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) schien als pathogenetischer Mechanismus der AIH möglich, sodass eine Quantifizierung der T_{reg} bei den Erkrankten durchgeführt wurde. Außerdem stellte sich die Frage, ob modulierende Einflüsse über Toll-like Rezeptoren (TLR) und ihre Liganden für die T-Zell-vermittelten Immunreaktionen der Autoimmunen Hepatitis von Relevanz sind.

II. Einleitung

1. Autoimmune Hepatitis

1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die Autoimmune Hepatitis wurde 1950 von Waldenström zum ersten Mal beschrieben. Sie wurde von der bereits in den 1940er Jahren klinisch bekannt gewordenen Chronisch Aktiven Hepatitis durch die neu registrierte Hypergammaglobulinämie abgegrenzt und vorrangig bei Frauen diagnostiziert. In diesen frühen Jahren nahm man eine virale Pathogenese dieser chronischen Entzündung der Leber an, ohne den Erreger identifizieren zu können. Einen Umbruch stellte die Veröffentlichung von Cowling et al. (1956) dar. Durch den Nachweis von Antinukleären Antikörpern (ANA) wurde der Grundstein für den autoimmunen Charakter dieser von da an genannten „Lupoiden Hepatitis“ gelegt. Die endgültige formale Bezeichnung „Autoimmune Hepatitis“ setzte sich erst in den Folgejahren durch und das Krankheitsbild wurde dann anhand klarer Diagnosekriterien definiert (Alvarez et al. 1999, Hennes et al. 2008). Die Ätiologie der AIH bleibt bis heute ungeklärt.

1.2 Definition, Diagnostik und Therapie

Die Autoimmune Hepatitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Leber mit typischen Charakteristika wie einer Erhöhung der Serum-Transaminasen, einer Hypergammaglobulinämie mit zumeist selektiver IgG-Vermehrung, einem lymphoplasmazellulären Infiltrat in der Leber, dem Auftreten von Autoantikörpern, der Assoziation mit den Leukozytenantigenen HLA- (Human Leukocyte Antigen = Humanes Leukozytenantigen) DR3 und HLA-DR4 und dem therapeutischen Ansprechen auf Glukokortikoide (Alvarez et al. 1999, Krawitt 2006).

Einige histologische Merkmale der AIH, die aber auch bei anderen chronischen Lebererkrankungen wie z.B. der viralen Hepatitis vorkommen, wurden bereits 1958 von Klatskin beschrieben. Diese umfassten brückenbildende Nekrosen, ballonierte, rosettenartig formierte Hepatozyten, Regeneratknoten und eine

mononukleäre Entzündungsreaktion. In den Folgejahren beschrieben andere Autoren weitere typische, aber dennoch nicht für die AIH spezifische feingewebliche Auffälligkeiten wie das Auftreten einer periportalen Grenzzonenhepatitis („Interface-Hepatitis“) mit einzelnen sogenannten „Mottenfraß-Nekrosen“ („piecemeal necrosis“) und portalen Plasmazellinfiltraten (Pratt et al. 1997, Krawitt 2006). Der Stimulus für die periportale Infiltration von Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen, die unter dem Begriff mononukleäre Abwehrzellen zusammengefasst werden, bleibt weiterhin unbekannt. Die feingewebliche Untersuchung der Leber ist ein essentieller Bestandteil der Diagnose der AIH und der sicherste Indikator für einen Therapieerfolg.

Bezüglich der Therapie der Autoimmunen Hepatitis haben sich Glukokortikoide und Azathioprin als Standardtherapie herausgebildet (Krawitt 2006). Nachdem eine Remission erreicht ist, kann diese oft nur durch jahrelange Immunsuppression erhalten werden (Kanzler et al. 2001). Unter optimaler Therapie weisen AIH-Patienten dann aber eine normale Lebenserwartung auf. Somit kommt der frühen Diagnosestellung eine besondere Bedeutung zu.

Die Autoimmune Hepatitis verläuft unbehandelt chronisch-progredient, häufig schubförmig und kann sich auch akut manifestieren (Krawitt 2006). Die fulminante Verlaufsform der AIH kann zum Leberversagen führen und eine Lebertransplantation erforderlich machen. Die AIH ist für circa 5% aller Lebertransplantationen verantwortlich (Adam et al. 2003).

1.3 Epidemiologie, Genetik und Assoziationen

Die AIH weist eine Prävalenz von circa 1:10.000 in der europäischen Bevölkerung auf (Werner et al. 2008). Sie kann bei Kindern und Erwachsenen jeglichen Alters auftreten (Krawitt 2006).

Eine grundlegende genetisch-determinierte Assoziation der AIH stellt das weibliche Geschlecht dar (Krawitt 2006), wobei dieses Phänomen typisch für viele Autoimmunerkrankungen ist (Whitacre 2001). Außerdem sind Träger der Leukozytenantigene HLA-DRB1*0301 (HLA-DR3) und HLA-DRB1*0401 (HLA-DR4) in Europa und Nordamerika für das Auftreten einer Autoimmunen Hepatitis suszeptibel (Donaldson 2002). Insbesondere eine Homozygotie der

Allele für HLA-DR3 geht häufiger mit einem schweren Krankheitsverlauf und dem verminderten Ansprechen auf eine Glukokortikoidtherapie einher (Czaja et al. 1997). Im internationalen Vergleich offenbart sich eine Diversität hinsichtlich diverser Subtypen der HLA-Moleküle, deren Bedeutung es für klinische Verläufe und pathogenetische Modelle zu klären gilt (Muratori et al. 2005, Teufel et al. 2006).

Allerdings ist ein bestimmter HLA-Typ für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung nicht ausreichend, da Menschen mit zu Autoimmunerkrankungen prädisponierenden HLA-Haplotypen meistens gesund sind (Theofilopoulos 1995). Vielmehr muss der HLA-Hintergrund als einer unter vielen genetischen Faktoren angesehen werden, die in ihrer Gesamtheit die Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen bedingen. Es sind einige Polymorphismen von Toleranz- und Autoimmunitätsgenen bekannt, die die immunologischen Reaktionen modulieren können und deren genaue biologische Funktion analysiert werden muss (Czaja 2008). Die sogenannte „second hit“-Hypothese besagt, dass zusätzlich zur genetischen Suszeptibilität das Hinzukommen von noch unbekannten Faktoren wie Umwelteinflüssen notwendig ist. Mögliche Umweltfaktoren könnten Infektionskrankheiten oder die Exposition gegenüber Toxinen sein (Benoist und Mathis 2001).

Desweiteren finden sich bei AIH-Patienten andere Erkrankungen mit autoimmunem Hintergrund häufiger als in der Normalbevölkerung. Beispiele hierfür sind die Hashimoto Thyreoditis, die Vitiligo, das Sjögren-Syndrom, der Diabetes mellitus Typ I und die Rheumatoide Arthritis (Teufel et al. 2009). Diese Assoziationen wurden jedoch nicht in großen Kohorten untersucht.

1.4 Autoantikörper

Anhand der laborchemisch bestimmten Autoantikörpermuster der Patienten werden zwei Typen der Autoimmunen Hepatitis unterschieden (Alvarez et al. 1999):

Der Typ 1 ist gekennzeichnet durch das Vorkommen von **ANA** (anti-nuclear antibodies = Antinukleäre Antikörper), **SMA** (smooth muscle antibodies = Antikörper gegen glatte Muskulatur) und/oder **SLA/LP**-Antikörper (soluble liver

antigen/liver pancreas antigen = lösliches Leberantigen/Leber-Pankreas-Antigen).

Der Typ 2 wird durch **LKM-1**-(liver kidney microsomes = Leber- und Nierenmikrosomen) Antikörper definiert.

Mit Ausnahme der Antikörper gegen SLA/LP sind alle anderen Antikörper für die AIH nicht spezifisch, da sie auch bei viralen und anderen autoimmunen Lebererkrankungen vorkommen (Lohse et al. 1995).

ANA kommen bei circa 70-80% der AIH-Patienten vor, sind aber nicht krankheitsspezifisch, da sie sich auch bei Erkrankungen wie z.B. dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) nachweisen lassen (Lohse et al. 1995).

SMA zeigen eine Reaktivität gegen das Zytoskelettprotein F-Aktin (Frenzel et al. 2006). Sie treten in circa 75% der Fälle mit ANA gemeinsam auf und sind bei Patienten mit viralen Hepatitiden nachweisbar (Czaja 2005).

LKM-1-Antikörper richten sich gegen ein Antigen, das im Endoplasmatischen Retikulum von Leberzellen und proximalen Tubuluszellen der Nieren angereichert ist (Rizzetto et al. 1973). Das Zielantigen wurde als eine „2D6“-Isoformvariante des Cytochrom-P-450-Systems (CYP450) identifiziert (Manns et al. 1991). Eine polyklonale Th1-Antwort konnte beschrieben werden, die sich gegen verschiedene Epitope des CYP450-2D6-Moleküls richtet (Löhr et al. 1991). Für diese Immunantwort wurde eine vermehrte Produktion des Zytokins Interferon- γ (IFN- γ) beschrieben und es bestand eine Korrelation zwischen der Anzahl der durch T-Zellen erkannten Epitope und dem Krankheitsgrad. LKM-1-Antikörper finden sich in ca. 1-3% der Fälle von AIH, konnten aber auch bei der Hepatitis C detektiert werden (Kerkar et al. 2003).

SLA/LP-Antikörper treten in ca. 20% der Fälle von AIH auf (Manns et al. 1987, Herkel et al. 2002). Es gibt regionale Unterschiede, beispielsweise ist für Japan eine Frequenz von lediglich 5% von SLA/LP-positiven Autoimmunen Hepatitiden beschrieben worden (Nishioka 1998). Die SLA/LP-Antikörper sind

im Gegensatz zu den anderen Autoantikörpern für die Autoimmune Hepatitis spezifisch (Baeres et al. 2002).

Die Antikörper gegen SLA wurden von Manns et al. (1987) und die Antikörper gegen LP von Stechemesser et al. (1993) beschrieben. Diese Autoantikörper richten sich gegen ein lösliches Antigen aus dem Zytoplasma von Leber- oder Pankreasgewebe, das später als identisches Protein nachgewiesen wurde (Wies et al. 2000). Die entsprechenden Antikörper wurden fortan unter dem Namen SLA/LP-Antikörper zusammengefasst.

Es wurde vorgeschlagen, dass Patienten, die positiv für SLA/LP-Antikörper sind, einem dritten Typ der Autoimmunen Hepatitis zugeordnet werden (Strassburg und Manns 2002). Aufgrund eines mit der AIH vom Typ 1 vergleichbaren klinischen Verlaufs wurde aber davon abgesehen (Kanzler et al. 2001, Baeres 2002). Außerdem zeigten Teufel et al. (2006) einen ähnlichen HLA-Hintergrund bei Patienten einer AIH vom Typ 1 und einer SLA/LP-positiven AIH.

Das Zielprotein der SLA/LP-Antikörper wird in der Nomenklatur als „SEPSECS“ definiert (siehe unten) und ist 422 Aminosäuren lang. Die Aminosäuren 371-409 wurden als der entscheidende Abschnitt für die B-Zell-Antwort ausgemacht (Wies et al. 2000). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Autoantigen in zwei unterschiedlichen Spleißvarianten vorliegt. Diese wurden entsprechend ihrer Herkunft als J-D.1 (aus einer Jurkat-Lymphomzelllinie) und als L-D.1 (aus einer humanen Leberzelllinie) bezeichnet.

Das SLA/LP-Protein ist hochkonserviert und nicht speziesspezifisch. Es ließen sich in verschiedenen Spezies hohe Sequenzhomologien nachweisen (Wang et al. 2006) und die Expression ist nicht auf das Lebergewebe beschränkt, sondern das SLA/LP-Protein kommt u.a. auch im Pankreas, in der Lunge, in den Nieren und in aktivierten Lymphozyten vor (Stechemesser et al. 1993, Wies et al. 2000). Die biologische Funktion des SLA/LP-Proteins liegt in der Selenoproteinbiosynthese. Es wurde gezeigt, dass das SLA/LP als Selenocysteinyl-tRNA-Synthase fungiert, was sich auch in der Nomenklatur des entsprechenden Gens niederschlägt, die das SLA/LP als „SEPSECS“ bezeichnet (Yuan et al. 2006). „SEP“ bezeichnet ein Phosphoseryl-tRNA-Vorläufermolekül, „SEC“ meint Selenocysteinyl-tRNA als Produkt der enzymatischen Aktivität und „S“ die Enzymform Synthase. Inwieweit ein

nutritiver Mangel an Selen und dessen Stoffwechsel einen Einfluß auf SLA/LP als Autoantigen hat, bleibt noch endgültig zu klären (Herkel et al. 2007).

Bemerkenswert ist weiterhin, dass die SLA/LP-Antikörper vorrangig dem Immunglobulin-Subtyp IgG1 angehören und das gleiche Epitop am Carboxyterminus des SLA/LP-Proteins erkennen (Herkel et al. 2002). Es bestehen Sequenzhomologien zwischen diesem Epitop und Peptidsequenzen von mikrobiellen Erregern wie z.B. dem Humanen Herpes Virus 6 (HHV-6), die bisher als nicht für die AIH ätiologisch relevant angesehen wurden (Herkel et al. 2002). Hinsichtlich der Pathogenese der AIH ist aber neben einer humoralen Immunantwort gegen SLA/LP auch eine Analyse zellulärer Mechanismen wichtig. Mix et al. beschrieben im Jahr 2008 zwei HLA-DR3-restringierte Epitope des SLA/LP-Moleküls, die von CD4+ T-Zellen erkannt werden. Eines dieser Epitope überschneidet sich mit der oben beschriebenen, von SLA/LP-Antikörpern erkannten Sequenz am Carboxy-Terminus und stellt somit eine Verknüpfung von B- und T-Zell-Antwort her. Dieses Phänomen ist schon bei anderen Autoimmunerkrankungen beobachtet worden (Reijonen et al. 2004).

1.5 Pathogenetische Aspekte

Über die pathogenetischen Mechanismen der Autoimmunen Hepatitis ist derzeit wenig bekannt. Grundsätzlich muss geklärt werden, welche Mechanismen zum Zusammenbruch der Toleranz in der Leber führen und wie sich die bei der AIH ablaufenden Entzündungsreaktionen charakterisieren lassen. Welche leberspezifischen Antigene werden durch das Immunsystem im Rahmen der AIH erkannt? Welche Effektorantworten verursachen den hepatozellulären Schaden? Was sind die Bestandteile des entzündlichen Zytokinmilieus, die die Immunantwort aktivieren und formen? Inwieweit sind die Toleranz-vermittelnden Bestandteile des Immunsystem an der Pathogenese der AIH beteiligt und warum können sie die Entzündungsreaktion nicht einschränken? Ein weiterer allgemeiner Aspekt muss hinsichtlich der Pathogenese der AIH bedacht werden: Inwieweit können homologe Pathomechanismen für eine Erkrankung wahrscheinlich sein, die sich durch eine derart klinische und serologische Heterogenität auszeichnet wie die AIH?

Autoimmune Mechanismen

Ein Phänomen, das hinsichtlich der Ätiologie der AIH diskutiert wird, ist die Kreuzreaktivität, die v.a. für den Typ 2 der AIH untersucht worden ist. Unter Kreuzreaktivität versteht man die Bindung eines Antikörpers an zwei unterschiedliche Antigene, die aber über identische oder sehr ähnliche Epitope verfügen. Die LKM-1-Antikörper richten sich gegen das CYP2D6-Molekül, erkennen aber auch homologe Epitope des Hepatitis-C-Virus und des Cytomegalievirus (Kerker et al. 2003). Diese Ergebnisse gehen mit der Hypothese von Aichele et al. (1996) konform, dass genetisch susceptible Individuen nach der Exposition gegenüber einem oft unbekannten Erreger und vermittelt durch eine resultierende Kreuzreaktivität, eine Autoimmunerkrankung entwickeln können. Für die SLA/LP-Antikörper konnte bisher keine relevante Kreuzreaktivität belegt werden (Herkel et al. 2002).

Auch eine gestörte Apoptose muss als Pathomechanismus überprüft werden. Die CD4-positiven CD25-negativen T-Zellen als potentielle Effektorzellen der AIH weisen eine verminderte Apoptoserate auf (Longhi et al. 2006). Es konnte bereits gezeigt werden, dass autoreaktive, apoptose-resistente T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis auftreten und eine Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2-Moleküls (B-cell lymphoma 2) in CD4+ T-Zellen aufweisen (Schirmer et al. 1998).

Autoantigene

Da die Autoimmune Hepatitis eine organspezifische Autoimmunerkrankung ist, liegt die Suche nach einem leberspezifischen Antigen als Auslöser für die aberrante Immunantwort nahe. Der chronische Verlauf der AIH lässt weiterhin vermuten, dass die für die Pathogenese relevanten Antigene auch relativ konstant in der Leber präsentiert werden.

Der Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) galt zu Beginn der Forschungsarbeiten über die AIH als vielversprechendes leberspezifisches Autoantigen, da sich bei AIH-Patienten CD8+ T-Zell-Klone nachweisen ließen, die für diesen Rezeptor spezifisch waren (Wen et al. 1990). Es zeigte sich aber, dass auch bei der autoimmunen Lebererkrankung Primär Biliäre Zirrhose (PBC) eine T-Zell-vermittelte Antwort gegenüber dem löslichen ASGPR

besteht und somit konnte dem ASGPR keine krankheitsspezifische Rolle für die AIH zugesprochen werden (Löhr et al. 1990).

Der Problematik, die für die AIH spezifischen Autoantigene zu identifizieren, kann sich dadurch genähert werden, indem man die Effektor-T-Zellen isoliert, die diese Autoantigene erkennen. Allerdings ist die Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut wie bei anderen Autoimmunerkrankungen sehr gering (Reijonen et al. 2004). Autoreaktive T-Zellen sind wahrscheinlich stärker im Entzündungsgewebe vertreten, könnten aber durch Leberbiopsien in geringer Anzahl isoliert werden. Für weitere Analysen müssten sie expandiert oder kloniert werden, was wiederum einen verfälschenden Einfluß auf quantitative und qualitative Funktionsanalysen dieser Zellen hätte (Löhr et al. 1996).

Effektormechanismen

Da die oben genannten HLA-Moleküle die Suszeptibilität für die Autoimmune Hepatitis erhöhen, ist eine Beteiligung von CD4⁺ T-Helferzellen an der Ätiologie der AIH anzunehmen. Dies hat folgenden Hintergrund:

Die Bindung eines Epitopes erfolgt bei B-Zellen und Antikörpern direkt und in der nativen Form des Antigens, bei T-Zellen muss zunächst eine Prozessierung und Präsentation des Antigens über membranständige HLA- bzw. MHC- (Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitätskomplex) Moleküle erfolgen. Typische MHC Klasse II tragende Zellen sind Dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen. Man unterscheidet zum einen MHC Klasse I Moleküle mit den Hauptgenen HLA-A, HLA-B und HLA-C, die Antigene den T-Zell-Rezeptoren von CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Zum anderen interagieren MHC Klasse II Moleküle mit den T-Zell-Rezeptoren von CD4⁺ T-Zellen. Die Hauptgene der MHC II Moleküle sind HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR. Auf die Bindung eines Antigens folgt die klonale Selektion und Expansion der rezeptortragenden Zelle. Daraus hervorgehende antigenspezifische Gedächtnis- (memory-) Zellen persistieren im menschlichen Organismus für lange Zeit und bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses.

Eine Modellvorstellung der AIH geht davon aus, dass ein potentielles, leberspezifisches Autoantigen naiven T-Zellen durch MHC II Moleküle präsentiert wird. Abhängig vom Zytokinmilieu der zellulären Umgebung wird dann eine Signalkaskade ausgelöst, die eine Aktivierung und Differenzierung

von T-Zellen in verschiedene Richtungen begünstigt bzw. verhindert und schließlich zum Untergang von Hepatozyten führt (Longhi et al. 2009).

Es gibt unterschiedliche Ergebnisse darüber, welcher CD4⁺ T-Zelltyp bei der AIH vorherrschend ist: eine Arbeit beschreibt die Tumornekrosefaktor- α - (TNF- α) und IFN- γ -sezernierenden Th1-Zellen als dominierend (Löhr et al. 1996), eine andere Arbeitsgruppe hingegen isolierte vor allem Interleukin-4- (IL-4) exprimierende Th2-Zellen (Schlaak et al. 1993). Insbesondere in den akuten Krankheitsphasen der AIH scheinen die CD8⁺ T-Zellen als eine weitere Effektorzellart von Bedeutung zu sein (Suzuki et al. 2004). Longhi et al. (2006) beschrieben außerdem eine proliferative Überempfindlichkeit und verstärkte IFN- γ -Expression von CD8⁺ T-Zellen, v.a. in den Zeiten der höchsten Krankheitsaktivität.

Das Zytokin IFN- γ erfüllt in vielen Tiermodellen zu hepatischen Entzündungen eine wichtige Effektorfunktion: als ein in der Leber exprimiertes Transgen (Toyonaga et al. 1994) oder bei der Hepatitis B (Ohta et al. 2000) verursacht es einen entzündlichen Leberzellschaden. Ein weiteres relevantes pro-inflammatorisches Zytokin für die Leber ist TNF- α (Ohta et al. 2000), das vermehrt von hepatischen Kupffer-Zellen gebildet wird (Gantner et al. 1996).

Regulatorische T-Zellen

Es gibt Hinweise dafür, dass nicht nur proinflammatorische Zellen an der Pathogenese der AIH beteiligt sind, sondern dass auch eine Dysregulation von antiinflammatorischen, regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) an der Störung der Immunhomöostase vorliegen könnte.

Das Zytokin Transforming growth factor beta (TGF- β) fördert die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und ist ein für T_{reg}s charakteristisches Effektorzytokin (Shevach 2009). Longhi et al. (2006) zeigten eine verminderte Sekretion von TGF- β durch T_{reg}s bei AIH-Patienten. Eine genaue Analyse der T_{reg}s wurde von Longhi et al. (2005 und 2006) hinsichtlich ihrer Anzahl und ihrer Suppressorfunktion durchgeführt. AIH-Patienten zeigten eine signifikant geringere Frequenz von T_{reg}s im peripheren Blut im Vergleich zu Gesunden, sowohl in Zeiten der Diagnosestellung mit hohem Aktivitätsgrad der Erkrankung als auch zu Zeiten der Remission (Longhi et al. 2004). Die reduzierte Funktionalität der regulatorischen T-Zellen wurde anhand der T_{reg}-vermittelten

Proliferationshemmung und verminderten Zytokinproduktion der CD4⁺ und CD8⁺ Effektorzellen gezeigt. Longhi et al. (2006) konnten außerdem herausarbeiten, dass die suppressive Funktion von T_{reg}S bei AIH-Patienten eher auf Zell-Zell-Kontakten beruht als dass sie zytokinvermittelt ist.

1.6 Tiermodelle

Ein Grund, warum die Erforschung der Ätiologie der AIH erschwert wird, ist das Fehlen eines die verschiedenen Aspekte der Pathogenese umfassenden Tiermodells. Dies gilt insbesondere für die AIH vom Typ 1. Ein Mausmodell sollte grundlegende Charakteristika der AIH erfüllen wie z.B. eine genetische Suszeptibilität, das typische histologische Bild der hepatischen Entzündungsreaktion oder das Auftreten von Autoantikörpern.

Frühe Modelle einer Experimentellen Autoimmunen Hepatitis (EAH) beruhten auf der Immunisierung von Mäusen mit allogenem Leberantigen, das aus Leberhomogenat hergestellt und mit dem Immunpotentiator CFA (complete Freund's adjuvant = komplettes Freund'sches Adjuvans) kombiniert wurde (Scheiffarth et al. 1967). In dieser Zeit gelang bereits der adoptive Zelltransfer der Erkrankung, was die zelluläre Beteiligung an den Pathomechanismen der AIH belegte.

In den Folgejahren etablierte sich ein Protokoll zur Induktion einer EAH mit Hilfe des Überstandes des Leberhomogenates (S100), das durch Ultrazentrifugation hergestellt wurde (Mori et al. 1985). Das lösliche Leberprotein SLA/LP ist in der S100-Fraktion vertreten (Manns et al. 1987). Lohse et al. (1990) wandelten dieses Protokoll ab und konnten durch einmalige intraperitoneale (i.p.) Injektion von S100 in Verbindung mit CFA eine EAH auslösen. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass der genetische Hintergrund der Mäuse für eine EAH-Induktion von Bedeutung ist, wobei der Mausstamm C57BL/6 besonders suszeptibel für eine EAH war (Lohse et al. 1990). In diesem Mausmodell zeigten sich histologische Veränderungen der Leber, die von einer Erhöhung der Serumtransaminasen - insbesondere der GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) - begleitet wurden. Der höchste Aktivitätsgrad der Hepatitis anhand dieser beiden Parameter war nach 4 bis 5 Wochen

zu registrieren. Erst im weiteren Verlauf traten auch Autoantikörper auf (Lohse 1991).

Buxbaum et al. (2008) entwickelten ein transgenes Mausmodell, in dem Ovalbumin auf Hepatozyten exprimiert und in diesen Mäusen durch den adoptiven Transfer von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen eine Entzündung der Leber induziert werden konnte. Diese Form der Hepatitis war abhängig von transferierten CD8⁺ T-Zellen und konnte durch CD4⁺ T-Zellen nur verstärkt, aber nicht allein ausgelöst werden. Ein chronischer Verlauf konnte nur durch wiederholte Zelltransfers in Abständen von 14 Tagen erreicht werden.

Derkow et al. (2007) stellten sich in ihrer Arbeit die Frage, in welchem lymphatischen Organ die Effektorzellen aktiviert werden: eine intrahepatische Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen erschien wahrscheinlicher als eine Aktivierung in den drainierenden Lymphknoten der Leber oder in der Milz. Auch diese Arbeitsgruppe detektierte CD8⁺ T-Zellen als Effektorzellen der Hepatitis.

Kido et al. (2008) entwickelten ein neues, vielversprechendes Mausmodell durch neonatale Thymektomie, die die Anzahl der regulatorischen T-Zellen drastisch reduzierte, von Programmed cell Death 1 (PD-1) Knockout-Tieren. In diesem Modell konnte eine starke Hepatitis hervorgerufen werden. Der Signaltransduktion von PD-1 wird eine Kontrollfunktion gegenüber autoreaktiven T-Zellen zugesprochen (Keir et al. 2006). Das Modell von Kido et al. (2008) zeigt typische Charakteristika der AIH wie ein mononukleäres Zellinfiltrat in der Leber und die Bildung von antinukleären Autoantikörpern.

Holdener et al. (2008) konnten die Toleranz der Leber bei Mäusen durchbrechen, indem sie diese mit einem hepatotropen Adenovirus infizierten, das humanes Cytochrom P450 2D6 exprimiert und induzierten damit ein dem Typ 2 der AIH ähnliches Krankheitsbild.

Das Mausmodell von Gorham et al. (2001) kombiniert den genetischen Hintergrund einer BALB/c-Maus mit dem Knockout von TGF- β , was in einer durch IFN- γ -Expression gekennzeichneten Th1-Antwort resultiert, die eine spontane Hepatitis auslöst. Damit erfasst dieses Modell mehrere Aspekte der AIH: die genetische Suszeptibilität und die spontane Entwicklung einer Hepatitis ohne weitere experimentelle Manipulationen oder Transfers von Immunzellen.

2. Primär sklerosierende Cholangitis, Primär biliäre Zirrhose und Overlap-Syndrome

Die Lebererkrankungen Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) und Primär Biliäre Zirrhose (PBC) wurden in dieser Arbeit als Vergleichsgruppen für die Ergebnisse der Versuche zur AIH herangezogen und sollen im Folgenden erläutert werden. Die Autoimmune Hepatitis kann sich auch in Form von Überlappungssyndromen mit Teilcharakteristika der PBC oder der PSC präsentieren. Auch auf diese sogenannten Overlap-Syndrome soll kurz eingegangen werden.

Primär sklerosierende Cholangitis

Die Primär Sklerosierenden Cholangitis (PSC) ist eine chronisch-progressive, cholestatische Lebererkrankung, bei der es zu einer entzündlichen Sklerose und Obliteration der intra- und extrahepatischen Gallengänge kommt (Lee und Kaplan 1995). Die segmentalen Fibrosierungen um die Gallengänge eignen sich als diagnostisches Charakteristikum. Letztendlich führen diese pathologischen Veränderungen der PSC zur Leberzirrhose.

Die Ätiologie der PSC ist ungeklärt. Es überwiegen die Hinweise, die einen autoimmunen Hintergrund der Erkrankung unwahrscheinlich machen. Im Gegensatz zur AIH und PBC (siehe unten) weisen Männer eine höhere Inzidenz der PSC als Frauen auf (Bambha et al. 2003). Antikörper, die sich gegen cytoplasmatische Antigene von Neutrophilen Granulozyten richten und eine perinukleäre Fluoreszenz aufweisen (p-ANCA), sind am ehesten mit der PSC assoziiert (Lee und Kaplan 1995). Diese pANCAs sind jedoch nur bei einem Teil der PSC-Patienten vorhanden. Eine Immunsuppression durch Glukokortikoide hat keinen therapeutischen Effekt und es besteht keine Assoziation der PSC mit klassischen autoimmunen Erkrankungen. Bemerkenswert ist eine Assoziation mit den Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen, vorrangig der Colitis ulcerosa, die bei ca. 75% bis 90% der PSC-Patienten im Verlauf nachgewiesen werden kann (Bambha et al. 2003). Die PSC und die PBC (siehe unten) werden mit Ursodeoxycholsäure (UDC) behandelt, wodurch sich zumeist das cholestatische Bild bessert (Lindor et al.

2009, Corpechot et al. 2005). Ob dies zu einer Prognoseverbesserung führt, bleibt umstritten (Goulis et al. 1999).

Die immunologisch-vermittelte Schädigung der Gallenwege scheint essentiell für die PSC zu sein, mögliche Antigene konnten allerdings noch nicht detektiert werden. In einer Veröffentlichung konnten Antikörper gegen biliäre Epithelzellen festgestellt werden, die u.a. zu einer Induktion der Toll-like Rezeptoren (TLR; siehe unten) TLR4 und TLR9 auf den Epithelien geführt haben (Karrar et al. 2007). Nach der Stimulation dieser Rezeptoren mit ihren jeweiligen Liganden resultierte hieraus eine erhöhte Ausschüttung diverser Zytokine wie z.B. IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , die eine proinflammatorische Immunantwort formen könnten.

Primär biliäre Zirrhose

Die Primär Biliäre Zirrhose (PBC) ist definiert als eine chronische, nicht eitrige, destruierende Cholangitis, bei der sich die Entzündung primär gegen kleine und mittelgroße intralobuläre Gallengänge der Leber richtet. Im Verlauf führt die Erkrankung zur Cholestase und hat eine Leberzirrhose als Endstadium zur Folge (Kaplan und Gershwin 2005).

Labordiagnostisch relevant ist der Nachweis von Antimitochondrialen Antikörpern (AMA) und eine Erhöhung des Serum-IgM. Die Antimitochondrialen Antikörper sind charakteristisch für die PBC (Kaplan und Gershwin 2005) und richten sich gegen die E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (van de Water et al. 1989, Shigematsu et al. 2000). AMAs finden sich in bis zu 95% der Fälle von PBC-Patienten (Kaplan und Gershwin 2005). Wie bei vielen Autoimmunerkrankungen ist es unwahrscheinlich, dass die Autoantikörper direkt an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind, weil kein offensichtlicher Unterschied zwischen dem Krankheitsverlauf von AMA-positiven und AMA-negativen PBC-Patienten besteht (Invernizzi et al. 1997).

Die Ätiologie der Primär Biliären Zirrhose ist unbekannt. Folgende Merkmale legen den Verdacht auf eine autoimmune Genese der PBC nahe: Hinsichtlich der genetischen Suszeptibilität findet sich die Erkrankung circa zehnmal häufiger beim weiblichen Geschlecht als beim männlichen (Kaplan und Gershwin 2005). Desweiteren ist die PBC mit anderen autoimmunen Erkrankungen assoziiert, wie z.B. dem Sjögren-Syndrom (Tsianos et al. 1990).

Es konnten bei der PBC autoreaktive T-Zellen detektiert werden, die sich in den zellulären Infiltraten um die intrahepatischen Gallengänge konzentrieren (Migliaccio et al. 2001) und die E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes erkennen (Kita et al. 2002a). Insbesondere epitopspezifische CD8⁺ T-Zellen wurden als Effektorzellen identifiziert (Kita et al. 2002b). Monozyten von PBC-Erkrankten sind susceptibler gegenüber TLR-Liganden als gesunde Kontrollen (Mao et al. 2005), wobei beispielsweise die Signalwege von TLR3 (Shimoda et al. 2008) und TLR4 (Wang et al. 2005) an der Pathogenese der PBC beteiligt zu sein scheinen. Eine Diskrepanz von Th17 und T_{reg}-Zellen konnte bei PBC-Patienten beobachtet werden: bei PBC-Patienten ist die Th17-Antwort verstärkt aktiv und die T_{reg}-Population kompromittiert. IL-23 scheint dabei eine besonders förderliche Rolle für die proinflammatorischen Th17-Zellen einzunehmen (Rong et al. 2009).

Overlap-Syndrome

Die Autoimmune Hepatitis kann auch in Form von Overlap-Syndromen mit den oben beschriebenen Lebererkrankungen PSC (Gohlke et al. 1996) oder PBC (Lohse et al. 1999) auftreten. Bei einem Overlap-Syndrom präsentieren sich die Patienten mit Symptomen und Diagnosekriterien, die sich nicht allein einer Erkrankung wie AIH, PBC oder PSC zuschreiben lassen. Somit basiert die Diagnose eines Overlap-Syndroms auf dem simultanen oder konsekutiven Auftreten von cholestatischen und hepatitischen Pathologien und wird beschrieben als das häufigere PBC/AIH- oder das PSC/AIH-Overlap-Syndrom (Invernizzi und Mackay 2008). Es bleibt ungeklärt, ob die Overlap-Syndrome eigenständige Krankheitsbilder darstellen oder gar zwei der genannten Lebererkrankungen gleichzeitig auftreten, kausal aber unabhängig voneinander bestehen.

3. Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Sowohl die Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems exprimieren sogenannte „Pattern Recognition Receptors“ (PRR). Diese Rezeptoren erfüllen eine Wächterfunktion, um die ersten Zeichen einer mikrobiellen Infektion zu detektieren und primäre Abwehrmechanismen

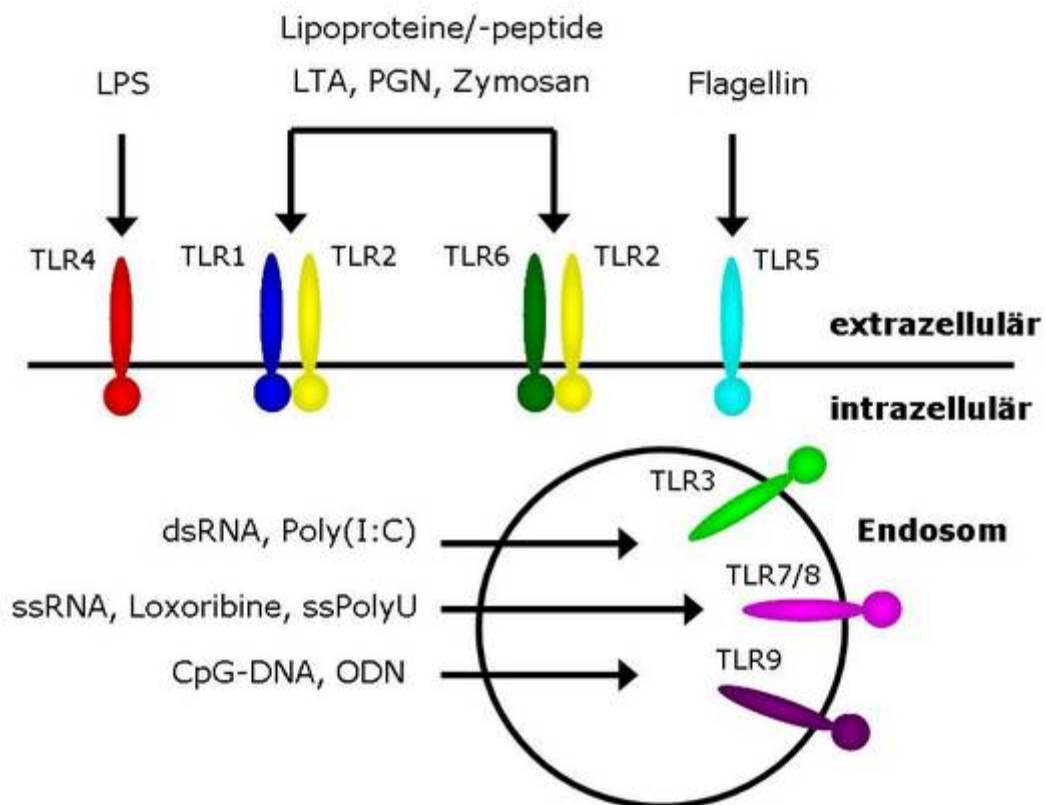
einzuweisen. Sie erkennen konservierte molekulare Strukturen von Erregern, die als Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) beschrieben wurden (Medzhitov und Janeway 1998). PAMPs sind z.B. bakterielle Zellwandbestandteile. Zu den bedeutendsten Pattern Recognition Rezeptoren gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR). Nach der Bindung eines Liganden an einen Toll-like Rezeptor verläuft die weitere Signaltransduktion für die meisten TLR über das intrazelluläre Signalmolekül Myeloid Differentiation factor 88 (MyD88) (Medzhitov et al. 1998). Die intrazelluläre Signalkaskade der TLR mündet in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor- κ B), der wichtige Komponenten der angeborenen und erworbenen Immunität reguliert (Kawai und Akira 2007). Derart nehmen TLR großen Einfluß auf die Expression der antiviralen Typ-I-Interferone (IFN- α und IFN- β) und der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-12 (Zhang et al. 2007). Außerdem regulieren Toll-like Rezeptoren die Expression von Oberflächenmolekülen mit kostimulatorischer oder inhibitorischer Funktion wie MHC Klasse II Moleküle, CD40, CD80 und CD86 oder CTLA-4 und PD-1 (Simone et al. 2009). Somit können T-Zellen durch die TLR-vermittelten Zytokinmuster hinsichtlich ihrer Differenzierungsmöglichkeiten beeinflusst werden oder die Intensität von T-Zell-Antworten kann durch die TLR-bedingte Expression kostimulatorischer Moleküle kontrolliert werden (Liew et al. 2004).

Die Toll-like Rezeptoren werden auf Makrophagen und ihren im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen, den Monozyten, auf B-Zellen und Dendritischen Zellen, aber auch auf epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert (Takeda et al. 2003). Die Verteilung der TLR auf den Abwehrzellen ist unterschiedlich, beispielsweise findet sich TLR1 ubiquitär, TLR3 hingegen ausschließlich auf Dendritischen Zellen (Muzio et al. 2000).

Es sind bis heute zehn funktionelle Toll-like Rezeptoren im humanen (TLR1 bis TLR10) und elf funktionelle TLR im murinen Organismus (TLR1 bis TLR7, TLR9, TLR11 bis TLR13) beschrieben worden (Zhang et al. 2007). Eine Subfamilie von TLRs bestehend aus TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 ist in den meisten Zellen intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum, in Lysosomen oder in Endosomen lokalisiert (Blasius und Beutler 2010). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten TLR-Liganden und die dazugehörigen

Rezeptoren kurz erläutert. Einen Überblick über die humanen TLR und ihre Liganden liefert die Grafik 1.1:

Grafik 1.1 Übersicht der TLR und ihrer Liganden



LPS = Lipopolysaccharid
LTA = Lipoteichonsäure
PGN = Peptidoglycan
dsRNA = doppelsträngige Ribonukleinsäure
Poly(I:C) = Polyinosin-Polycytosin-Säure
ssRNA = einzelsträngige Ribonukleinsäure
ssPolyU = Uridinreiche RNA
CpG = Cytosin-Phosphatbindung-Guanin-Motive
ODN = Oligodinukleotide

TLR1, TLR2 und TLR6

Der TLR2 heterodimerisiert mit TLR1 oder mit TLR6, wodurch diese Toll-like Rezeptoren eine große Diversität von Strukturen erkennen können (Ozinsky et al. 2000). Das Spektrum reicht von Gram-positiven bis zu Gram-negativen Bakterien. Beispiele hierfür sind die erkannten Lipoproteine von Mycobakterium

tuberculosis (Takeuchi et al. 2000), Peptidoglycane (Schwandner et al. 1999), aber auch Bestandteile von Hefen wie Zymosan (Underhill et al. 1999).

TLR3

Der TLR3 bindet doppelsträngige Ribonukleinsäuren (dsRNA = double-stranded Ribonucleic Acid) (Alexopoulou et al. 2001), die für Viren charakteristisch sind. Ein synthetisches Struktur analogon ist die Polyinosin-Polycytosin-Säure (poly(I:C)). Es wurden sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige Signalwege für die Aktivierung von NF- κ B belegt (Alexopoulou et al. 2001).

TLR4

Der Toll-like Rezeptor 4 dient unter anderem der Erkennung des LPS-Endotoxins aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. Makrophagen und Dendritische Zellen sind typische TLR4-exprimierende Zellen (Medzhitov et al. 1997).

TLR5

Das Protein Flagellin ist die Hauptkomponente der bakteriellen Flagellen, die zur Fortbewegung der Erreger dienen. Flagellin ist zudem der Ligand von TLR5 (Hayashi et al. 2001), der sich v.a. auf intestinalen Epithelien und Monozyten nachweisen lässt (Cario und Podolsky 2000).

TLR7 und TLR8

Der TLR7 erkennt einzelsträngige Guanosin- und/oder uridinreiche (PolyU) RNA oder ssRNA (single-stranded Ribonucleic Acid = einzelsträngige Ribonukleinsäure) (Heil et al. 2004). Einzelsträngige RNA wird auch von TLR8 erkannt, der auf Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten exprimiert wird. Die Ligandenbindung von TLR8 führt zu einem anderen Zytokinprofil als die von TLR7 (Gorden et al. 2005). Ein synthetischer Ligand von TLR7 ist das Guanosin analogon Loxoribin.

TLR9

Unmethylierte, bakterielle Desoxyribonukleinsäuren (DNA; Deoxyribonucleic Acid) mit Cytosin-Phosphatbindung-Guanin-(CpG-)Motiven werden vom TLR9 gebunden (Hemmi et al. 2000). Auch virale DNA ist ein Ligand von TLR9 (Lund et al. 2003). Die Ligandenbindung an TLR9 vermittelt im Mausmodell die Zytokinproduktion von Makrophagen und reguliert die Expression von Oberflächenmolekülen auf Dendritischen Zellen und somit deren Hilfe für die T-Zell-Entwicklung (Hemmi et al. 2000). Synthetische Liganden von TLR9 sind Oligodinukleotide (CpG-ODN).

NOD2

Neben den TLR gibt es weitere Pattern Recognition Rezeptoren wie z.B die Moleküle NOD1 und NOD2 (Nucleotid-binding Oligomerization Domain), die im Zytosol lokalisiert sind (Franchi et al. 2009). Der in dieser Arbeit verwendete NOD2-Ligand ist das zytosolische Peptidoglykan-Fragment MDP (Muramylidipeptid).

Es gibt Hinweise dafür, dass TLR und ihre Liganden für Autoimmunerkrankungen eine pathogenetische Rolle spielen. In Mausmodellen der systemischen Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) konnte eine Verbindung zwischen der Gendosis von Toll-like Rezeptoren und dem Auftreten von Autoimmunität hergestellt werden. Durch eine verstärkte Genexpression des TLR7-Gens wurden B-Zellen für die Liganden dieses Rezeptors sensibler (Pisitkun et al. 2006) und eine systemische lupoide Autoimmunreaktion konnte in suszeptiblen Mausstämmen induziert werden (Deane et al. 2007).

Da T-Zellen einen wichtigen Bestandteil der Effektorantwort bei Autoimmunerkrankungen darstellen, muss auch überprüft werden, inwieweit eine Ligandenbindung von TLR auf die Differenzierungswege von T-Zellen Einfluß nehmen kann. Beispielsweise konnte die Signaltransduktion von TLR3 und TLR7 in Mausmodellen die Frequenz von autoreaktiven CD8+ T-Zellen massiv erhöhen und durch die Expression von IFN- α auf den Krankheitsausbruch und den Verlauf eines Modells zum autoimmunen Diabetes mellitus Einfluß nehmen (Devendra et al. 2005, Lang et al. 2005).

Weiterhin regulieren einige TLR die Differenzierung von proinflammatorischen, mit diversen Autoimmunerkrankungen assoziierten Th17-Zellen (siehe unten). Eine Arbeitsgruppe konnte eine IL-17-Sekretion von T-Zellen durch die Zugabe von Kulturmedium bewirken, das zuvor durch eine TLR-Stimulation von PBMCs konditioniert worden war (Kattah et al. 2008).

Die Autoimmune Hepatitis ist im Gegensatz zum SLE eine organspezifische Autoimmunerkrankung. Deshalb muss eine mögliche aberrante TLR-Signaltransduktion als Pathomechanismus lokal in der Leber untersucht werden. In einem Lymphozytären-Choriomeningitisvirus- (LCMV-) vermittelten Mausmodell einer Hepatitis konnte gezeigt werden, dass allein die Präsenz spezifischer autoreaktiver CD8⁺ T-Zellen lokal nicht ausreicht, um einen Leberschaden hervorzurufen. Erst durch die hinzukommende Aktivierung bestimmter TLR-Signalkaskaden und der dadurch hervorgerufenen Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine kam es zu einer verstärkten Infiltration der Leber und einer Leberzelldestruktion (Lang et al. 2005).

4. Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

In den 1990er Jahren wurden von Sakaguchi et al. die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) als zelluläre Vertreter einer körpereigenen Immunsuppression zur Erhaltung von Toleranz definiert (Sakaguchi et al. 1995). Der Begriff „Regulatorische T-Zellen“ umfasst mehrere Subpopulationen von Zellen, z.B. die Tr1 Zellen (Groux et al. 1997) und die Th3 Zellen (Weiner 2001). In den letzten Jahren hat sich die Forschung über regulatorische T-Zellen auf die Foxp3-positiven T_{reg} konzentriert, die auch Bestandteil dieser Arbeit sind und für die der allgemeine Begriff „T_{reg}“ verwendet wird. Es werden natürliche, im Thymus gereifte T_{reg}S (nT_{reg}) und in der Peripherie aus naiven T-Zellen induzierte T_{reg}S (iT_{reg}) unterschieden (Bluestone und Abbas 2003).

Regulatorische T-Zellen wurden zunächst anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 in Mäusen beschrieben (Sakaguchi et al. 1985). In den folgenden Jahren zeigte sich, dass nur die Zellen, die die stärkste Expression von CD25 aufweisen (CD25^{high}), eine suppressive Aktivität besitzen (Baecher-Allan et al. 2001). Die Problematik, T_{reg}S anhand von CD25 zu identifizieren,

liegt darin, dass das CD25 Molekül die α -Kette des IL-2-Rezeptors darstellt und CD25 auch von aktivierten T-Effektor-Zellen exprimiert wird (Chung et al. 2004). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead box P3) gilt derzeit als ein relativ spezifischer zellulärer Marker von T_{reg}S (Fontenot et al. 2003). Foxp3 gehört zu der Familie der Forkhead/winged-helix-Familie von Transkriptionsfaktoren und ist ein Regulator der Entwicklung und Funktionalität von T_{reg}S (Hori et al. 2003). Im Gegensatz zu Mäusen sind beim Menschen T-Zell-Rezeptor-aktivierte Effektorzellen beschrieben worden, die transient Foxp3 exprimieren, ohne dabei eine Suppressorfunktion zu erfüllen (Walker et al. 2003, Gavin et al. 2006). Die Einordnung dieser Zellpopulation in das Immunsystem bedarf weiterer Arbeit. Die Relativierung von Foxp3 als T_{reg}-spezifischen Zellmarker beim Menschen hat zu epigenetischen Untersuchungen geführt, und es wurde das Methylierungsprofil des Foxp3-Promoters als Indikator vorgeschlagen, um T_{reg}S besser von aktivierten, transient Foxp3-exprimierenden T-Zellen abzugrenzen (Baron et al. 2007, Janson et al. 2008). Der vollständig demethylierte Status des Promotors korreliert mit einer stabilen Foxp3-Expression und einer suppressiven Funktionalität der T_{reg}S beim Menschen. Bei humanen T-Zellen korreliert die Foxp3-Expression invers mit der von CD127, sodass Foxp3-positive T-Zellen nur in geringem Maße das CD127-Molekül exprimieren (CD127^{low}) bzw. CD127-negativ sind (Liu et al. 2006). Liu et al. (2006) definierten weiterführend die Kombination aus CD4, CD25 und CD127^{low} als sehr spezifische Kombination von Oberflächenmarkern für T_{reg}S. Ein weiterer zellulärer Marker für T_{reg}S ist das Oberflächenmolekül CD39. Es ist ein Ektoenzym, das das beim Zelluntergang aus dem Zellinneren freigesetzte Adenosintriphosphat (ATP) inaktiviert (Ia Sala et al. 2001, Hanley et al. 2004). Extrazelluläres ATP könnte ein chemotaktischer Mechanismus für CD39-positive T_{reg}S sein und sie zur Einwanderung ins entzündliche Gewebe bewegen, um dort immunregulatorischen Einfluss auf das lokale Zytokinmilieu und den Zellverband zu nehmen. Als klinisches Beispiel führen Borsellino et al. (2007) Beobachtungen bei der schubförmig-remittierenden Form der Multiplen Sklerose an. Erkrankte dieser entzündlichen Erkrankung des Zentralen Nervensystems mit möglichem autoimmunem Hintergrund zeigen eine reduzierte Frequenz dieser CD39-positiven T_{reg}S im peripheren Blut.

Eine Beteiligung von T_{reg}S konnte für die Limitierung pathologischer Immunreaktionen wie Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen belegt werden (Sakaguchi et al. 2001). Obwohl viele bedeutende Ergebnisse bezüglich der Rolle von T_{reg}S für Autoimmunität aus Mausmodellen gewonnen wurden, gibt es in jüngeren Forschungsarbeiten vermehrt Hinweise für eine Beteiligung regulatorischer T-Zellen an humanen Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis (Ehrenstein et al. 2004). Auf zellulärer Ebene stellen T_{reg}S Toleranz her, indem sie z.B. die Proliferation und Zytokinproduktion von autoreaktiven T-Zellen unterdrücken oder immun-modulatorisch auf Antigen-präsentierende Zellen einwirken (Sakaguchi 2004, Tadokoro et al. 2006).

5. Th17-Zellen

Die Th17-Zellen sind durch die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-17 charakterisiert (Harrington et al. 2005, Park et al. 2005). Ein weiterer Zellmarker der Th17-Population ist der Transkriptionsfaktor ROR γ t (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor gamma t) (Ivanov et al. 2006).

Das Zytokin IL-17 umfasst eine Familie von sechs Isotypen, die als IL-17A bis IL-17F bezeichnet werden (Aggarwal und Gurney 2002). T-Zellen exprimieren nur IL-17A, IL-17F oder das heterodimere IL-17A/F, denen die größte pro-inflammatorische Bedeutung zukommt und die wahrscheinlich redundante Funktionen ausüben (Kuestner et al. 2007, Wright et al. 2007). Die Bindung von IL-17 an seinen Rezeptor auf lokalen Gewebszellen und Immunzellen wie T-Zellen oder Makrophagen vermittelt die Induktion entzündlicher Zytokine wie IL-6 oder TNF- α (Moseley et al. 2003). Zusätzlich zu den ursprünglich beschriebenen IL-17+CD4+ T-Zellen sind u.a. auch CD8+ T-Zellen zur Expression von IL-17 fähig (Shin et al. 1999, Happel et al. 2003, He et al. 2006). Die Signaltransduktion von IL-17 ist an vielen immunologischen Prozessen wie bei der Abwehr bakterieller Keime, bei Transplantabstoßungen, bei chronischen Entzündungen und bei autoimmunen Erkrankungen beteiligt (Ye et al. 2001, van Kooten et al. 1998, Linden 2001, Dardalhon et al. 2008). In Bezug auf Autoimmunerkrankungen wurden Th17-Zellen zunächst anhand von Mausmodellen beschrieben, wie z.B. bei der Experimentellen Autoimmunen

Enzephalomyelitis (EAE) (Komiyama et al. 2006). Nachdem Th17-Zellen immer häufiger mit autoimmunen Erkrankungen assoziiert worden waren, hinterfragte man eine Th1-Antwort als vorherrschenden Effektorweg. Anstatt dessen favorisierte man z.B. für die Multiple Sklerose oder die Rheumatoide Arthritis eine treibende Rolle der Th17-Antwort (Cua et al. 2003, Chabaud et al. 1998). Es gibt Unterschiede zwischen dem humanen und dem murinen Organismus hinsichtlich des Zytokinmilieus, das für die optimale Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen zur Th17-Population notwendig ist. Diverse Veröffentlichungen stimmen darin überein, dass im murinen Organismus Th17-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen durch die Gegenwart von IL-6 und TGF- β induziert und durch die Zytokine IL-21 und IL-23 amplifiziert und stabilisiert werden (Bettelli et al. 2006, Mangan et al. 2006). IL-21 wirkt autokrin auf Th17-Zellen, d.h. aktivierte Th17-Zellen sezernieren dieses Zytokin, um die Th17-Differenzierung zu begünstigen (Nurieva et al. 2007). IL-22 ist ein weiteres, von murinen Th17-Zellen exprimiertes, proinflammatorisches Zytokin (Liang et al. 2006). Für IL-23 vermutet man, dass es durch die Bindung an seinen Rezeptor die Th17-Zellpopulation stabilisiert und expandiert, jedoch nicht induziert (Langrish et al. 2005, Bettelli et al. 2006).

Im menschlichen Organismus sind die Zytokine IL-1 β und IL-6 an der Differenzierung der Th17-Zellen beteiligt, wobei IL-1 β für die IL-17-Sekretion essentiell zu sein scheint (Acosta-Rodriguez et al. 2007, Wilson et al. 2007). Die genaue Bedeutung von IL-23 für die Differenzierung, das Überleben und die Funktion von humanen Th17-Zellen wird kontrovers diskutiert (Wilson et al. 2007, Volpe et al. 2008, Bettelli et al. 2006). Auch die Relevanz von TGF- β für die Differenzierung humaner Th17-Zellen ist umstritten. Es liegen Berichte vor, nach denen TGF- β die Differenzierung humaner Th17-Zellen hemmt (Evans et al. 2007) und somit im Widerspruch zu den murinen Verhältnissen steht.

In Bezug auf die AIH stellt sich die Frage, ob in der Leber Th17-begünstigende Verhältnisse vorliegen und Th17-Zellen krankheitsauslösend sind. In C57BL/6 Mäusen haben CD4⁺ T-Zellen aus der Leber die Fähigkeit zur Produktion größerer Mengen von IL-17 (Lan et al. 2009). Bei AIH-Patienten konnte eine verstärkte IL-17-Expression in den Lebern beobachtet werden (Lan et al. 2009). Hierbei ist die wichtigste Frage, ob Th17-Zellen eine kausale Rolle für die AIH

spielen oder ob die Präsenz von Th17-Zellen in der Leber nur eine resultierende Begleiterscheinung der lokalen Entzündung ist.

6. Vorarbeiten und Überblick über die Versuche dieser Arbeit

Aus laborinternen, unveröffentlichten Voruntersuchungen ist bekannt, dass IL-10-/- Mäuse des Stammes C57BL/6 suszeptibel hinsichtlich einer Immunreaktion gegenüber SLA/LP sind und nach Immunisierung mit dem SLA/LP-Protein eine Hepatitis entwickeln. Diese Immunantwort war proinflammatorisch und begünstigte eine Th17-Differenzierung, da Lymphknotenzellen von IL10-/- Mäusen im Vergleich zu Wildtypen nach Autoimmunisierung mit SLA/LP signifikant mehr IL-6 und IL-17 produzierten. Im murinen Organismus ist IL-6 in Kombination mit TGF- β ein typisches Th17-induzierendes Zytokin (Bettelli et al. 2006). Es ist demnach möglich, dass eine Th17-Antwort gegen SLA/LP eine pathogenetisch relevante Rolle für die Autoimmune Hepatitis spielt. Ferner gilt es festzuhalten, dass ein suszeptibler genetischer Hintergrund eine verstärkte Bildung Th17-induzierender Faktoren, wie zum Beispiel IL-6 im murinen Organismus, bewirken kann.

Diese Arbeit umfasst vier Versuchsansätze, die auf den Ergebnissen dieser Voruntersuchungen aufbauen und sich mit den folgenden pathomechanistischen Aspekten der AIH auseinandersetzen:

1. Es sollte in einem Mausmodell überprüft werden, ob durch den Transfer von SLA/LP-stimulierten Abwehrzellen in naive Mäuse eine hepatische Entzündungsreaktion induziert werden kann. Außerdem wurde untersucht, ob der genetische Hintergrund der Mäuse die Suszeptibilität für die Leberentzündung eher auf der Ebene der Auslösung der Immunantwort oder eher auf der Ebene der Effektorfunktion bedingt. Hierfür wurde der genetische Hintergrund von IL-10 -/- Mäusen mit Wildtyp-Mäusen verglichen.

2. Es wurden die Effektormechanismen von humanen T-Zellen gegenüber dem SLA/LP-Protein charakterisiert. Dabei wurde überprüft, ob sich T-Zell-Linien aus dem peripheren Blut von AIH-Patienten generieren lassen, die ein

inflammatorisches Profil und insbesondere eine Th17-Antwort gegenüber SLA/LP zeigen. Diese Immunantwort von AIH-Patienten gegenüber dem SLA/LP-Molekül wurde mit der von gesunden Probanden und der von Patienten mit anderen autoimmunen Lebererkrankungen verglichen.

3. Liegt ein Grund für die Entzündung der Leber bei AIH-Patienten in der mangelnden Kontrolle einer inflammatorischen Immunreaktion durch regulatorischen T-Zellen (T_{reg})? Die Quantifizierung von T_{reg} s aus dem peripheren Blut von AIH-Patienten und der Vergleich mit den genannten Kollektiven sollte Aufschluss darüber geben. In diesem Versuchsansatz sollten zusätzlich verschiedene Zellmarker der regulatorischen T-Zellen analysiert werden, um diese Zellpopulation spezifisch isolieren und identifizieren zu können. Auch der Einfluß einer immunsuppressiven Therapie der AIH-Patienten auf die T_{reg} -Frequenz sollte verifiziert werden.

4. In einem weiteren Versuchsansatz wurde überprüft, ob periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells) von AIH-Patienten gegenüber den Liganden von Toll-like Rezeptoren suszeptibler sind als die genannten Vergleichsgruppen und somit diese Liganden die inflammatorischen Vorgänge bei der AIH modulieren. Dies sollte anhand des Ausmaßes der Sekretion ausgewählter Zytokine durch die peripheren Abwehrzellen nach TLR-Liganden-Stimulation untersucht werden. Die Auswahl der untersuchten Zytokine fiel auf im humanen Organismus typische Th17-begünstigende Zytokine. Im weiteren Verlauf wurde überprüft, welche pro-inflammatorische Zellen aus diesen Zytokinmilieus heraus differenzieren.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Humanes Vollblut

Die Blutentnahmen wurden freundlicherweise in der Leberambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Das Blut wurde in

mehreren NH₄-Heparin- Monovetten® (Sarstedt) entnommen. Als eine Vergleichsgruppe wurden Abwehrzellen aus dem Vollblut gesunder Probanden verwendet. Diese Zellen wurden aus Buffy Coats isoliert, die mit freundlicher Genehmigung des Institutes für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt wurden. Die Buffy Coats fielen im Rahmen der Vollblutspende als Nebenprodukt an und bestehen vor allem aus Leukozyten. Die Verwendung der humanen Blutproben erfolgte mit Zustimmung der lokalen Ethikkommission.

1.2 Versuchstiere

Für den Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen zur Induktion einer Hepatitis im Mausmodell wurden die Mausstämme C57BL/6 (Wildtyp; WT) und Interleukin 10 defiziente C57BL/6 (IL-10^{-/-}) verwendet. Im Transferversuch 1 wurden im Durchschnitt 7 Wochen alte Mäuse unterschiedlichen Geschlechts immunisiert. In Transferversuch 2 waren die Tiere durchschnittlich 26 Wochen alt. Ein Tierversuchsantrag ist vorhanden.

1.3 Materialien für die Synthetisierung des humanen/murinen SLA/LP-Proteins

- | | |
|--|---|
| ▪ Bradford-Reagenz (Roti®-Quant) | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ BSA-Standard | Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland |
| ▪ BugBuster® | Novagen, EMD Chemicals Inc., USA |
| ▪ Dialyseschläuche
(MWCO 8000-10000) | Spectrum Laboratories, USA |
| ▪ Dialyseverschlussklammern | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ E.coli BL21(DE3) | Stratagene, USA |
| ▪ Faltenfilter | Rotilabo® , Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ Einmalküvetten aus Polysterol | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ Isopropyl-β-D-thiogalacto-
pyranosid (IPTG) | Invitrogen GmbH, Deutschland |
| ▪ Kanamycin(sulfat) | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ Laktose | Carl Roth GmbH, Deutschland |

- LB Agar (Ultrapure 35 g/l) USB Corporation, USA
- LB Medium („Broth“Ultrapure 20g/l) USB Corporation, USA
- Lysozym Merck, Deutschland
- Nuclease (Benzonase® Novagen) EMD Chemicals Inc., USA

1.4 Materialien für den Nachweis des SLA/LP-Proteins

- Ammoniumpersulfat Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
- Anti-Human IgG-Antikörper Dako Deutschland GmbH, Deutschland
(Rabbit Anti-Human IgG/HRP)
- Coomassielösung (Roti®-Blue) Carl Roth GmbH, Deutschland
- DAB/metal-Konzentrat (10X) Roche, Deutschland
und Peroxidasepuffer
- Dithiothreitol (DTT) Roche, Deutschland
- Milchpulver (Spinnrad®) InterTee Handels GmbH, Deutschland
- PVDF-Membran (Immun-Blot™) Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
(0,2µm)
- Protein-Standard Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
- Rotiphorese® Gel 30 Carl Roth GmbH, Deutschland
- Sodiumdodecylsulfate (SDS) Merck, Deutschland
(= Natriumdodecylsulfat)
- Temed Carl Roth GmbH, Deutschland
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Sigma-Aldrich, USA
(TRIS), (Trizma®base)

1.5 Materialien für den murinen Transferversuch

- Kanüle (0,45 X 13mm) BD Biosciences, USA
(BD Microlance™ 3)
- Ketamin aniMedica GmbH, Deutschland
- Kulturflasche Sarstedt, Deutschland
(T75CN, Vent Cap Red)
- Nylonsieb BD Biosciences, USA
(BD Falcon™, Cell Strainer, 100µm)

- | | |
|------------------|-------------------------------|
| ▪ Panserin™ 401 | PAN Biotech GmbH, Deutschland |
| ▪ Rompun 2% | Bayer, Deutschland |
| ▪ Spritzen (2ml) | BD Biosciences, USA |

1.6 Materialien für feingewebliche Untersuchungen

- | | |
|-------------------------------------|---|
| ▪ Deckgläser | Paul Marienfeld GmbH, Deutschland |
| ▪ Eisessig (Essigsäure 100%) | Merck, Deutschland |
| ▪ Eosin G – Lösung | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ Entellan® | Merck, Deutschland |
| ▪ Ethanol 96% | Th. Geyer GmbH, Deutschland |
| ▪ Formaldehyd 37% | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ Hämalaulösung sauer
nach Mayer | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ Isopropanol (2-Propanol) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Deutschland |
| ▪ Objektträger (Super Frost Plus) | Hecht-Assistent, Deutschland |
| ▪ Roticlear® | Carl Roth GmbH, Deutschland |

1.7 Materialien für Zellkulturen

- | | |
|---|-----------------------------|
| ▪ Cytofix/Cytoperm™ | BD Biosciences, USA |
| ▪ Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| ▪ FCS | Gibco, Invitrogen, USA |
| ▪ Ficoll (Histopaque®-1077) | Sigma- Aldrich, Deutschland |
| ▪ Foxp3 Puffer A
(Human Foxp3 Buffer A, 10X) | BD Biosciences, USA |
| ▪ Foxp3 Puffer B
(Human Foxp3 Buffer B, 50 X) | BD Biosciences, USA |
| ▪ GolgiPlug™ | BD Biosciences, USA |
| ▪ Kulturmedium
(RPMI1640+GlutaMax™-I) | Gibco, Invitrogen, USA |
| ▪ Kulturplatten
(96well round bottom cultureplate) | Sarstedt, Deutschland |

▪ Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Deutschland
▪ Penicillin/Streptomycin (P/S)	Cambrex Bio Science Verviers, Belgien
▪ Perm/Wash™	BD Biosciences, USA

1.8 Antigene und Mitogene

▪ CMV Peptid	Metabion International AG, Deutschland
▪ ConA	Amersham Biosciences AB, Schweden
▪ HCV Peptid	Metabion International AG, Deutschland
▪ SLA1 Peptid	Metabion International AG, Deutschland
▪ SLA2 Peptid	Metabion International AG, Deutschland

1.9 Antikörper, Liganden und Zytokine

▪ Anti-Human Foxp3 (Alexa Fluor 488)	BD Biosciences, USA
▪ Anti-Human CD25 (APC)	BD Biosciences, USA
▪ Anti-Human IFN- γ (APC)	BD Biosciences, USA
▪ Anti-Human IL-17A (FITC)	eBioscience, Deutschland
▪ Anti-Human CD127 (PE)	BD Biosciences, USA
▪ Anti-Human CD39 (PE)	eBioscience, Deutschland
▪ Anti-Human TNF- α (PE)	BD Biosciences, USA
▪ Anti-Human CD4 (PE-Cy7)	BD Biosciences, USA
▪ Anti-Human CD8 (PerCP)	BD Biosciences, USA
▪ CompBead™ Anti-Mouse Ig, κ	BD Biosciences, USA
▪ Flagellin (Bacillus subtilis)	InvivoGen, USA
▪ Interleukin-2 (Proleukin®)	Novartis Pharma, Deutschland
▪ LPS	Sigma-Aldrich, USA
▪ LTA (Bacillus subtilis)	InvivoGen, USA
▪ Loxoribine	InvivoGen, USA
▪ MDP	InvivoGen, USA
▪ ODN2395	InvivoGen, USA
▪ PGN-BS (Bacillus subtilis)	InvivoGen, USA
▪ Poly(I:C)	InvivoGen, USA

- ssPolyU/LyoVec InvivoGen, USA

1.10 Materialien für ELISA

- BSA PAA Laboratories GmbH, Österreich
- ELISA Mikroplatten Thermo Fisher Scientific, Dänemark
- Human IL-6 DuoSet R&D Systems, Deutschland
- Human Interleukin-1 β Ready-Set-Go! eBioscience, Deutschland
- Human Interleukin-21 Ready-Set-Go! eBioscience, Deutschland
- Human Interleukin-23 Ready-Set-Go! eBioscience, Deutschland
- TMB Plus READY-TO-USE Substrate Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Dänemark
- Tween® 20 Merck, Deutschland
- Verschlussfilm (Rotilabo®) Carl Roth GmbH, Deutschland

1.11 Puffer, Gele und Medien

- ACK Puffer
150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1,3 mM EDTA, pH 7,4
- Einfriermedium (Zelllinien)
40% FCS, 10%DMSO, 50% Kulturmedium (10% FCS, 1%P/S) mit 40IU IL-2
- Formalin, gepuffert (4%, pH 7,5) (Histologie)
21,62ml Formalin (37%); Ad 200ml PBS
- PBS
2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,3

Herstellung des SLA/LP-Proteins

- Auftragspuffer
20mM HEPES (pH 7,9), 8M Guanidinium-Hydrochlorid
- Dialysepuffer
20mM TRIS-HCl (pH 7,6), 0,01mM EDTA, 0,02% SDS

- Elutionspuffer

20mM HEPES (pH 7,9), 6 M Harnstoff, 250mM Imidazol

- LEW-Puffer

50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 8,0

- SOB-Medium

20g Bacto Trypton, 5g Hefe Extrakt, 0,58g NaCl, 0,19g KCl, 10ml 1M MgCl₂,
10ml 1M MgSO₄; Ad 1Liter H₂O, pH 6,5; Autoklavieren für 20min

- SOC-Medium

1ml 2M Glukose-Lösung; Ad 100ml SOB-Medium

- Solubilisierungspuffer

20mM HEPES (pH 7,6), 6M Guanidiniumhydrochlorid

- Waschpuffer

20mM HEPES (pH 7,9), 6M Harnstoff

Nachweis des SLA/LP-Proteins

- Anodenpuffer 1

100ml 3M TRIS (pH 10,4), 200ml Methanol; Ad 1 Liter H₂O

- Anodenpuffer 2

100ml 0,25M TRIS (pH 10,4), 200ml Methanol; Ad 1 Liter H₂O

- Blocklösung

PBS, 5% Milchpulver, 0,5% Tween® 20

- DTT(Dithiothreitol)-Puffer (2fach)

125mM TRIS-HCl, 40mM DTT, 20% Glycerin, 0,1% SDS

0,1g Bromphenol Blau

- Elektrodenpuffer

24g TRIS, 115,2g Glycin, 8g SDS; Ad 2 Liter H₂O

- Kathodenpuffer

100ml 0,25M TRIS (pH 9,4), 200ml Methanol, 4,65ml Capronsäure;

Ad 1 Liter H₂O

- Laufgel, 10ml

4ml H₂O, 3,3ml Rotiphorese® Gel 30, 2,5ml 1,5M TRIS (pH 8,8),

0,1ml SDS (10%), 0,1ml Ammoniumpersulfat (10%), 0,004ml Temed

- Sammelgel, 5ml

3,4ml H₂O, 0,83ml Rotiphorese® Gel 30, 0,63ml 1,0M TRIS (pH 6,8),
0,05ml SDS (10%), 0,05ml Ammoniumpersulfat (10%), 0,005ml Temed

▪ Waschlösung

PBS, 0,5% Tween® 20

ELISA von TLR-stimulierten Zellen

▪ Blocklösung

PBS, 1% BSA

▪ Stopplösung

2N H₂SO₄

▪ Waschpuffer

PBS, 0,05% Tween® 20

1.12 Chemikalien

▪ β-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland
▪ Capronsäure	Carl Roth GmbH, Deutschland
▪ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Deutschland
▪ Glycin	Carl Roth GmbH, Deutschland
▪ Guanidiniumhydrochlorid	Carl Roth GmbH, Deutschland
▪ Harnstoff	Carl Roth GmbH, Deutschland
▪ 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) (Pufferan®)	Carl Roth GmbH, Deutschland
▪ Imidazol	Carl Roth GmbH, Deutschland

1.13 Sonstiges

▪ Blutentnahmeröhrchen (Monovette® NH ₄ -Heparin)	Sarstedt, Deutschland
▪ Cryotube (1,6ml)	Sarstedt, Deutschland
▪ Elektrophoreseapparaturen	BIOzym, Niederlande
▪ FACS-Röhrchen	Sarstedt, Deutschland

- Kunststoffwaren
 - Sarstedt, Deutschland
 - Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
 - BD Labware, New Jersey, USA
- Neubauer Zählkammer
 - Optik Labor Frischknecht, Deutschland
- Trypanblau (0,4%)
 - Invitrogen, USA

1.14 Geräte

- Analysegerät zur Transaminasen- Roche, Deutschland
messung (Hitachi Modular-P800)
- Bestrahlungsgerät (HWM D 400) Hans Wälischmiller GmbH, Deutschland
- Brutschrank (CO₂ Incubator) SANYO Biomedical, USA
- Digitalkamera (Moticam 2500) Carl Roth GmbH, Deutschland
- ELISA-Auslesegerät Dynex Technologies GmbH, Deutschland
(Opsys MRX TC II)
- Elektrophoresekammer Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
(Mini-Protean® Tetra Cell)
- FACS-Gerät (FACSCanto™) BD Biosciences, USA
- Lichtmikroskope
 - Leica Microsystems DM IRB Wetzlar GmbH, Deutschland
 - Axiovert 40 CFL Carl Zeiss Microimaging GmbH,
Deutschland
- Magnetrührer (MR 3001 K) Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
- Mikrotom (HM 335 E) Microm (heute: Thermo Scientific), USA
- Photometer eppendorf, Deutschland
- Reine Werkbank (BDK) Luft und Reinraumtechnik GmbH,
Deutschland
- Rollgerät (Stuart SRT6) Barloworld Scientific Ltd, UK
- Scanner Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
(GS-800 Calibrated Densitometer)
- Semi-Dry Blotter (PerfectBlue) peqLab Biotechnologie GmbH,
Deutschland
- Spannungsregler Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
(PowerPac Basic)

- Tiefkühlgerät (-80°C) (Ultra Low) SANYO Biomedical, USA
- Thermo-Rüttler Eppendorf, Deutschland
(Thermo Mixer Comfort)
- Vortexer (Reax 2000) Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
- Waage Kern&Sohn GmbH, Deutschland
- Wärmeplatte (Präzitherm) Störk-Tronic, Deutschland
- Wärme-/Trockenschrank Thermo Scientific, USA
(Heraeus® Function Line)
- Zentrifugen
- Megafuge 2.0 Heraeus Instruments, Deutschland
- C4-22 Jouan, Frankreich
- Centrifuge 5417R Eppendorf, Deutschland

1.15 Software

- BD FACSDiva™ Software 5.0.1 BD Biosciences, USA
- GraphPad Prism 5.02 GraphPad Software Inc., USA

2. Methoden

Grundsätzlich wurde bei den Zellkulturversuchen und dem Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen zur Induktion einer Hepatitis im Mausmodell unter sterilen Bedingungen mit sterilfiltrierten Medien und Behältnissen gearbeitet. Durch Probandenblut oder Bakterien verunreinigte Waren wurden autoklaviert und ordnungsgemäß entsorgt.

2.1 Synthetisierung des humanen/murinen SLA/LP-Proteins

2.1.1 Transformation eines SLA/LP-Plasmids in einen kompetenten Bakterienstamm

Für die Versuche dieser Arbeit wurde entweder ein humanes oder murines SLA/LP-Protein verwendet. Zur Synthetisierung dieser Proteine wurde entweder ein humanes oder murines Plasmid aus laboreigener Herstellung in

den kompetenten, Kanamycin-resistenten *Escherichia coli* (E.coli)-Stamm BL21(DE3) transformiert. Es wurden 75ng bzw. 0,3µl des Plasmids (250ng/µl) zusammen mit einem 50µl-Aliquot von E.coli BL21(DE3) in einem 1,5ml konischen Reaktionsgefäß für 40s auf 42°C erhitzt und danach für 5min auf Eis wieder abgekühlt. Anschließend wurden 900µl SOC-Medium (siehe für die zur SLA/LP-Herstellung und dessen Nachweis verwendeten Puffer und Gele: III.Material und Methoden, 1.11 Puffer, Gele und Medien) hinzugegeben und 20min lang bei 37°C auf einem Thermo-Rüttler (500U/min = Umdrehungen pro Minute) inkubiert. Nach einer Zentrifugation (4000U/min=1700xg, 4°C, 2min, Centrifuge 5417R, Eppendorf) wurden 800µl Überstand verworfen und das verbliebene Sediment auf einer Agarplatte (LB=Luria-Bertani-Agar mit 1% Glukose und 50µg/ml Kanamycin) mit einem Plattierungsspatel verstrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von der Agarplatte wurde eine einzelne Bakterienkolonie ausgewählt und in 10ml LB Medium (1% Glukose, 50µg/ml Kanamycin) in einem 15ml-Röhrchen über Nacht bei 220U/min bei 37°C angeimpft. Anschließend wurden die Bakterien dieser Vorkultur abzentrifugiert (3000U/min=607xg, Raumtemperatur=RT, 10min, Megafuge 2.0, Heraeus Instruments), in 1 Liter LB Medium (50µg/ml Kanamycin) auf zwei 500ml Kolben verteilt und solange bei 220U/min und 37°C inkubiert, bis die Optische Dichte (OD) 0,8 bis 1,0 betrug. Die OD wurde in einem Photometer (eppendorf) bei einer Wellenlänge von 600nm ermittelt. Sobald der Zielwert der OD erreicht wurde, konnten Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (1mM) und Laktose (1%) zur Produktionskultur dazugegeben werden, welche über Nacht bei 37°C und 220U/min inkubierte.

2.1.2 Aufschluß des SLA/LP-Proteins

Am nächsten Tag wurde die Produktionskultur abzentrifugiert (3500U/min=1891xg, RT, 10min, Megafuge 2.0, Heraeus Instruments) und in einem 50ml Röhrchen mit 50ml BugBuster® (ca. 5ml/g Pellet bzw. 1/20 des Kulturvolumens) resuspendiert. Es wurden 50µl Benzonase® (1µl/ml BugBuster®) hinzugegeben, um die Zellwand der Bakterien zu zerstören, und anschließend 15min auf einem Rollgerät langsam rotiert. Daraufhin wurde zentrifugiert (3500U/min, ohne Bremse, RT, 30min, Megafuge 2.0, Heraeus

Instruments) und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde erneut in 50ml BugBuster® resuspendiert und danach Lysozym (200µg/ml) hinzugegeben, um das SLA-Protein aus den intrazellulären Einschlusskörperchen freizusetzen. Nach der Zugabe von Lysozym wurde für 30s gevortext und danach für 5min bei RT inkubiert. In einem 500ml-Zentrifugenbecher wurde die Suspension in einem Verhältnis 1:6 mit verdünntem BugBuster® (1:10 mit Aqua dest.) verdünnt und 1min lang geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (3500U/min, ohne Bremse, RT, 30min, Megafuge 2.0, Heraeus Instruments) wurde der Überstand vorsichtig mit einer serologischen Pipette abgenommen und verworfen und das Sediment in 300ml verdünntem BugBuster® (1:10 mit Aqua dest.) resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend wurde das Sediment in 40ml Solubilisierungspuffer mit β -Mercaptoethanol (20mM) in einem 50ml-Röhrchen aufgenommen und mit einem Magnetrührer 60min lang bei RT durchmischt. Dadurch wurde das Protein gelöst. Das gelöste SLA/LP-Protein wurde anschließend in einem Verhältnis von 1:4 mit Solubilisierungspuffer ohne β -Mercaptoethanol verdünnt und dann filtriert.

2.1.3 His-tag/Metallchelate-Chromatographie

Für die Chromatographie wurden Nickelsäulen verwendet, die zu Beginn der Chromatographie jeweils mit 4ml LEW-Puffer (Lysis-Equilibration-Wash) äquilibriert wurden. Danach wurden maximal 80ml des in Solubilisierungspuffer gelösten SLA/LP-Proteins pro Säule aufgetragen. Pro Säule wurden anschließend 5ml Auftragspuffer und danach 30ml Waschpuffer hinzugegeben. Die Elution der SLA/LP-haltigen Fraktion wurde mit Elutionspuffer durchgeführt, wobei mehrere Durchläufe mit jeweils 100µl Puffer erfolgten, die getrennt in 1,5ml Reaktionsgefäßen aufgefangen wurden. Für die anschließende Dialyse wurden nur die 100µl-Portionen verwendet, die die höchsten Proteinkonzentrationen aufwiesen, da damit zu rechnen war, dass erfahrungsgemäß ca. 50% des Proteins durch die Dialyse verloren gehen. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Methode nach Bradford angewendet.

2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration des SLA/LP-Proteins wurde anhand der Methode nach Bradford bestimmt. Hierbei verschiebt sich durch die Bindung von „Coomassie brilliant blue G-250“ an Proteinen im sauren Milieu das Absorptionsmaximum des Farbstoffs. Es wurden 10µl des gelösten Proteins auf 1ml mit verdünntem Bradford-Reagenz/Roti®-Quant (1:5 mit H₂O) aufgefüllt. In Einmalküvetten wurde die Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm gegen einen Leerwert, der nur Bradford-Reagenz ohne Protein enthielt, gemessen. Zur Eichung diente eine BSA-Standard-Reihe, um die Proteinkonzentration errechnen zu können.

2.1.5 Dialyse

Da sowohl der Waschpuffer als auch der Elutionspuffer der His-tag/Metallchelate-Chromatographie harnstoffhaltig waren, musste noch eine Dialyse erfolgen, bevor das SLA/LP-Protein in der Zellkultur oder zur Injektion bei Mäusen eingesetzt werden konnte. Hierfür wurden Dialyseschläuche mit H₂O gespült und zugeschnitten (1cm Länge für ein Füllungsvolumen von ca. 300µl), mit SLA/LP-haltigem Eluat der His-tag/Metallchelate-Chromatographie befüllt und die Enden mit Dialyseverschlussklammern versiegelt. Die gefüllten und verschlossenen Dialyseschläuche wurden anschließend in zwei Liter Dialysepuffer gelegt und acht Stunden bei 4°C (Kühlraum) unter langsamem Rühren gelagert. Im Anschluß wurde der SLA/LP-haltige Inhalt der Dialyseschläuche in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und nochmals eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.1.6 Nachweis des SLA/LP-Proteins

Zur Proteinauftrennung wurden zwei identische Gele für das Verfahren „SDS-PAGE“ („sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) gegossen. Die Protein-bandensollten in einem Gel mit Hilfe einer Coomassie-Färbung und in dem anderen Gel mit einer Antikörper-spezifischen Protein-Färbung mit Diaminobenzidin-

(DAB) Umsatz deutlich gemacht werden. Es wurde jeweils zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstandhalter zuerst ein 5ml Laufgel und nach dessen Polymerisation darauf ein 2,5ml Sammelgel gegossen. Durch einen Kamm wurden Taschen für die anschließende Proteinbefüllung geformt. Um die Proteine zu denaturieren, wurden für beide Nachweisverfahren zusammen 40µg SLA/LP-Protein mit 20µl eines 1:2 mit H₂O verdünnten Dithiothreitol-(DTT) Puffer (2fach) für 3min bei 95°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt.

Die Proben wurden auf die beiden Gele aufgeteilt und jeweils eine Tasche mit dem SLA/LP-Protein und einem Protein-Standard beladen. In einer mit Elektrodenpuffer befüllten Elektrophoresekammer wurde das Gel 15min bei 50V und 500mA und danach 90min bei 120V und 500mA laufen gelassen.

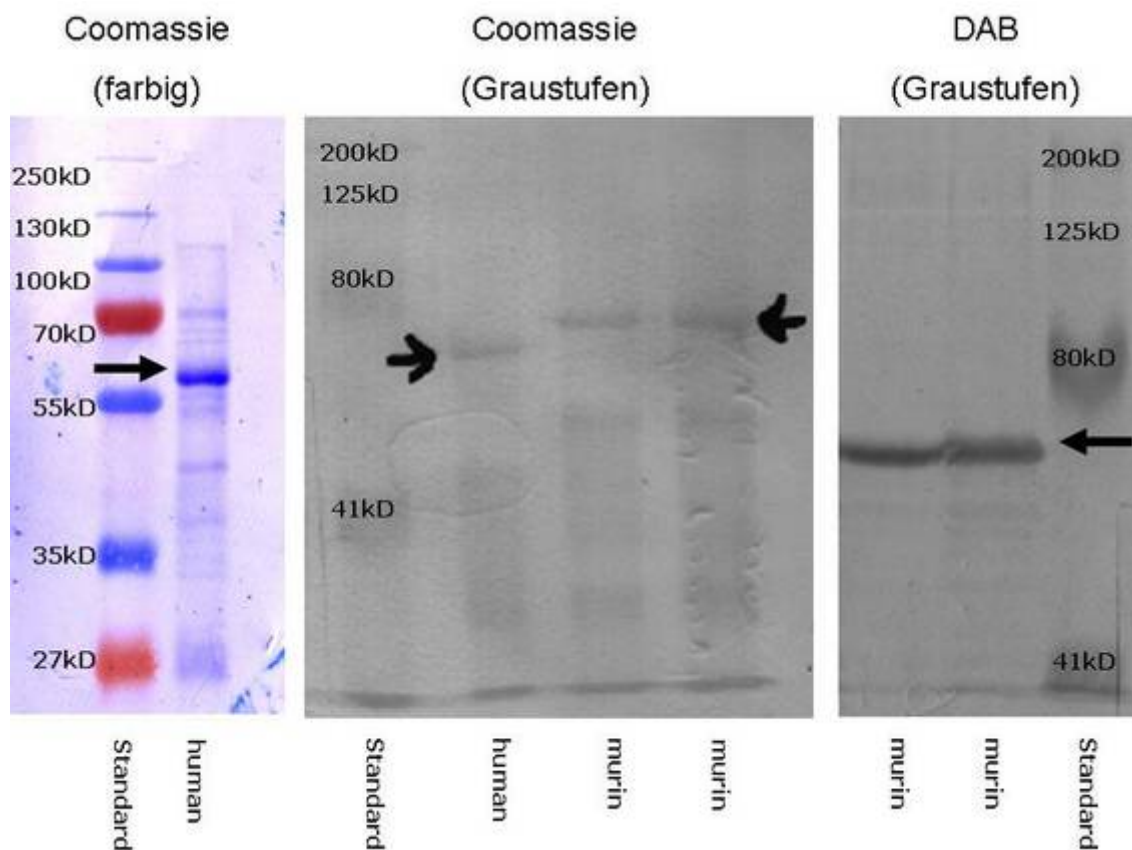
Für die elektrophoretische Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran wurde das Semi-Dry-Blot-System verwendet. Nach Verwerfen des Sammelgels wurde das Laufgel für 10min in Anodenpuffer 2 inkubiert. Eine PVDF-Membran wurde 2min in Methanol (100%) und anschließend 15min in Anodenpuffer 2 inkubiert. Filterpapiere, die in Anodenpuffer 1 und 2 getränkt worden waren, flankierten in einem Semi-Dry Blotter zur Anodenseite hin die PVDF-Membran. Zur Kathodenseite hin befand sich entsprechend in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier, das das Gel mit den Proteinen wiederum flankierte. Nach Verschuß des Semi-Dry Blotters wurden die Proteine bei 380mA auf die PVDF-Membran transferiert.

Ein Gel wurde für eine Coomassie-Färbung verwendet. Dafür wurde das Gel 1min in verdünnte Coomassielösung (1:5 mit H₂O) gelegt und anschließend mehrmals für mehrere Minuten mit Methanol (50%) gewaschen, bis sich der Hintergrund der Membran entfärbt hatte und nur die gefärbten Proteinbanden sichtbar blieben (siehe Grafik 1.2).

Das andere Gel diente dem spezifischen Nachweis des SLA/LP-Proteins durch eine Antikörperfärbung mit DAB-Umsatz. Vorerst wurde dieses Gel aber über Nacht bei 4°C auf einem Rollgerät in einem 50ml Falcon-Gefäß in einer Blocklösung inkubiert. Nach einem Waschschrift mit dreimaligem Spülen in Waschlösung für jeweils 5min auf einem Rollgerät, wurde ein SLA/LP-spezifischer Primärantikörper aus laboreigener Herstellung in dem Verhältnis 1:200 mit 5ml Blocklösung verdünnt und für eine Stunde bei RT auf einem Rollgerät mit dem Gel inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift.

Danach wurde der Sekundärantikörper „Anti-Human IgG“ 1:1000 in 5ml Blocklösung verdünnt und bei den gleichen Bedingungen wie der Primärantikörper auf das Gel aufgetragen. Der Sekundärantikörper richtete sich gegen humanes IgG und war mit HRP (Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) konjugiert. Das Gel wurde mit einem Gemisch aus „DAB/metal“-Konzentrat (10X) und Peroxidasepuffer im Verhältnis 1:10 bedeckt und für ca. 5-15min inkubiert, bis sich schwarz-braune Banden zeigten (siehe Grafik 1.2). Zuletzt wurde das Gel einmalig gewaschen. Die in der Grafik 1.2 nachgewiesenen Banden des humanen und murinen SLA/LP-Proteins entsprechen der aus den laborinternen Vorarbeiten erwarteten Molekülgröße.

Grafik 1.2 Nachweis des SLA/LP-Proteins



DAB = Diaminobenzidin; kD = Kilodalton; Die Pfeile markieren die Banden des SLA/LP-Proteins

2.2 Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen zur Induktion einer Hepatitis im Mausmodell

2.2.1 Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen

Es wurden zwei verschiedene Versuche eines Transfers von Lymphknotenzellen, die mit dem SLA/LP-Protein aktiviert worden waren, im Mausmodell durchgeführt.

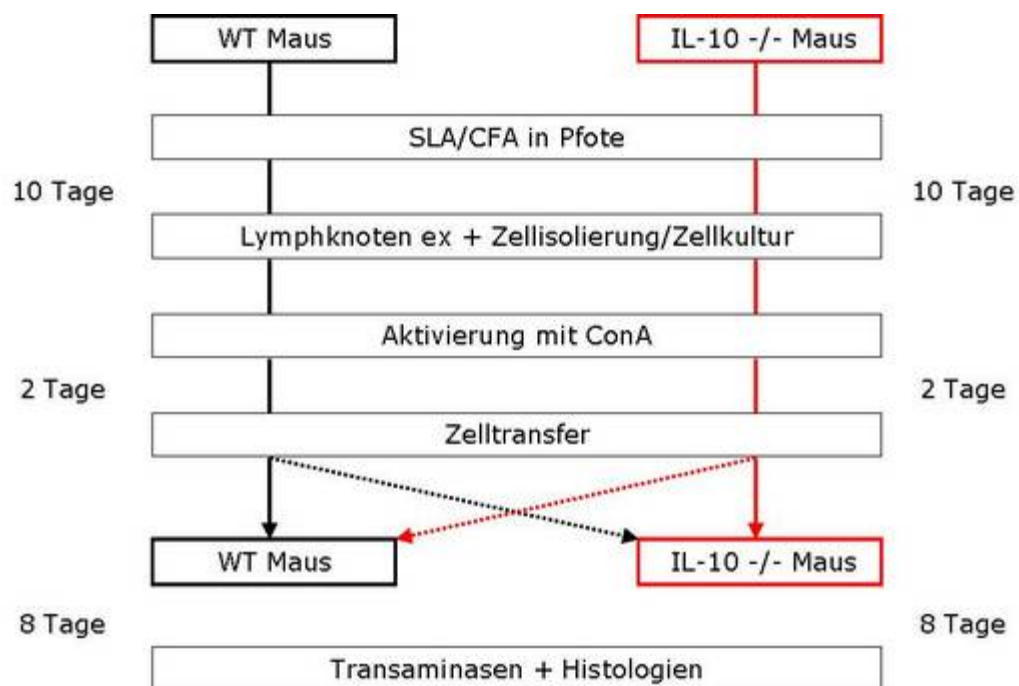
Zum einen sollte der Einfluß des genetischen Hintergrundes der Mäuse auf die Auslösung bzw. die Effektorphase der Immunreaktion gegen das SLA/LP-Protein untersucht werden (Transferversuch 1). Es wurden Mäuse mit IL-10^{-/-} Hintergrund und Wildtyp-Mäuse (WT) des Stammes C57BL/6 verwendet.

Zum anderen wurde in einem zweiten Ansatz nähergehend analysiert, ob die induzierte Hepatitis spezifisch auf die SLA/LP-Immunisierung oder unspezifisch auf das verwendete Adjuvans (siehe unten) war (Transferversuch 2).

Beim Transferversuch 1 wurde jeweils bei WT Mäusen und bei IL-10^{-/-} Mäusen eine Emulsion zu gleichen Anteilen bestehend aus murinem SLA/LP-Protein und CFA mit einer sterilen Kanüle (0,45x13mm) subkutan in beide Hinterläufe gespritzt. Das CFA besteht aus Mineralöl mit inaktivierten Mykobakterien und dient der Potenzierung von Immunantworten. Jede Maus erhielt eine Menge von 25µg SLA/LP-Protein in einem Emulsionsvolumen von 50µl pro Injektion. Zehn Tage nach der Vakzinierung wurden die drainierenden, inguinalen Lymphknoten exzidiert, nachdem die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet worden waren. Die entnommenen Lymphknoten wurden mit einem Spritzenkolben durch ein Nylonsieb mit der Porengröße 100µm (Cell Strainer) gerieben und der Durchfluß mit den gewonnenen Zellen in einem 50ml Gefäß aufgefangen. Die Zellzahl wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Vitalität der Zellen mit einer Trypan-Blau-Färbung überprüft. Die Zellen wurden anschließend in einer Konzentration von 2×10^6 /ml in Panserin™ in Kulturflaschen (75cm²) mit einer ConA-Konzentration von 2µg/ml und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aktiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen gewaschen, erneut gezählt und deren Vitalität überprüft. Es wurden 10×10^6 Zellen in einem Volumen von 500µl PBS (Phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung; siehe III.Material und Methoden, 1.11 Puffer,

Gele und Medien) einer gesunden Maus intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Dabei wurden sämtliche Kombinationsmöglichkeiten aus SLA/LP-sensibilisierten Zellen (entweder aus WT Maus oder IL-10^{-/-}-Maus) und Empfängermaus (entweder in WT Maus oder IL-10^{-/-}-Maus) angewandt (siehe Grafik 1.3). Nach 8 Tagen wurden die Mäuse zur histologischen Untersuchung hepatektomiert und zur Transaminasenbestimmung kardial punktiert.

Grafik 1.3 Versuchsaufbau vom Transferversuch 1

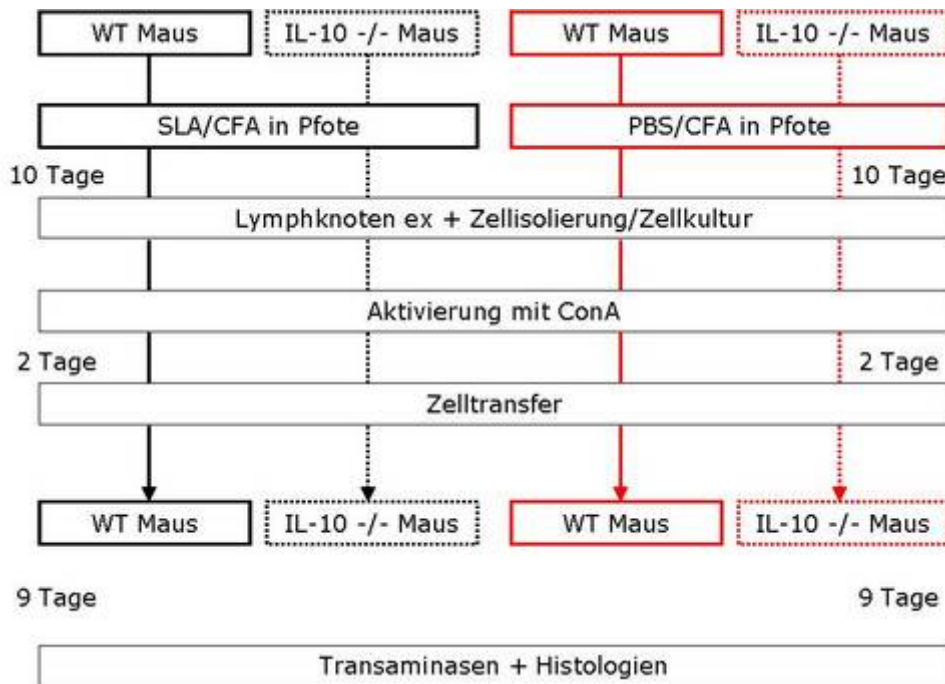


WT = Wildtyp; IL-10^{-/-} = IL-10 knockout; SLA/CFA = Emulsion aus SLA/LP-Protein und CFA (komplettes Freund'sches Adjuvans); Lymphknoten ex = Die Lymphknoten wurden exzidiert; ConA = Concanavalin A

Beim Transferversuch 2 wurden zum Zelltransfer die gleichen Rahmenbedingungen hergestellt wie im Transferversuch 1, allerdings mit dem Unterschied, dass sowohl den WT Mäusen als auch den IL-10^{-/-} Mäusen entweder eine Emulsion aus SLA/CFA oder aus PBS/CFA, die jeweils aus gleichen Verhältnissen bestanden, gespritzt wurden. Hierbei sollte ein verfälschender Einfluss von CFA auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden, das einzig der unspezifischen Aktivierung des Immunsystems dienen sollte. Die isolierten Zellen aus den Lymphknoten, die anschließend mit ConA stimuliert

und für zwei Tage kultiviert worden waren, wurden wieder in den Mausstamm zurückgespritzt, aus dem sie ursprünglich kamen (siehe Grafik 1.4). Beim Transferversuch 2 wurden die Tiere 9 Tage nach dem Zelltransfer hepatektomiert und kardial punktiert.

Grafik 1.4 Versuchsablauf vom Transferversuch 2



WT = Wildtyp; IL-10^{-/-} = IL-10 knockout; SLA/CFA = Emulsion aus SLA/LP-Protein und CFA (komplettes Freund'sches Adjuvans); PBS/CFA = Emulsion aus PBS und CFA (komplettes Freund'sches Adjuvans); Lymphknoten ex = Die Lymphknoten wurden exzidiert; ConA = Concanavalin A

2.2.2 Entnahme und Paraffin-Einbettung der murinen Lebern

Die Mäuse wurden unter tiefer Narkose mit Ketamin und Rompun (2%) getötet und die Lebern entnommen. Durch kardiale Punktion wurde Blut für die Transaminasenbestimmung gewonnen. Ein Leberlappen wurde in 3ml Formalin, gepuffert (4%, pH 7,5; siehe III. Material und Methoden, 1.11 Puffer, Gele und Medien), in einem 15ml konischen Röhrchen für 24h fixiert. Danach wurde dekantiert, mit 15ml H₂O aufgefüllt und für 2,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde wiederum dekantiert und eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 5ml Isopropanol in den Konzentrationen 20%, 40% und 70% für

jeweils 45min zur Entwässerung des Gewebes durchgeführt, wobei zwischendurch dekantiert wurde. In Isopropanol (70%) wurden die Lebern bis zur Einbettung in Paraffin bei RT und in Dunkelheit gelagert. Die Paraffineinbettung erfolgte freundlicherweise durch das pathologische Institut des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Paraffinblöcke wurden anschließend mit einem Mikrotom mit einer Schnittdicke von 4µm geschnitten, in einem 40°C warmen Wasser-Streckbad auf einen Objektträger aufgezogen und auf einer ebenfalls 40°C warmen Wärmeplatte für 30min getrocknet. Im Anschluß wurden die Objektträger mit den Leberschnitten bei 50°C über Nacht in einem Wärme-/Trockenschrank aufbewahrt.

2.2.3 Hämatoxilin-Eosin-Färbung der murinen Lebern

Die getrockneten Leberschnitte auf den Objektträgern wurden nacheinander in drei verschiedenen Glaswannen, die mit Roticlear® gefüllt waren, für jeweils 5 min inkubiert, um die Schnitte zu entparaffinieren. Nach einer absteigende Alkoholreihe (jeweils 5 min in 100%-, 90%-, 70%- und 50%-igem Ethanol) wurden die Gewebeschnitte wieder ins wässrige Milieu überführt (Aqua dest. für 2min), um die Hämatoxilin-Eosin-(HE-)Färbung durchführen zu können. Dafür wurden die Objektträger für 5min mit Hämalaulösung sauer nach Mayer bedeckt, danach kurz mit Aqua dest. gespült und dann für 15min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Im Anschluss wurde die Gewebsschnitte kurz mit Aqua dest. gespült und für 3min in Eosin G – Lösung (mit einem Tropfen Eisessig pro 100ml) gelagert und danach wiederum mit Aqua dest. gespült. Die folgende aufsteigende Alkoholreihe (5sec in 50%igem, 30sec in 70%igem, 1min in 90%igem und 4min in 100%igem Ethanol) diente der Entwässerung. Zum Schluss wurden die Schnitte in eine Glaswanne mit Roti-Clear überführt, die Objektträger einzeln abgetropft und das gefärbte Lebergewebe mit einem Tropfen Entellan® und einem Deckglas versiegelt.

2.2.4 Transaminasenmessungen

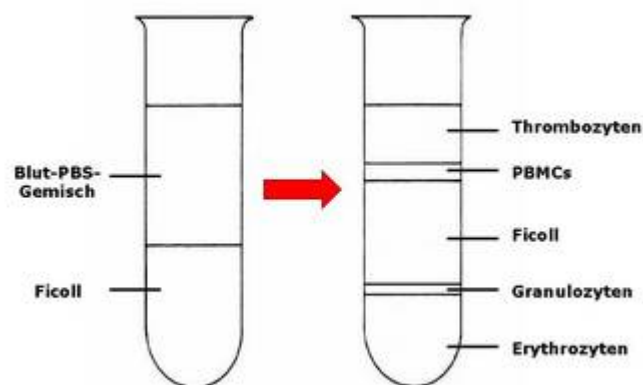
Das durch kardiale Punktion erhaltene Vollblut wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (2500U/min, 4°C, 10min, Centrifuge 5417R, Eppendorf) konnten 100-150µl Plasma pro Maus als Überstand abgenommen werden. Die Transaminasen wurden am Institut für Klinische Chemie/Zentrallaboratorien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit dem Analysegerät Roche-Hitachi Modular-P800 (Roche, Deutschland) ermittelt.

2.3 Analyse von SLA/LP-spezifischen Zelllinien

2.3.1 Zellisolation

Zur Zellisolation wurde das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Aufgrund der Dichte von Ficoll (Histopaque®-1077, Sigma Aldrich), ein synthetisches Polysaccharid, können Thrombozyten und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) eine Schicht aus Ficoll während der Zentrifugation nicht passieren. Die PBMCs, welche Monozyten und Lymphozyten umfassen, sammeln sich nach der Zentrifugation in einer Intermediärschicht (siehe Grafik 1.5).

Grafik 1.5 Dichtegradientenzentrifugation



PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell = Periphere mononukleäre Blutzellen

Es wurden pro Patient insgesamt ca. 25ml Vollblut in mehreren Blutentnahme-Röhrchen gewonnen und zentrifugiert (1500U/min=430xg, RT, 5min, C4-22, Jouan). Der Überstand, der das Blutplasma darstellte, wurde verworfen. Die Sedimente der Blutentnahmeröhrchen wurde in einem 50ml-konischen Röhrchen gesammelt, auf ein Gesamtvolumen von 35ml mit PBS aufgefüllt und resuspendiert. In einem 50ml-Reaktionsgefäß wurden zuvor pro Patient 15ml Ficoll auf Raumtemperatur erwärmt. Das Gemisch aus Blutzellen und PBS wurde vorsichtig mit einer serologischen Pipette auf das Ficoll geschichtet. Nach einer Zentrifugation mit minimaler Beschleunigung und ohne Abbremsung (1700U/min=2574xg, RT, 20min, Megafuge 2.0, Heraeus Instruments) zeigte sich eine trübe Intermediärschicht, die die PBMCs repräsentierte. Diese Interphase wurde abpipettiert und in einem neuen 50ml- Reaktionsgefäß aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 50ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1500U/min, RT, 5min, C4-22, Jouan). Im Anschluss wurde das Zellpellet makroskopisch auf Verunreinigungen durch Erythrozyten beurteilt und eventuell eine Erythrozytenlyse mit ACK-Puffer durchgeführt (siehe unten). Nach zweimaligem Waschen mit 50ml PBS und Zentrifugation (jeweils 1500U/min, RT, 5min, C4-22, Jouan) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in einem Volumen von 10ml Kulturmedium (RPMI1640+GlutaMax™-I mit zusätzlich 5% Fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)) aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Vitalität der Zellen durch eine Trypan-Blaufärbung überprüft, um die Zellen danach in 96-well-Platten zu kultivieren (siehe unten).

2.3.2 Erythrozytenlyse mittels ACK-Puffer

Wenn die isolierten PBMCs stark durch Erythrozyten verunreinigt waren, wurde eine Erythrozytenlyse mit ACK-Puffer (siehe III. Material und Methoden, 1.11 Puffer, Gele und Medien) durchgeführt. Dazu wurde das Zellpellet der PBMCs mit 2ml ACK-Puffer versetzt, vorsichtig resuspendiert und unter Schwenken 2min inkubiert. Um die Lyse zu stoppen, wurde das 50ml-Gefäß mit PBS aufgefüllt und danach zentrifugiert (1500U/min, RT, 5min, C4-22, Jouan).

2.3.3 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden in 96-well Zellkulturplatten mit einer Konzentration von 300.000 Zellen pro „well“ in einem Volumen von 200µl Kulturmedium (5% FCS, 1% P/S) pro „well“ ausgesät. Die Zellen wurden in einem Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zelllinien wurden an den Tagen 3, 7 und 10 vor der ersten Restimulation (Tag 14) und an den Tagen 17, 21 und 24 vor der zweiten Restimulation (Tag 28) mit Interleukin-2 (IL-2) mit einer Endkonzentration von 20Units/ml aktiviert (Versuchsablauf siehe Grafik 3.1 in IV. Ergebnisse, 3. Analyse von SLA/LP-spezifischen Zelllinien). Dafür wurden zuvor 100µl Überstand des Kulturmediums aus jedem „well“ abgenommen und verworfen. Jedem „well“ wurde daraufhin wieder 100µl frisches Kulturmedium (5% FCS, 1% P/S) mit der oben genannten Endkonzentration von IL-2 zugeführt.

2.3.4 Stimulation der Zelllinien

Durch Mehrfachstimulationen der ausgesäten Zellen mit dem selbst hergestellten humanen SLA/LP-Protein oder mit zwei synthetischen Peptiden aus der Sequenz des SLA/LP-Moleküls sollte versucht werden, SLA/LP-spezifische T-Zellen aus dem peripheren Blut zu stimulieren und SLA/LP-spezifische Zelllinien zu schaffen. Weiterhin wurden verschiedene Kontrollpeptide und polyklonale, unspezifische Aktivatoren eingesetzt, um die T-Zell-Antworten gegen das SLA/LP-Molekül vergleichen zu können. Als Negativkontrolle diente ein Kontrollpeptid aus der Sequenz des Hepatitis-C-Virus, für das die meisten Nicht-Infizierten immunologisch naiv sein müssten. Um eine unspezifische Reaktion der Zellen gegen die Oberfläche der Zellkulturplatten oder gegen das FCS im Kulturmedium auszuschließen, wurde auch ein Ansatz ohne jeglichen Zusatz von Antigenen durchgeführt, indem die Zellen einfach in 200µl Medium kultiviert wurden und den gleichen Kulturbedingungen ausgesetzt waren, wie die anderen Ansätze. Als Positivkontrolle wurden die Stimulationen mit ConA und dem CMV-Peptid verwendet; für das Cytomegalievirus wurde eine hohe Durchseuchungsrate angenommen. Die Endkonzentrationen und Funktionen dieser verschiedenen

Ansätze sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Ein Ansatz umfasste 4 „wells“ mit jeweils 300.000 Zellen, also $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz.

Tabelle 1 Antigene zur Stimulation der Zelllinien

Antigen	Endkonzentration	Molekülgröße	Funktion
SLA Protein	4ng/μl	Protein	spezifisches Antigen
SLA1	2μg/μl	Peptid	spezifisches Antigen
SLA2	2μg/μl	Peptid	spezifisches Antigen
ConA	1,5ng/μl	Protein	Positivkontrolle
CMV	2μg/μl	Peptid	Positivkontrolle
HCV	2μg/μl	Peptid	Negativkontrolle

Die erworbenen, synthetischen Peptide waren durch folgende Aminosäure-Sequenzen gekennzeichnet:

Tabelle 2 Aminosäuresequenzen der eingesetzten Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz
SLA1	NH ₂ -VDLFI <i>NRLDRCLKAVRKERSKE</i> -COOH
SLA2	NH ₂ -H <i>LIQQGARVGRIDA</i> FAFV-COOH
CMV	NH ₂ -YQEFFWDANDIYR-COOH
HCV	NH ₂ -VLVLNPSVA-COOH

Die verwendeten Peptide waren HLA-DR3-restringiert. Die Sequenzen von SLA1 und SLA2 entstammen der cDNA-Sequenz, die Wies et al. (2000) für das SLA/LP Molekül beschrieben haben.

Der kursiv gedruckte Sequenzabschnitt aus dem SLA1-Peptid ist ein Teil der von der gleichen Arbeitsgruppe als dominantes Epitop charakterisiert wurde und der sich am Carboxy-Terminus des kompletten SLA/LP-Proteins befindet. Mix et al. (2008) konnten zeigen, dass eine T-Zell-Erkennung zu steigern war,

wenn sowohl am Carboxy- als auch am Amino-Terminus jeweils 3-5 Aminosäuren entfernt wurden und definierten dadurch eine für die T-Zell-Erkennung optimale Sequenz (kursiv und gleichzeitig fett gedruckt).

Eine optimale Variante des SLA2-Peptids (kursiv und gleichzeitig fett gedruckt) wurde auch von Mix et al. beschrieben, die wie auch beim SLA1-Peptid weniger Aminosäuren aufweist als die in dieser Arbeit verwendeten Peptide. Mix et al. (2008) konnten außerdem eine HLA-DR Restriktion ihrer um wenige Aminosäuren kleineren als die in dieser Arbeit verwendeten Peptide belegen. Die HLA-DRB1*0301-restringierte HCV-Sequenz wurde von Diepolder et al. (1997) beschrieben.

2.3.5 Einfrieren von Zellen

Da für die Restimulation sogenannte „Feeder-Zellen“ (siehe unten) vom jeweiligen Patienten benötigt wurden, mussten pro Patient mindestens zwei Tiefkühlröhrchen („Cryotubes“) mit jeweils 1×10^6 PBMCs in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt werden. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen in einem 15ml konischen Röhrchen in 1ml Kulturmedium (10% FCS, 1% P/S) resuspendiert und vorsichtig innerhalb von drei Minuten insgesamt 1ml „Einfrier-Medium“ (siehe III. Material und Methoden, 1.11 Puffer, Gele und Medien) tropfenweise und unter Schwenken hinzugegeben. Danach wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und in einem Milliliter gelöst auf die „Cryotubes“ verteilt. Diese wurden sofort auf Eis gelagert, danach für 24 Stunden in einer Tiefkühltruhe bei -80°C aufbewahrt und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.6 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die „Cryotubes“ vom flüssigen Stickstoff auf Trockeneis überführt und danach in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt. Die nun flüssige Zellsuspension aus dem „Cryotube“ wurde in ein 15ml-Röhrchen überführt und dieses auf Eis gelagert. Innerhalb von 3 Minuten wurden tropfenweise 2ml von auf 4°C gekühltem PBS unter Schwenken des 15ml-Gefäßes dazugegeben. Danach wurden 2ml FCS unter die Zellsuspension pipettiert. Nun wurde zentrifugiert (1500U/min, RT, 5min, C4-22, Jouan), der

Überstand verworfen und die Zellen noch zweimal mit jeweils 15ml Kulturmedium (10%FCS, 1% P/S) gewaschen, indem nach der Zentrifugation der Überstand verworfen wurde, die Zellen in Medium resuspendiert und danach erneut zentrifugiert wurden. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 10ml Medium (10% FCS, 1% P/S) aufgenommen, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt, die Vitalität der Zellen durch eine Trypanblau-Färbung überprüft und das 15ml-Gefäß mit den Zellen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.3.7 Restimulationen der Zelllinien

Die Zelllinien wurden 14 Tage nach der Isolierung und der ersten Stimulation restimuliert. Für diese erste Restimulation wurden die Zellen eines Ansatzes, der jeweils vier „wells“ umfasste, in einem 1,5ml konischen Reaktionsgefäß gesammelt, zentrifugiert (2500U/min=660xg, 4°C, 5min, Centrifuge 5417R, Eppendorf) und der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen eines Ansatzes in neuem Kulturmedium (5%FCS, 1% P/S) in dem 1,5ml Gefäß resuspendiert. Die Zellen wurden danach in die ihrem Ansatz entsprechenden „wells“ mit einem Füllungsvolumen von 200µl pro „well“ zurück überführt. Nun wurden die in Tabelle 1 genannten Endkonzentrationen der Antigene und Stimulanzen in den jeweiligen „wells“ wieder hergestellt. Außerdem wurde jedem „well“ 50.000 „Feeder“-Zellen hinzugefügt, die der Antigenpräsentation und Kostimulation dienen sollten. Die Notwendigkeit hierfür bestand darin, weil die Antigen-präsentierenden Zellen aus der ursprünglichen PBMC-Population im Verlauf bis zur ersten Restimulation wahrscheinlich untergegangen waren. Dem Ansatz mit Zellen ohne Antigen wurden nur „Feeder“-Zellen, aber keine der in Tabelle 1 genannten Antigene hinzugefügt.

Zur Herstellung von „Feeder“-Zellen wurden PBMC's des jeweiligen Patienten aufgetaut (siehe III. Material und Methoden, 2.3.6 Auftauen von Zellen) und mit 30Gy mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Klinische Chemie/Zentrallaboratorien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bestrahlt. Hierdurch behielten die Zellen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation,

proliferierten aber nicht mehr. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in einem 15ml-Röhrchen zentrifugiert (1500U/min, RT, 5min, Centrifuge 5417R, Eppendorf) und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in 5ml Medium (5%FCS, 1% P/S) resuspendiert, mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und deren Vitalität mittels Trypanblau-Färbung verifiziert.

Nach der Restimulation wurden die Zellen im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und an den in 2.3.3 genannten Zeitpunkten bis zur zweiten Restimulation mit IL-2 gefüttert. Am Tag 28 fand die zweite Restimulation statt. Diese wurde entsprechend der ersten Restimulation durchgeführt (s.o.), mit dem Unterschied, dass die Endkonzentration von ConA auf 3ng/µl erhöht wurde, um die Zytokinausschüttung dieser Positivkontrolle zu erhöhen. Außerdem wurde bei der zweiten Restimulation - nachdem die Zellen gewaschen, stimuliert und mit „Feeder“-Zellen versetzt waren - in jedem „well“ Brefeldin A (GolgiPlug™) in einer Konzentration von 1µl/ml eingesetzt. Dieser Protein-Transport-Inhibitor, der den Protein-Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat beeinflusst, machte die anschließende intrazelluläre Zytokinfärbung möglich. Der Ansatz ohne Antigen wurde wiederum nur mit „Feeder“-Zellen stimuliert, enthielt aber auch Brefeldin A. Nach dem Zusatz von Brefeldin A zu jedem „well“ wurden die Zellen 8 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis die extrazelluläre Färbung von Oberflächen-Antigenen der Zelllinien folgte.

2.3.8 Färbung von Oberflächen-Antigenen der Zelllinien

Die Zellen eines Ansatzes wurden jeweils in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt und zentrifugiert (2500U/min, 4°C, 5min, Centrifuge 5417R, Eppendorf). Danach wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert, wiederum zentrifugiert und danach dekantiert. Die Ansätze wurden anschließend in einem Färbevolumen von jeweils 50µl PBS pro Ansatz mit 2µl Anti-Human CD4 Antikörper (PE-Cy7; BD Biosciences) und mit 4µl Anti-Human CD8 Antikörper (PerCP; BD Biosciences) für 20min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Die ungebundenen Antikörper wurden im Anschluss ausgewaschen, indem 1ml PBS jedem Ansatz hinzugefügt, zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde.

2.3.9 Intrazelluläre Zytokinfärbung der Zelllinien

Zur Fixierung und Permeabilisierung der bereits oberflächengefärbten Zellen wurden die Zellpellets der verschiedenen Ansätze jeweils mit 250µl Cytofix/Cytoperm™ resuspendiert und für 20min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Cytofix/Cytoperm™ beinhaltet Saponin zur Permeabilisierung der Zellen, Monensin als weiteren Proteintransport-Inhibitor, der in den Transport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran eingreift, und Fetales Kälberserum (FCS). Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit jeweils 1ml Perm/Wash™ gewaschen, das zuvor im Verhältnis 1:10 mit deionisiertem H₂O verdünnt worden war. Perm/Wash™ enthält FCS und Saponin, wobei letzteres benötigt wird, um die Permeabilisierung der Zellen und damit deren Durchgängigkeit für die Antikörper während des Färbeprozesses aufrecht zu erhalten. Die intrazelluläre Zytokinfärbung erfolgte in einem Färbavolumen von jeweils 50µl Perm/Wash™ pro Ansatz mit 4µl Anti-Human IFN γ Antikörper (APC; BD Biosciences), 4µl Anti-Human TNF- α Antikörper (PE; BD Biosciences) und 6µl Anti-Human IL-17 Antikörper (FITC; eBioscience) für 30min bei 4°C in Dunkelheit. Im Anschluss wurde noch einmal mit 1ml Perm/Wash™ gewaschen. Die Ansätze wurden abschließend fixiert. Dafür wurden die Zellen in 500µl Paraformaldehyd (PFA; 4%) für 15min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und danach zweimalig mit jeweils 1ml PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und in 300µl PBS resuspendiert. Bis zur Auslesung der Zellen durch das FACS-Gerät lagerten die Proben bei 4°C in Dunkelheit.

2.3.10 Zellanalyse mittels FACS

Die gefärbten und fixierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) analysiert. Zur qualitativen und quantitativen Auswertung wurde die FACSDiva™ Software 5.0.1 (BD Biosciences) verwendet. Die Lymphozytenpopulation wurde durch eine optimale Einstellung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes (FSC = Forward Scatter und SSC = Side Scatter) ermittelt. Zur Berechnung der Autofluoreszenz wurden ungefärbte, aber mit PFA (4%) fixierte PBMCs verwendet. Die Kompensationseinstellungen wurden mit Hilfe von Färbungen von

CompBeads™ (BD Biosciences) mit den einzelnen, im jeweiligen Versuch verwendeten Antikörpern erstellt und die Kompensation von der FACSDiva™ Software 5.0.1 (BD Biosciences) berechnet. Aufgrund der relativ langen Kulturdauer von 28 Tagen und den Restimulationen mit „Feeder“-Zellen war mit viel Zelldetritus zu rechnen und deswegen wurde bei der Auslesung der Zelllinien der Schwellenwert („Threshold“) auf einen Wert von 30.000 gesetzt. Bei FACS-Analysen von TLR-stimulierten Zellen und von T_{reg} (siehe unten) wurde ein Schwellenwert von 10.000 festgelegt.

2.4 FACS-Analyse von TLR-stimulierten Zellen

2.4.1 Stimulation, Kultivierung und Restimulation von TLR-stimulierten Zellen

Die Zellen wurden analog zu den Zellen des Zelllinienversuches isoliert und kultiviert (siehe III. Material und Methoden, 2.3.1 bis 2.3.3.). Um Vergleichsmöglichkeiten für die Stimulationen mit den TLR-Liganden zu haben, wurde auch hier ein Ansatz ohne Antigen als Negativkontrolle und ein Ansatz mit ConA (Endkonzentration 3ng/μl) als Positivkontrolle durchgeführt. Jeder Ansatz eines TLR-Liganden wurde mit ConA (Endkonzentration 3ng/μl) kostimuliert, in der Annahme, dass eine alleinige Stimulation mit TLR-Liganden nicht ausreichend sei, um Unterschiede der Zelldifferenzierung und der Zytokinmuster zu induzieren. Die Endkonzentrationen der TLR-Liganden kann der Tabelle 3 (siehe unten) entnommen werden. Am dritten Tag nach der Stimulation wurden 100μl Kulturüberstand pro „well“ abgenommen, in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, um danach in einer -80°C Kühltruhe gelagert zu werden. Diese Kulturüberstände wurden für die ELISA-(Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Analyse von TLR-stimulierten Zellen (siehe III. Material und Methoden, 2.6 ELISA-Analyse von TLR-stimulierten Zellen) verwendet. Der entnommene Kulturüberstand wurde durch 100μl frisches Kulturmedium mit 20Units/ml von IL-2 ersetzt. Am 7.Tag nach der Primärstimulation wurden die Ansätze restimuliert und die extrazellulären Antigene CD4 und CD8 sowie die intrazellulären Zytokine IFN-γ, TNF-α und IL-17 angefärbt und die Zellen schließlich mittels

Durchflußzytometrie analysiert. Es wurden dabei die in 2.3.7 bis 2.3.10 beschriebenen Verfahren und die gleichen Antikörper verwendet, allerdings mit dem Unterschied, dass sowohl die Positivkontrolle als auch alle Ansätze der TLR-stimulierten Zellen allein mit ConA (Endkonzentration 3ng/μl) ohne Zusatz jeglicher TLR-Liganden restimuliert wurden. Allen Ansätzen wurden bei der Restimulation wie in 2.3.7 beschrieben „Feeder“-Zellen beigelegt.

Tabelle 3 Eingesetzte Toll-like Rezeptor-Liganden

TLR	TLR-Ligand	Ligandenstruktur	Endkonzentration
TLR2	LTA	Lipoteichonsäure	2μg/ml
TLR2	PGN-BS	Peptidoglykan	5μg/ml
TLR3	Poly(I:C)	dsRNA	25μg/ml
TLR4	LPS	Lipopolysaccharid	0,1ng/ml
TLR5	Flagellin	Flagellenprotein	2μg/ml
TLR7	Loxoribin	Guanosine	100μM
TLR8	ssPolyU	ssRNA	1μg/ml
TLR9	ODN2395	CpG-C DNA	1μM
NOD2*	MDP*	Peptidoglykan	10μg/ml

* MDP ist ein NOD2 Ligand

Das in dieser Arbeit verwendete LTA aus *Bacillus subtilis* (InvivoGen) ist ein Ligand von TLR2, wobei für LTA aus anderen Bakterienstämmen auch eine Beteiligung von TLR4 beschrieben worden ist (Takeuchi et al. 1999). Das in dieser Arbeit verwendete ODN 2395 (InvivoGen) ist eine C-Form der synthetischen Oligodinukleotide (ODN) (Roda et al. 2005).

2.5 FACS-Analyse von regulatorischen T-Zellen (T_{reg})

2.5.1 Färbung von Oberflächen-Antigenen von regulatorischen T-Zellen (T_{reg})

Aus dem Patientenblut wurden wie in 2.3.1 beschrieben die PBMCs isoliert und pro Patient drei Ansätze von je $1,2 \times 10^6$ Zellen in drei verschiedenen 1,5ml-Reaktionsgefäßen angefertigt. Diese 3 Ansätze wurden gewaschen, indem jeweils 1ml PBS zugefügt wurde und anschließend zentrifugiert (2500U/min, 4°C, 5min, Centrifuge 5417R, Eppendorf) und dekantiert wurde. Zwei Ansätze wurden in einem Färbevolumen von 50µl PBS (2% FCS) für 30min bei RT im Dunkeln mit 2µl anti-Human CD4 Antikörper (PE-Cy7; BD Biosciences) und mit 12µl anti-Human CD25 (APC; BD Biosciences) Antikörper gefärbt. Einer dieser beiden Ansätze enthielt zusätzlich 12µl anti-Human CD127 Antikörper (PE; BD Biosciences), der andere 12µl anti-Human CD39 Antikörper (PE; BD Biosciences). Der dritte Ansatz galt der optimalen Detektion der CD4+CD25+ Population bei der FACS-Analyse und wurde im Färbevolumen von 50µl PBS (2% FCS) nur mit 2µl anti-Human CD4 Antikörper (PE-Cy7; BD Biosciences) gefärbt. Die Ansätze wurden anschließend mit 1ml PBS (2% FCS) gewaschen.

2.5.2 Intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3

Die drei Ansätze (siehe oben) wurden jeweils mit 2ml Foxp3 Puffer A, der zuvor 1:10 mit deionisiertem H₂O verdünnt worden war, für 10min bei RT und in Dunkelheit fixiert. Anschließend wurde zentrifugiert (2500U/min, 4°C, 5min, Centrifuge 5417R, Eppendorf), der Überstand abgenommen und zweimal mit jeweils 1ml PBS (2%FCS) gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit 500 µl Foxp3 Puffer C für 30min bei RT in Dunkelheit permeabilisiert. Zur Herstellung von Foxp3 Puffer C wurde Foxp3 Puffer B in einem Verhältnis von 1:50 mit dem bereits 1:10 verdünnten Foxp3 Puffer A verdünnt. Danach wurden die Zellen wiederum zweimal mit jeweils 1ml PBS (2%FCS) gewaschen. Die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für den CD39-Ansatz und für den CD127-Ansatz erfolgte mit 12µl anti-Foxp3 Antikörper (Alexa Fluor 488; BD Biosciences) für 30min bei RT in Dunkelheit.

Anschließend wurde zweimalig gewaschen und die Ansätze in 300µl reinem PBS bei 4°C in Dunkelheit bis zur Auslesung am FACS-Gerät gelagert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie wie in 2.3.10 beschrieben analysiert. Für die Kompensationseinstellungen wurden abweichend $1,2 \times 10^6$ PBMCs mit Foxp3 Puffer A fixiert, um die Lymphozyten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht optimal detektieren zu können. Zur Festlegung der CD4+CD25+ Population wurde der Ansatz mit der alleinigen Färbung des Oberflächenantigens CD4 verwendet.

2.6 ELISA-Analyse von TLR-stimulierten Zellen

Die Kulturüberstände der TLR-stimulierten Zellen wurden für die ELISA-Untersuchungen wie in 2.4.1 beschrieben gewonnen. Für die ELISA-Analysen der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-21 und IL-23 wurden die Überstände aus den vier „wells“ eines Ansatzes in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt und auf Eis gelagert. Die Proben wurden für die Auswertungen der Zytokine IL-1 β und IL-6 in einer Verdünnung von 1:50 mit PBS und der Zytokine IL-21 und IL-23 in einer Verdünnung von 1:5 mit PBS eingesetzt. Die ELISA-Analysen wurden entsprechend den Protokollen der Hersteller durchgeführt (siehe III. Material und Methoden, 1.11 Puffer, Gele und Medien). Abweichend wurde bei dem IL-6-ELISA „TMB Plus Ready-to-use“ (Kem-En-Tec Diagnostics) als Substratlösung verwendet. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 450nm ausgelesen (Auslesegerät: „Opsys MRX TC II“, Dynex Technologie GmbH).

2.7 Statistische Auswertung

Zur Signifikanztestung wurde mit Hilfe der Software „GraphPad Prism 5.02“ der Mann-Whitney-Test mit einem 95%-Konfidenzintervall angewendet und der p-Wert berechnet. Signifikanztestungen wurden zwischen allen untersuchten Patientenkollektiven durchgeführt. In den Grafiken des Ergebnisteils werden zugunsten der Übersicht nur signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) dargestellt.

IV. Ergebnisse

1. Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen im Mausmodell

Zunächst sollte durch Transferversuche geklärt werden, ob das Fehlen von IL-10 in IL-10 ^{-/-} Mäusen bei der primären Aktivierung von Abwehrzellen oder bei ihren Effektorfunktionen die Suszeptibilität für eine Hepatitis bewirkt.

Hierzu wurden beim Transferversuch 1 die Lymphknotenzellen aus WT Mäusen oder IL-10 ^{-/-} Mäusen ausschließlich mit SLA/CFA stimuliert und dann in gesunde WT Mäuse oder IL-10 ^{-/-} Mäuse transferiert. Der genaue Versuchsaufbau ist in der Grafik 1.3 im Abschnitt 2.2.1 des Kapitels „Material und Methoden“ dieser Arbeit beschrieben. Beim Transferversuch 2 wurden die Lymphknotenzellen entweder mit SLA/CFA oder als Negativkontrolle mit PBS/CFA stimuliert und dann in eine gesunde Maus des genetischen Hintergrundes transferiert, auf dem sie vorher stimuliert worden waren (siehe Grafik 1.4 in III. Material und Methoden, 2.2.1 Transfer von SLA/LP-stimulierten Lymphknotenzellen)

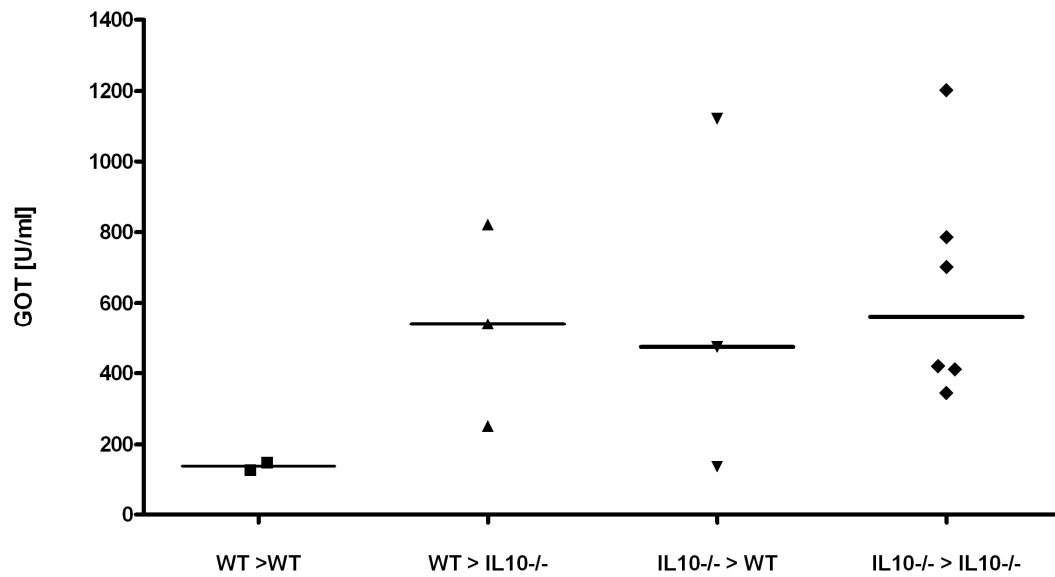
Die Grafiken 2.1 bis 2.4 zeigen die Transaminasenmessungen für die Transferversuche 1 und 2 zur Induktion einer Hepatitis im Mausmodell. Die höchsten Werte der Transaminasen wurden im Transferversuch 1 erreicht, wenn die mit SLA/CFA stimulierten Lymphknotenzellen aus IL-10 ^{-/-} Mäusen generiert und wieder in gesunde IL-10 ^{-/-} Mäuse transferiert wurden (siehe Grafik 2.1 bis 2.2). Es wurden dabei im Median für die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) Werte von circa 550 Units/Milliliter und für die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) Werte von circa 120 Units/Milliliter erreicht. Im Vergleich dazu ergaben sich Werte von circa 140 Units/Milliliter für die GOT und von circa 35 Units/Milliliter für die GPT, wenn die Lymphknotenzellen in Wildtyp-Tieren mit SLA/CFA aktiviert und auch wieder in Wildtyp-Mäuse transferiert wurden. Diese Beobachtungen der vom Mausstamm abhängigen Unterschiede der Transaminasen konnten nicht im Transferversuch 2 reproduziert werden (siehe Grafik 2.3 bis 2.4). Weiterhin konnten im Transferversuch 2 anhand der Transaminasen keine Unterschiede zwischen der Negativkontrolle ohne SLA/LP und der Stimulation mit SLA/LP ausgemacht werden.

Die Grafik 2.5 zeigt die histologischen Aufarbeitungen der Lebern der Transferversuche 1 und 2. In den Histologien des Transferversuchs 1 konnten vor allem dann eingewanderte Entzündungszellen registriert werden, wenn die mit SLA/CFA stimulierten Zellen aus dem IL-10 ^{-/-} Hintergrund stammten und auch wieder in eine IL-10 ^{-/-} Maus transferiert wurden (siehe Bild A und B der Grafik 2.5). Wurden die Zellen aus einer SLA/LP-immunisierten IL 10^{-/-} Maus isoliert und danach in eine WT Maus überführt, konnten weniger und im Ausmaß geringere Infiltrate festgestellt werden (nicht dargestellt). Die Immunisierung eines Wildtyp-Tieres führte sowohl nach dem Transfer in eine WT-Maus als auch in eine IL-10 ^{-/-} Maus zu keinen entzündlichen Zelleinwanderungen (nicht dargestellt). Der IL-10 ^{-/-} Phänotyp scheint somit vorrangig Einfluß auf die primäre Aktivierung von Abwehrzellen gegenüber SLA/LP zu haben.

Diese Beobachtungen konnten durch den Transferversuch 2 bestätigt werden, da Zellen aus Wildtyp-Mäusen, die mit PBS/CFA (siehe Bild C der Grafik 2.5) oder mit SLA/CFA (siehe Bild D der Grafik 2.5) stimuliert wurden, nach dem Transfer keine Hepatitis induziert haben. Auch der genetische Hintergrund der IL-10 ^{-/-} Mäuse war für sich allein genommen keine Prädisposition für eine Entzündung der Leber (siehe Bild E der Grafik 2.5). Ausschließlich die Immunisierung von Lymphknotenzellen mit SLA/CFA auf dem genetischen Hintergrund der IL-10 ^{-/-} Mäuse konnte nach dem Transfer eine Hepatitis induzieren (siehe Bild F bis G der Grafik 2.5).

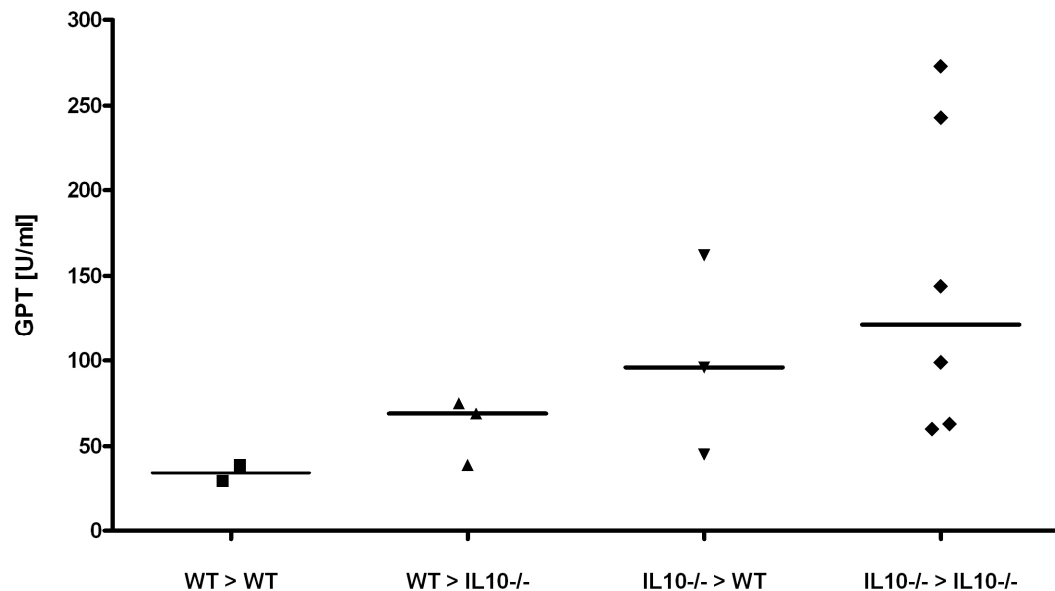
Grafik 2.1

Serumwerte von GOT bei Transfer-Versuch 1



Grafik 2.2

Serumwerte von GPT bei Transfer-Versuch 1



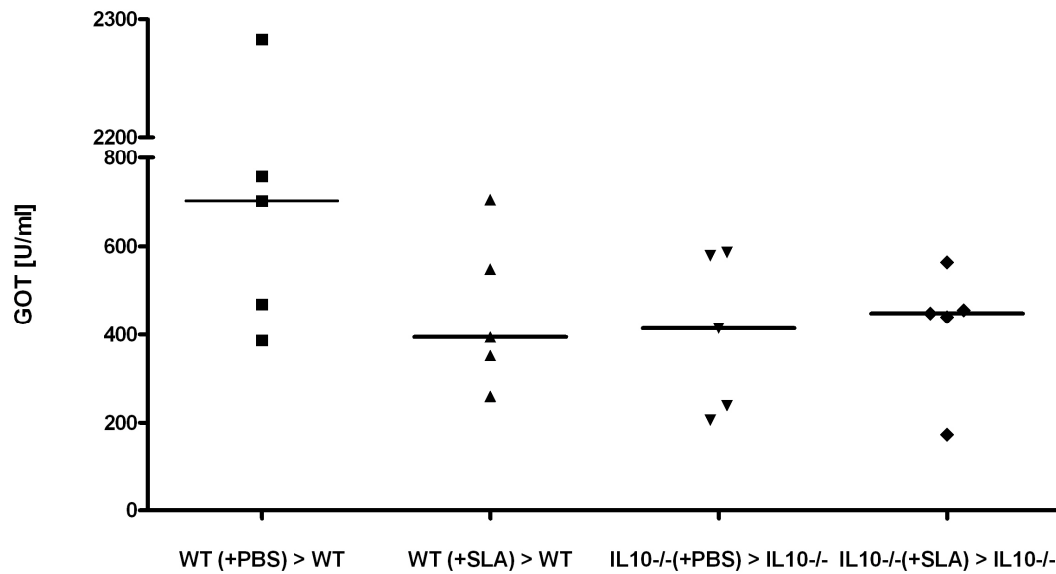
Beispiel: WT > IL10^{-/-} = Zellen aus einer WT-Maus wurden mit SLA/CFA (im Transferversuch 1 wurde ausschließlich SLA/CFA als Stimulans verwendet) stimuliert und danach in eine IL-10^{-/-}-Maus transferiert; horizontaler Balken = Median

GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

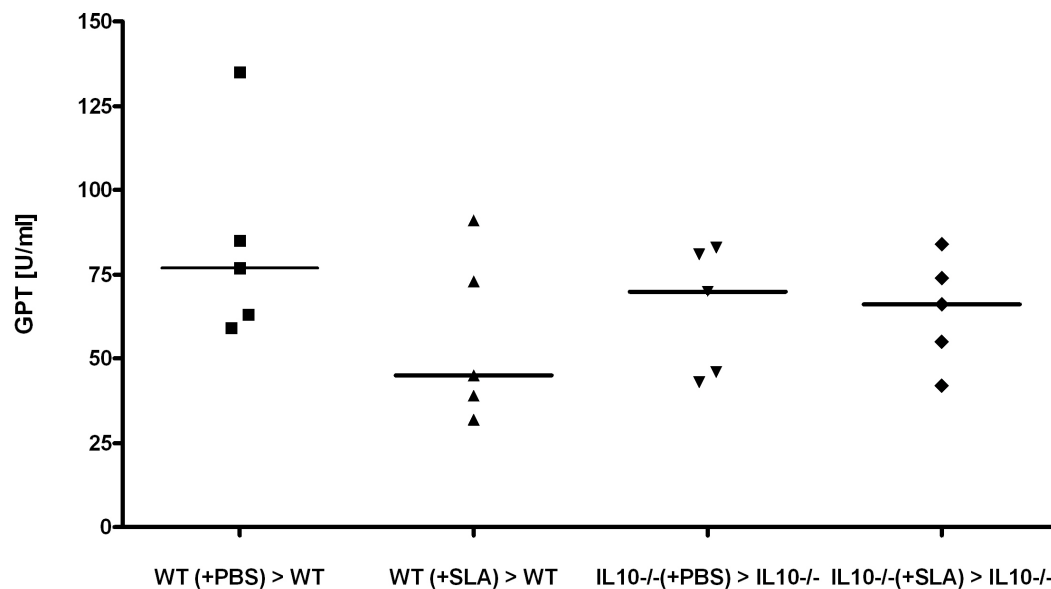
GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase

U/ml = Units/Milliliter

Grafik 2.3 Serumwerte von GOT bei Transfer-Versuch 2



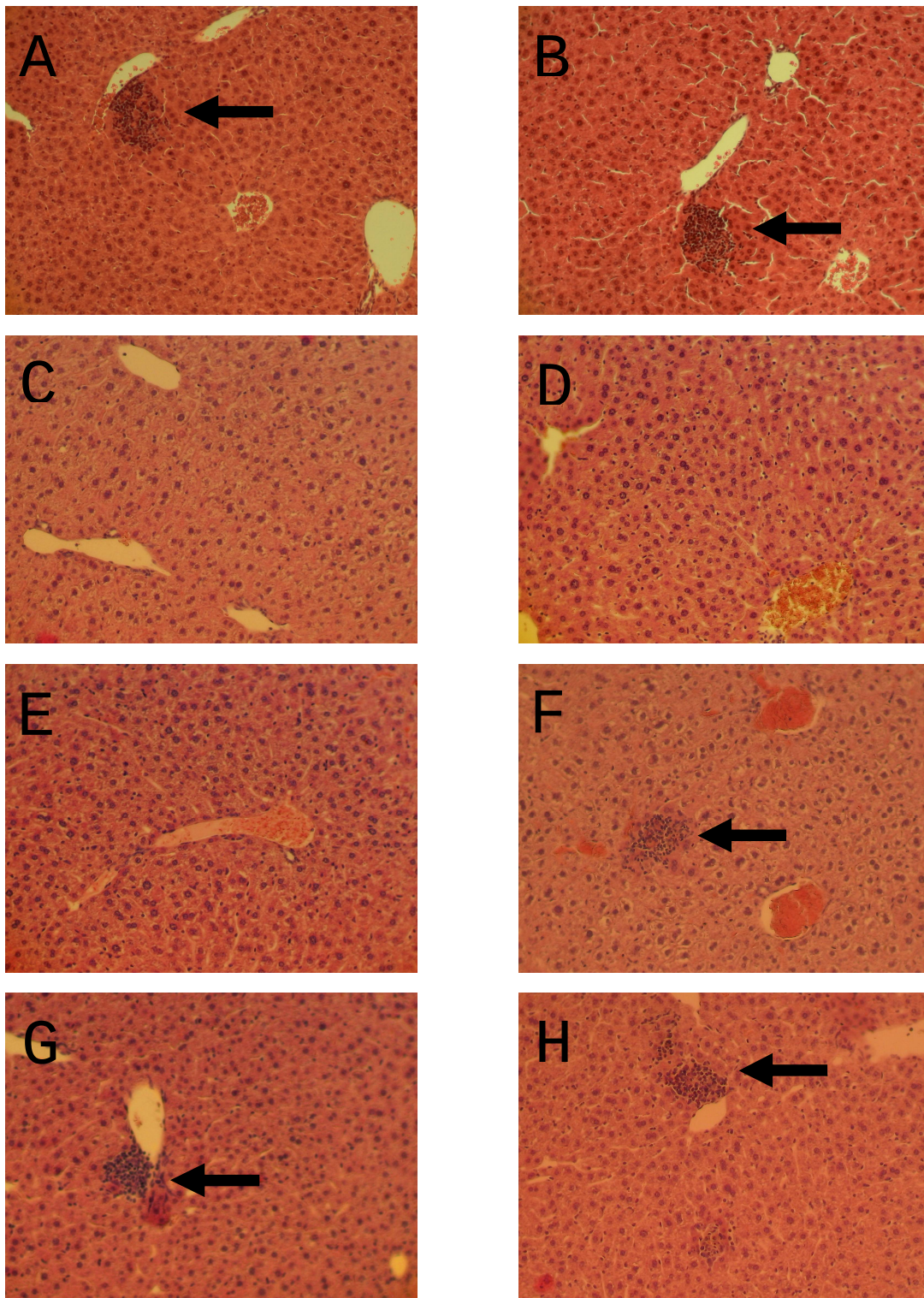
Grafik 2.4 Serumwerte von GPT bei Transfer-Versuch 2



Beispiel: WT(+PBS) > WT = Zellen aus einer WT-Maus wurden mit PBS/CFA stimuliert und danach in eine WT Maus transferiert; horizontaler Balken = Median
 GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
 GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase
 U/ml = Units/Milliliter

Grafik 2.5

Histologien der Transferversuche



Transferversuch 1

Bild A und B: IL10^{-/-} → IL10^{-/-} (Die Zellen aus einer IL10^{-/-} Maus wurden mit SLA/CFA stimuliert und in eine gesunde IL10^{-/-} Maus transferiert)

Transferversuch 2

Bild C: WT(+PBS) → WT (Die Zellen einer WT Maus wurden mit PBS/CFA stimuliert und in eine gesunde WT Maus transferiert)

Bild D: WT(+SLA) → WT

Bild E: IL10^{-/-} (+PBS) → IL10^{-/-}

Bild F bis G: IL 10^{-/-} (+SLA) → IL10^{-/-}

Die Pfeile in den Bildern markieren die entzündlichen Zellinfiltrate

2. Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die unten aufgeführte Tabelle 4 charakterisiert durch klinische und laborchemische Parameter das Patientenkollektiv der AIH-Patienten und die Kontrollgruppen aller Versuche dieser Arbeit.

Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität der Autoimmunen Hepatitis wurden die Laborparameter IgG und die Serumtransaminase GPT ermittelt. Lüth und Lohse (2006) zeigten, dass sich IgG und GPT als komplementäre Serummarker im Krankheitsverlauf der AIH eignen und gut mit der histologischen Aktivität korrelieren. 24 der 45 AIH-Patienten (circa 53%) wiesen eine GPT über dem Referenzbereich auf und wurden als krankheitsaktive Patienten angesehen. 18 der 45 AIH-Patienten (40%) waren im Rahmen einer Erstdiagnose therapienaiv und wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch nicht immunsuppressiv behandelt.

Circa 69% der AIH-Patienten, circa 46% der Gesunden, 100% der PBC-Patienten und 20% der PSC-Patienten gehörten dem weiblichen Geschlecht an.

Zwei der AIH-Patienten (circa 4,5%) waren positiv für LKM-1-Antikörper. Bei diesen LKM-1-positiven AIH-Patienten ließen sich keine weiteren der untersuchten Antikörper detektieren. 31 AIH-Patienten (ca. 70%) waren positiv für ANA, 25 AIH-Patienten (ca. 57%) wiesen Antikörper gegen SMA auf und 5 AIH-Patienten (ca. 11%) zeigten einen positiven Antikörperstatus für SLA/LP.

Tabelle 4 Patientenkollektiv

Diagnose	Anzahl	Geschlecht [w/m]	Alter [Jahre]	GPT* [U/l]	AP** [U/l]
AIH	45	31/14	54 (18-78)	40,5 (11-619)	n.u.
Gesund	28	13/15	29 (22-70)	n.u.	n.u.
PBC	11	11/0	55 (36-67)	37 (17-104)	105,5 (45-291)
PSC	15	3/12	40 (18-56)	73 (18-312)	216 (61-536)

Diagnose	IgG*** [g/l]	ANA°	SMA°°	SLA/LP +	SLA/LP°°° [RE/ml]
AIH	13,33 (6,05-47,62)	1:640 (1:80-1:10.000)	1:320 (1:40-1:2560)	5	>200

Referenzbereiche:

- * 10-35 U/l
- ** 35-104 U/l
- *** 7-16 g/l
- ° < 1:80 (Titer)
- °° < 1:80 (Titer)
- °°° < 20 RE/ml

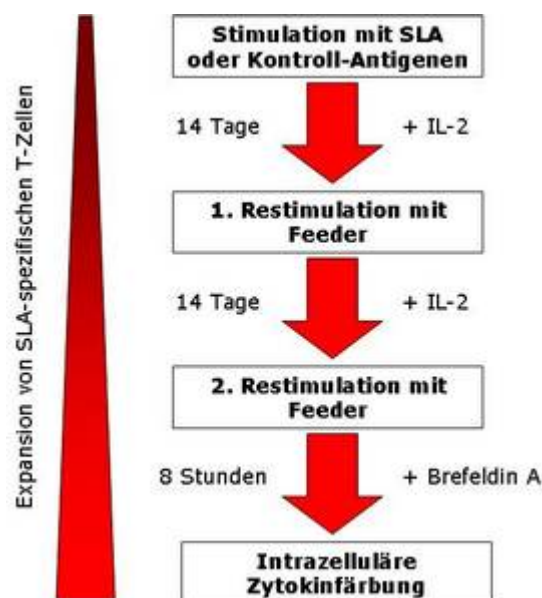
In eckigen Klammern wird die Maßeinheit angegeben. In runden Klammern ist die Spannweite der Werte aufgeführt. Das Alter der Probanden bezieht sich auf den Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Werte für die Parameter Alter, GPT, AP, IgG, ANA, SMA und SLA/LP stellen die Mediane des jeweiligen Patientenkollektivs dar. In die Berechnung der Mediane und der Spannweiten der Titer der Autoantikörper ANA und SMA gingen nur die Patienten ein, die einen positiven Antikörperstatus aufzeigten. Fünf Patienten der gesamten AIH-Gruppe wiesen Autoantikörper gegen SLA/LP auf. Für einen AIH-Patienten ließ sich kein Wert für die GPT und bei einem PBC-Patienten kein Wert für die AP zum Zeitpunkt der Blutentnahme ermitteln. Bei einem AIH-Patienten konnte nicht zurückverfolgt werden, welches Antikörperprofil zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorlag und somit berechnen sich die Mediane der Autoantikörper aus den 44 AIH-Patienten, von denen die Laborparameter bekannt waren.

SLA/LP + = Anzahl der AIH-Patienten, die positiv für Antikörper gegen SLA/LP waren
Geschlecht [w/m] = weiblich/männlich
U/l = Units pro Liter
RE/ml = Relative Einheiten pro Milliliter
n.u. = nicht untersucht

3. Analyse von SLA/LP-spezifischen Zelllinien

Anhand peripherer Blutlymphozyten von AIH-Patienten sollte untersucht werden, ob eine verstärkte Th17-Differenzierung von SLA/LP-spezifischen T-Zellen vorliegt, wie dies in den Mausmodellen der laborinternen Vorarbeiten gefunden wurde. Da von einer geringen Frequenz SLA/LP-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut auszugehen war, wurden mehrere Restimulationen mit dem SLA/LP-Protein oder den Peptiden des SLA/LP-Moleküls durchgeführt, um diese Zellpopulation zu expandieren. Der zu bestimmten Zeitpunkten erforderliche Einsatz von IL-2 und von Feeder-Zellen zur Antigenpräsentation orientierte sich an etablierten Modellen zur in-vitro-Kultivierung antigenspezifischer T-Zellen (Dooms und Abbas 2006, Wherry et al. 2003, Obst et al. 2005). Mit Hilfe von Färbungen von Oberflächen-Antigenen und von intrazellulären Zytokinen und anschließenden FACS-Analysen sollten die SLA/LP-spezifischen T-Zellen charakterisiert werden (siehe Grafik 3.1).

Grafik 3.1 **Versuchsablauf von SLA/LP-spezifischen Zelllinien**



Die Grafik 3.2 zeigt beispielhaft die FACS-Analyse eines SLA/LP-positiven AIH-Patienten. Die Lymphozytenpopulation wurden anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes (FSC und SSC) detektiert und anhand der Oberflächen-

antigene CD4 und CD8 aufgetrennt. Anschließend wurden die intrazellulären Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-17 untersucht. Beispielsweise lag der Anteil der IFN- γ -positiven Zellen an der CD4+ Zellpopulation (siehe Quadrant „Q1“ der Grafik 3.2) für die Stimulation mit der Negativkontrolle HCV-Peptid bei 0,5%, für die Positivkontrolle CMV-Peptid bei 5,2% und für die SLA/LP-Peptide SLA1 und SLA2 bei 4,0% und bei 2,6%.

Die Produktion der oben genannten Zytokine der CD4+ und CD8+ Zellen wurde unter den verschiedenen Patientenkollektiven (AIH-Patienten, gesunde Probanden, PBC-Patienten) verglichen. Es wurden im arithmetischen Mittel aller Probanden dieses Versuches 37.674 Leukozyten ausgelesen. Die Grafiken 3.3 bis 3.10 fassen die Ergebnisse der Zelllinienversuche zusammen. Die statistische Auswertung folgt in den Grafiken 3.11 bis 3.13. Die Grafiken 3.14 bis 3.17 konzentrieren sich auf die Analyse von IL-17 positiven Zellen.

Es zeigte sich, dass keine signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientenpopulationen für TNF- α -positive oder IL-17-positive Zellen festzustellen waren, sowohl für CD4+ als auch CD8+ T-Zellen (siehe Grafik 3.3 bis 3.6). Dies galt für SLA/LP-positive und SLA/LP-negative AIH-Patienten. Allgemein war die Expression von TNF- α oder IL-17 der CD4+ und CD8+ T-Zellen als Reaktion auf die verschiedenen Formen des SLA/LP gering und betrug jeweils im Median unter 0,5% der Ausgangspopulation. Signifikante Unterschiede ergaben sich nur für IFN- γ -positive CD4+ oder CD8+ Zellen, die in den Grafiken 3.7 bis 3.10 in Verhältnis zu den Positiv- und Negativkontrollen gesetzt wurden. Dabei zeichnete sich ein Trend für SLA/LP-positiven AIH-Patienten ab, da bei Ihnen der Anteil der IFN- γ -positiven Zellen an den CD4+ oder CD8+ T-Zellen teilweise Werte von 5% bis 10% der Ausgangspopulation annahm und damit den Median der CMV-Positivkontrolle (circa 4% IFN- γ -positive Zellen der CD4+ T-Zellen) übertraf.

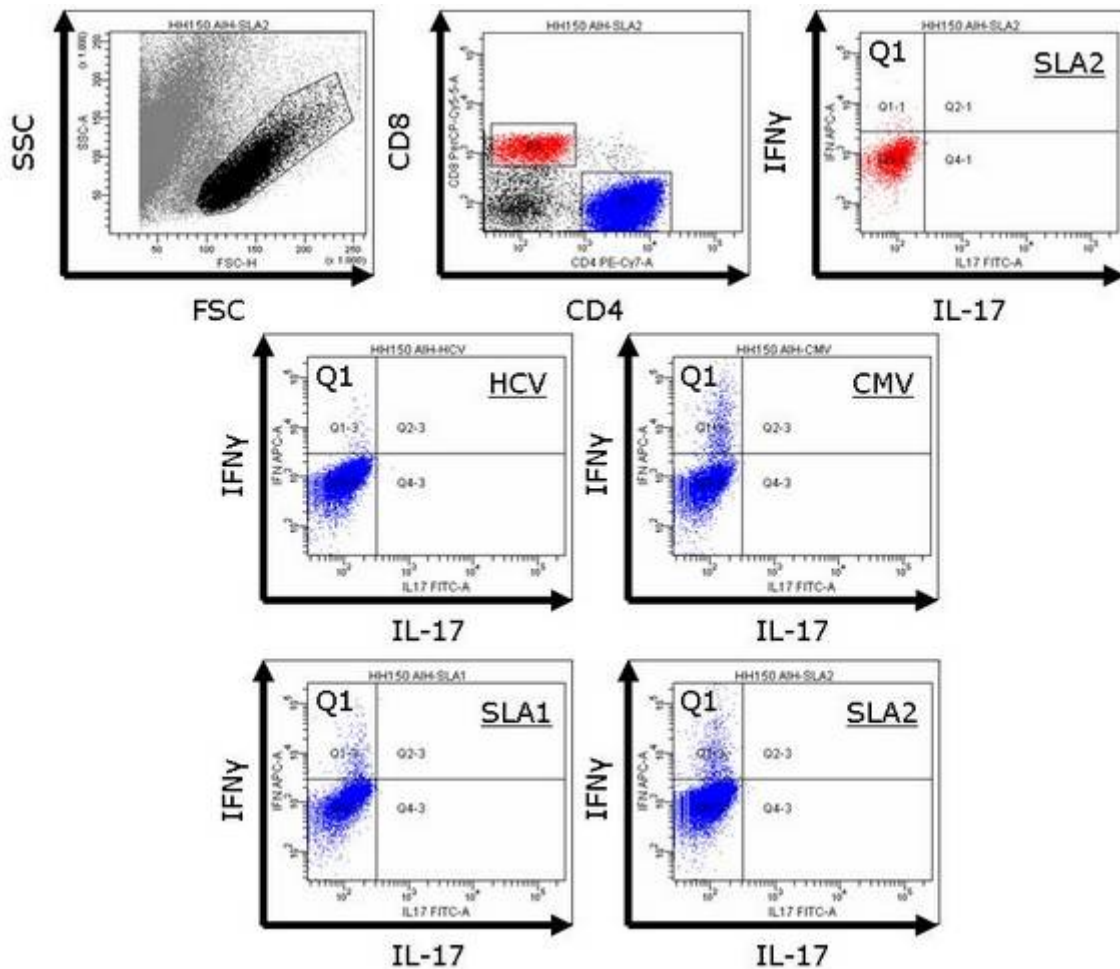
Die statistische Auswertung der Zelllinienversuche (Grafiken 3.11 bis 3.13) zeigte signifikante Unterschiede für den Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen an den CD4+ T-Zellen zwischen SLA/LP-positiven AIH-Patienten und gesunden Probanden bei der Stimulation mit dem SLA/LP-Protein ($p=0,008$; siehe Grafik 3.11) und beim SLA1 Peptid zwischen SLA/LP-positiven und SLA/LP-negativen AIH-Patienten ($p=0,0323$; siehe Grafik 3.12). Das Antigen SLA2 Peptid führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der statistischen

Auswertung (nicht dargestellt). Für den Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen an den CD8⁺ T-Zellen bei der Stimulation mit SLA/LP-Protein ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen SLA/LP-positiven AIH-Patienten und gesunden Probanden ($p=0,0303$; siehe Grafik 3.13).

Hinsichtlich einer Th17-Differenzierung als Reaktion auf die Präsentation von SLA/LP zeigten sich für IL-17+CD4⁺ Zellen keine signifikanten Unterschiede (siehe beispielsweise Grafik 3.4). Es sind aber Tendenzen für IL-17+CD8⁺ Zellen festzuhalten. Die Grafik 3.14 stellt die FACS-Analyse eines SLA/LP-negativen, unbehandelten AIH-Patienten dar, bei dem nach der Stimulation mit SLA1 Peptid der Anteil der IL-17-positiven Zellen an der CD8⁺ Population (siehe rechter unterer Quadrant „Q4“ der Grafik 3.14) 1,1% betrug. Die Grafiken 3.15 bis 3.17 zeigen, dass diese Population der IL-17+CD8⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit den SLA/LP-Peptiden SLA1 und SLA2 geringgradig vermehrt bei therapienaiven AIH-Patienten ausgeprägt war und nicht mit einem positiven SLA/LP-Antikörper-Status korrelierte. Der Anteil der IL-17-positiven Zellen an der Ausgangspopulation betrug hierbei circa 0,5%. Nach der Stimulation mit SLA/LP Protein hingegen überwogen geringgradig die IL-17+CD8⁺ T-Zellen der therapierten AIH-Patienten. Es ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zu den Vergleichsgruppen. Es muss betont werden, dass sich unter den untersuchten AIH-Patienten kein Proband befand, der therapienaiv war und gleichzeitig SLA/LP-Autoantikörper aufzeigte.

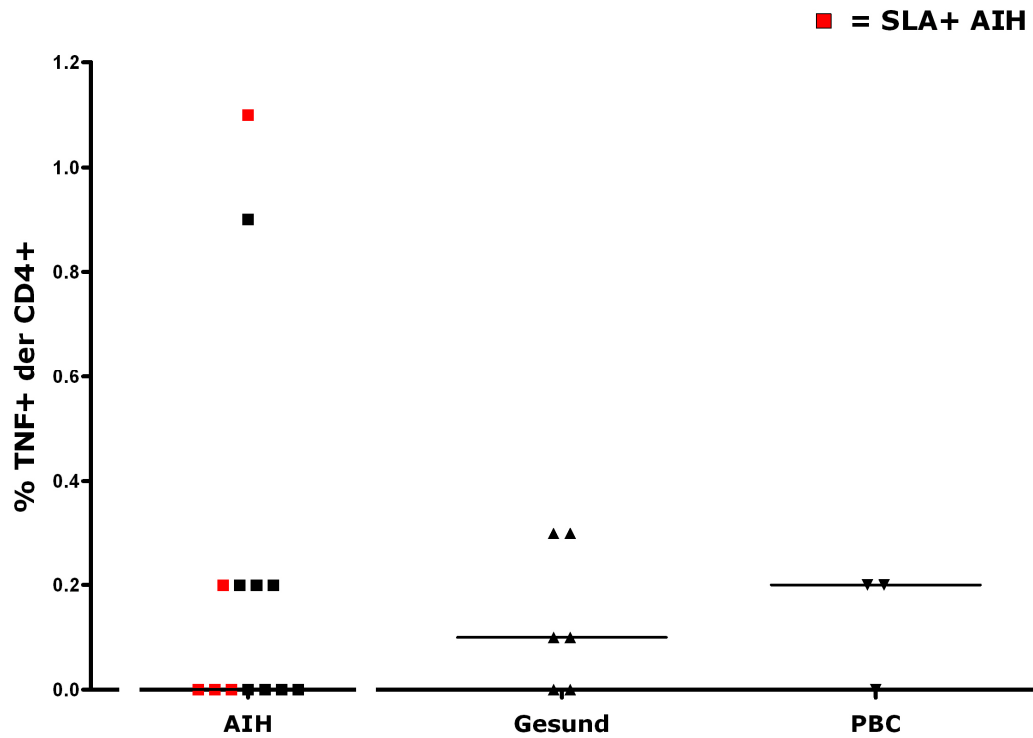
Grafik 3.2

Beispiel von FACS-Analysen der Zelllinien

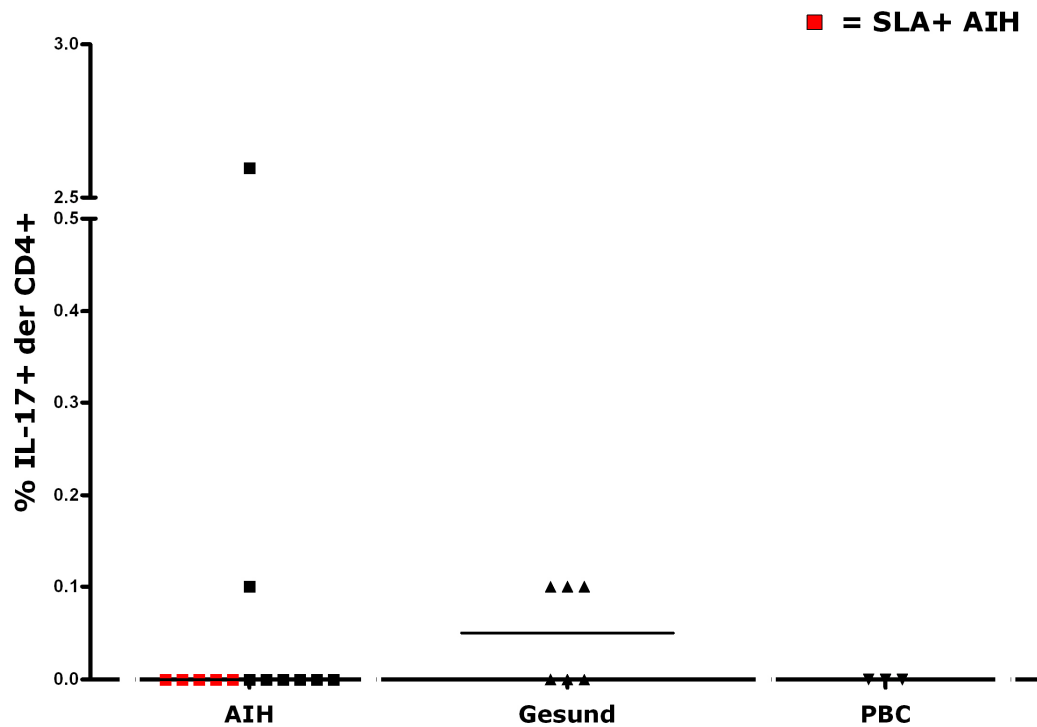


Schwarz gefärbte Zellen = Lymphozyten; Rot gefärbte Zellpopulation = CD8 positive Zellen; Blau gefärbte Zellpopulation = CD4 positive Zellen; SLA1 = Stimulation mit SLA1 Peptid; SLA2 = Stimulation mit SLA2 Peptid; HCV = Stimulation mit Hepatitis-C-Virus-(HCV-)Peptid als Negativkontrolle; CMV = Stimulation mit Cytomegalievirus-(CMV-)Peptid als Positivkontrolle; FSC = Forward Scatter = Vorwärtsstreulicht; SSC = Side Scatter = Seitwärtsstreulicht; IL-17 = Interleukin-17; IFNγ = Interferon γ; Q1 = Quadrant 1

TNF- α +CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation



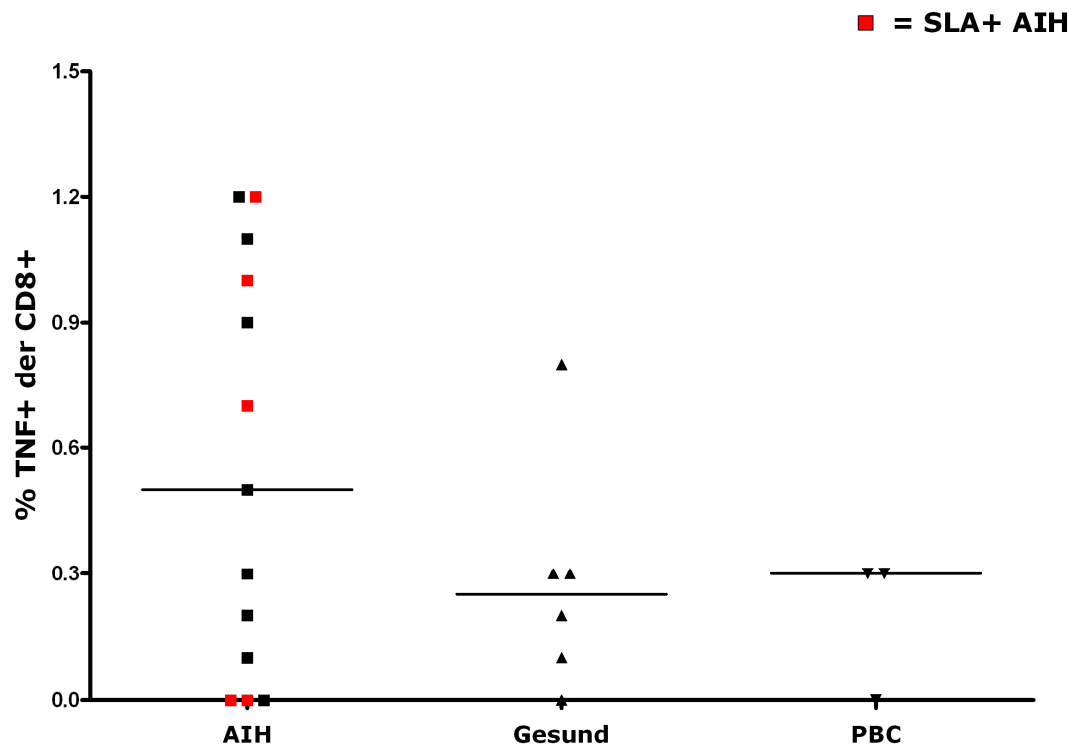
IL-17+CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation



%TNF+ = prozentualer Anteil der TNF-a-positiven Zellen; SLA+ AIH (rote Koordinatenpunkte) = AIH-Patienten, die positiv für SLA/LP-Antikörper sind; horizontaler Balken = Median

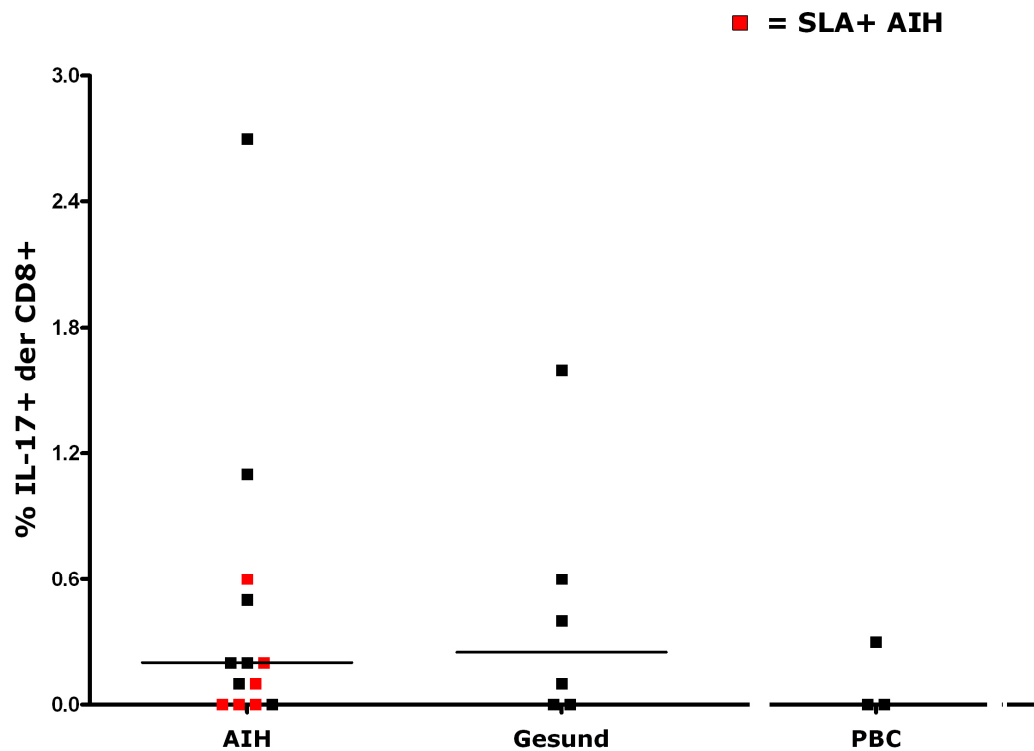
Grafik 3.5

TNF-a+CD8+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation



Grafik 3.6

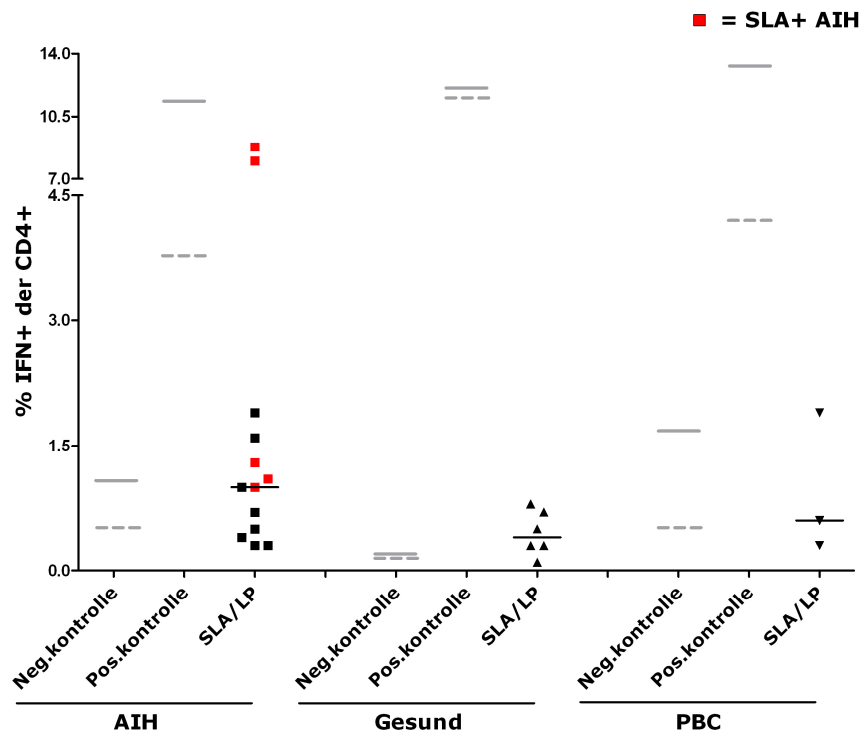
IL-17+CD8+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation



%TNF+ = prozentualer Anteil der TNF-a-positiven Zellen; SLA+ AIH (rote Koordinatenpunkte) = AIH-Patienten, die positiv für SLA/LP-Antikörper sind; horizontaler Balken = Median

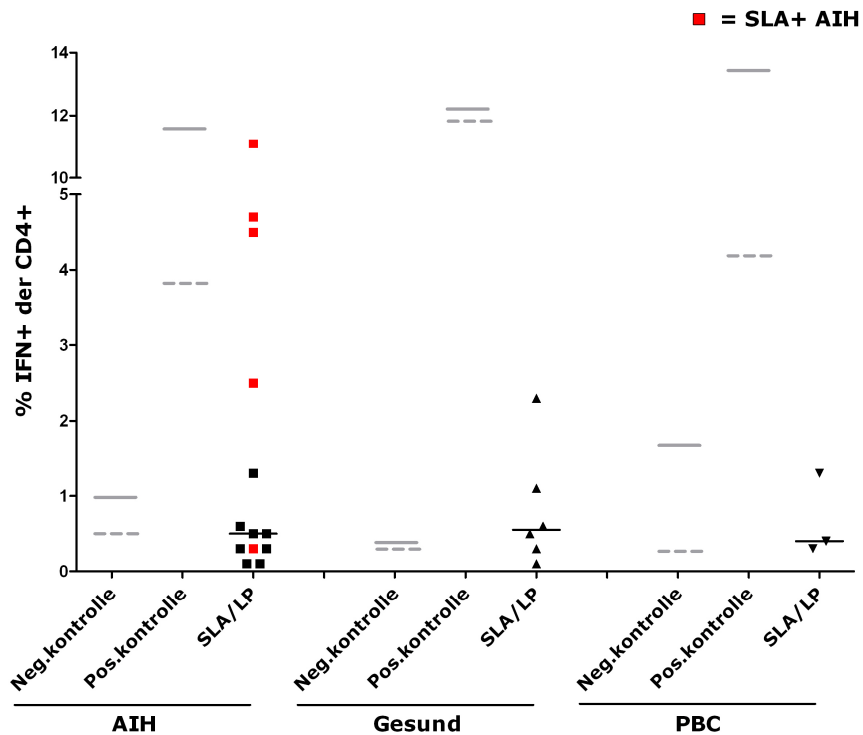
Grafik 3.7

IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation



Grafik 3.8

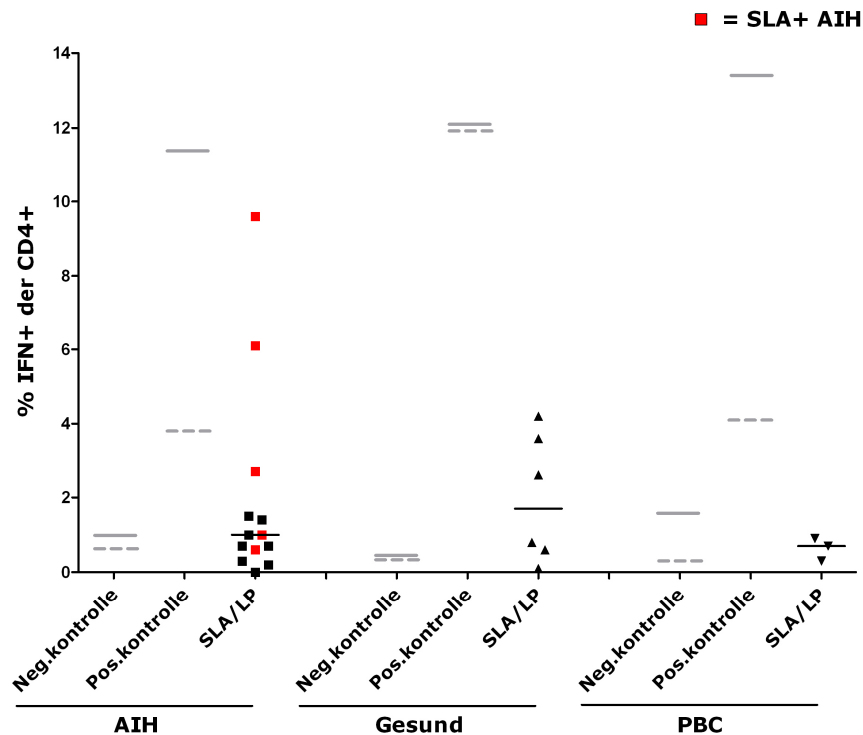
IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation



Neg.kontrolle = Negativkontrolle; Darstellung der Mediane als graue Balken; gestrichelter Balken = Zellkultur ohne Antigen; durchgezogener Balken = Zellkultur mit HCV-Peptid;
Pos.kontrolle = Positivkontrolle; Darstellung der Mediane als graue Balken; gestrichelter Balken = Zellkultur mit CMV-Peptid; durchgezogener Balken = Zellkultur mit ConA
 %IFN+ = prozentualer Anteil der Interferon- γ -positiven Zellen; SLA+ AIH (rote Koordinatenpunkte) = AIH-Patienten, die positiv für SLA/LP-Antikörper sind

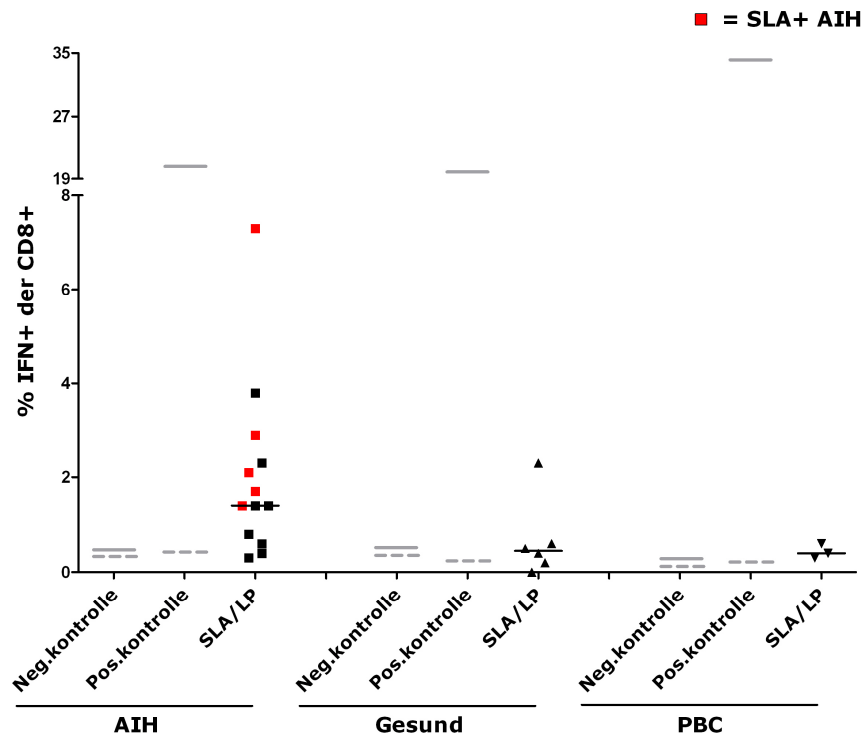
Grafik 3.9

IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA2 Peptid-Stimulation



Grafik 3.10

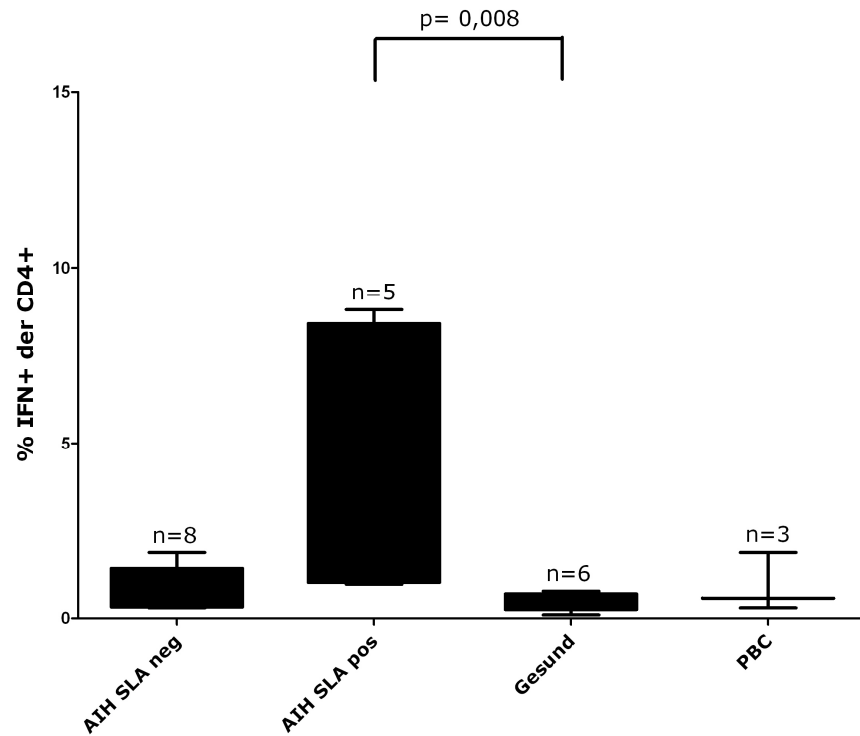
IFN+CD8+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation



Neg.kontrolle = Negativkontrolle; Darstellung der Mediane als graue Balken; gestrichelter Balken = Zellkultur ohne Antigen; durchgezogener Balken = Zellkultur mit HCV-Peptid;
Pos.kontrolle = Positivkontrolle; Darstellung der Mediane als graue Balken; gestrichelter Balken = Zellkultur mit CMV-Peptid; durchgezogener Balken = Zellkultur mit ConA
 %IFN+ = prozentualer Anteil der Interferon- γ -positiven Zellen; SLA+ AIH (rote Koordinatenpunkte) = AIH-Patienten, die positiv für SLA/LP-Antikörper sind

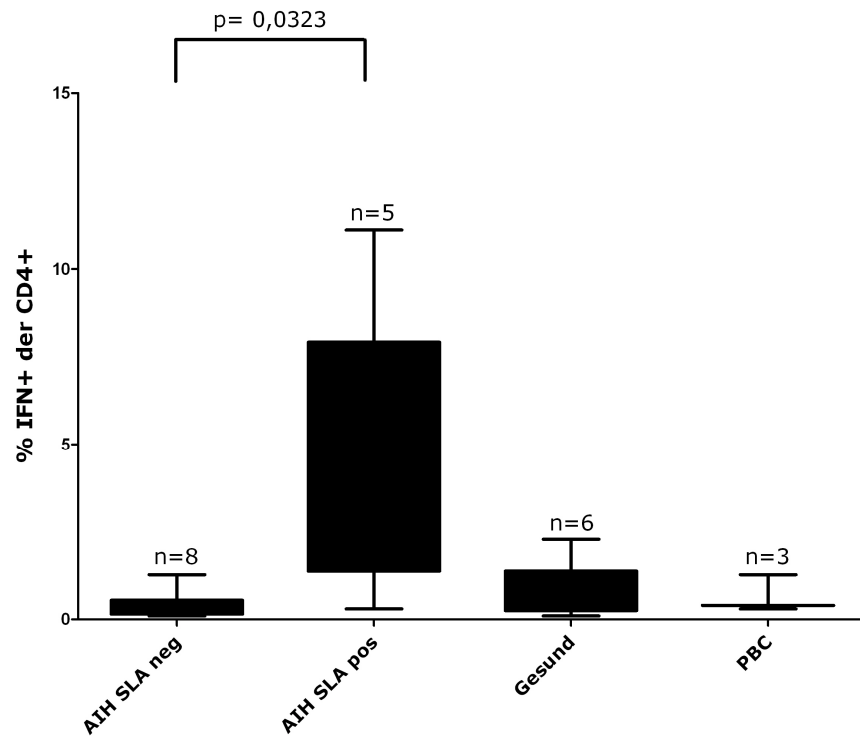
Grafik 3.11

IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation



Grafik 3.12

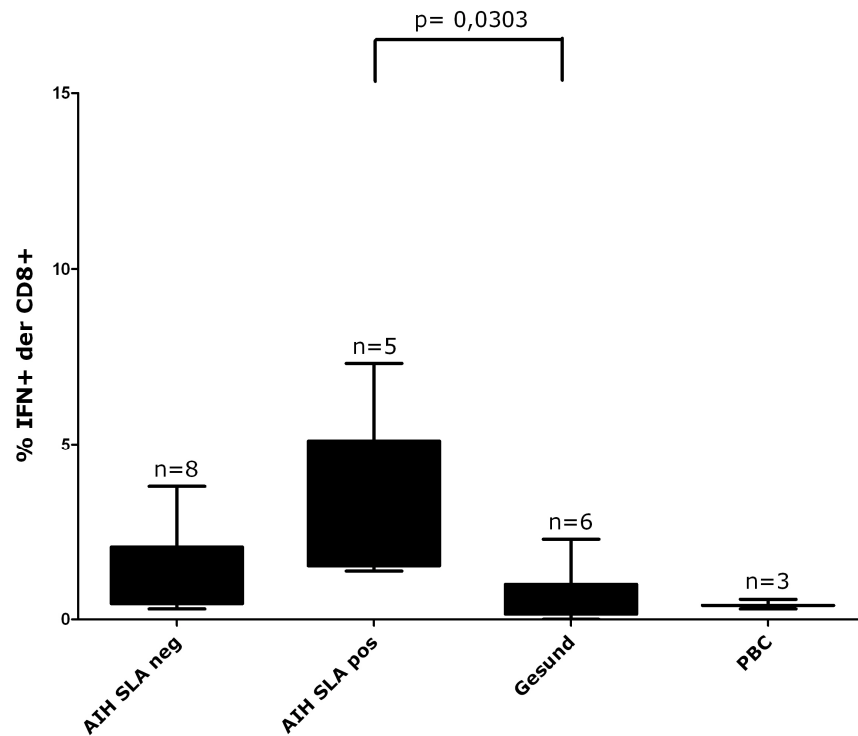
IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation



AIH SLA neg/pos = AIH-Patienten, die negativ/positiv für SLA/LP-Antikörper sind; IFN+ = prozentualer Anteil der Interferon- γ -positiven Zellen; n = Anzahl der Patienten/Probanden; p = p-Wert der statistischen Signifikanztestung

Grafik 3.13

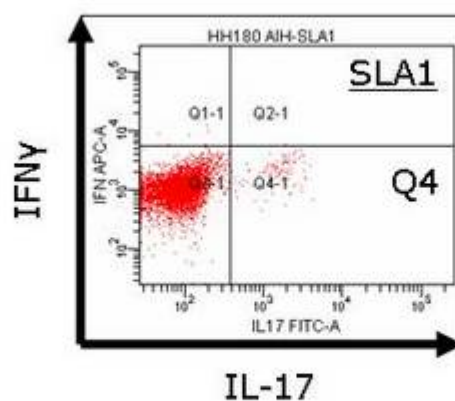
IFN+CD8+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation



AIH SLA neg/pos = AIH-Patienten, die negativ/positiv für SLA/LP-Antikörper sind; IFN+ = prozentualer Anteil der Interferon- γ -positiven Zellen; n = Anzahl der Patienten/Probanden; p = p-Wert der statistischen Signifikanztestung

Grafik 3.14

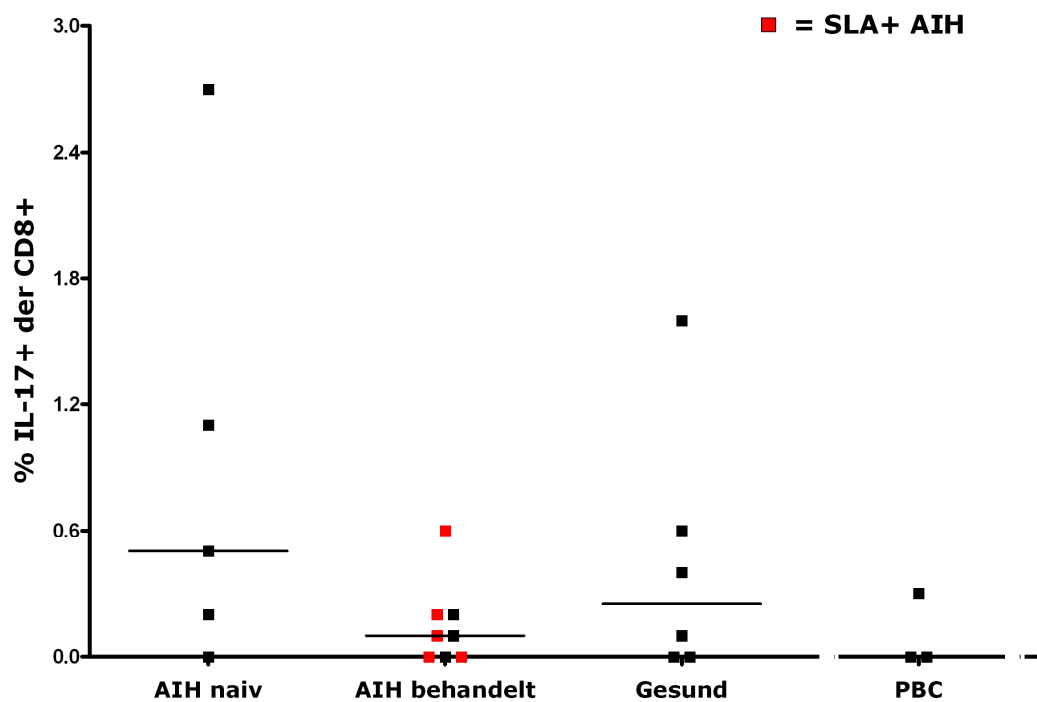
Beispiel von IL-17+CD8+ T-Zellen der Zelllinien



Rot gefärbte Zellpopulation = CD8 positive Zellen; SLA1 = Stimulation mit SLA1 Peptid; IL-17 = Interleukin-17; IFN γ = Interferon γ ; Q4 = Quadrant 4

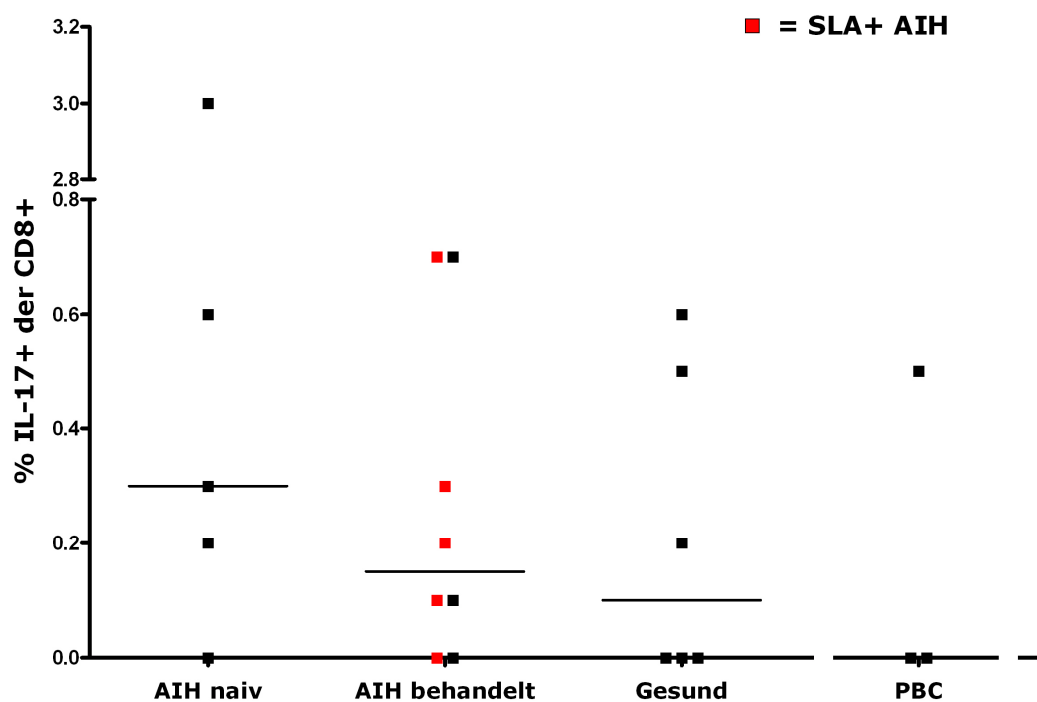
Grafik 3.15

IL-17+CD8+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation



Grafik 3.16

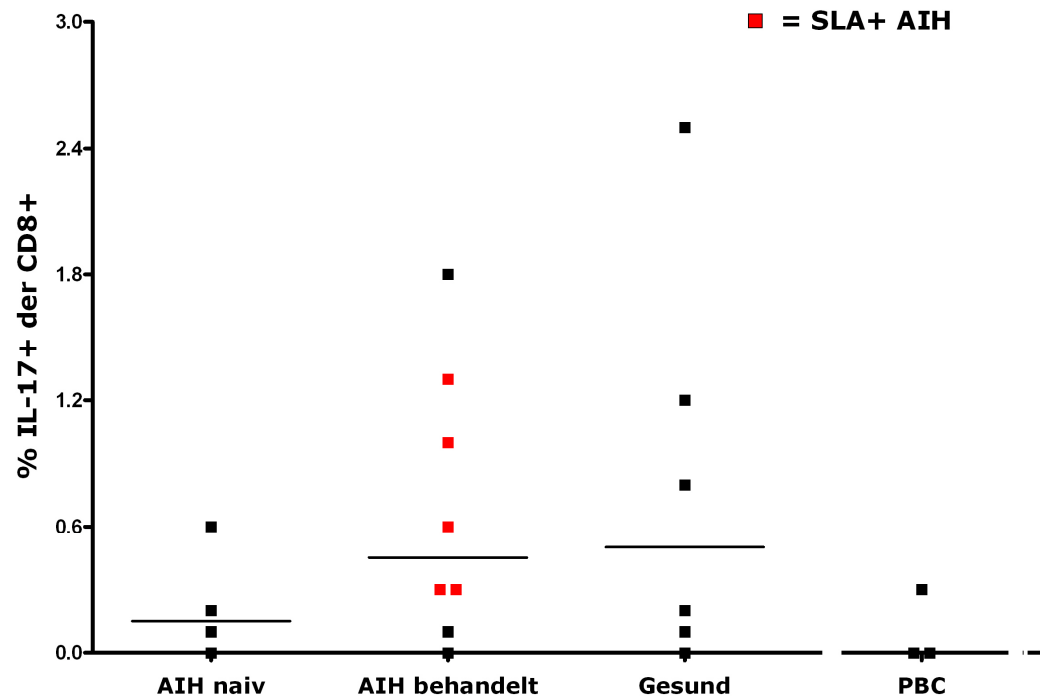
CD8+IL-17+ Zelllinien nach SLA2 Peptid-Stimulation



AIH naiv = unbehandelte AIH-Patienten; AIH behandelt = immunsuppressiv-therapierte AIH-Patienten; IL-17+ = prozentualer Anteil der Interleukin-17-positiven Zellen; SLA+ AIH (rote Koordinatenpunkte) = AIH-Patienten, die positiv für SLA/LP-Antikörper sind; horizontaler Balken = Median

Grafik 3.17

CD8+IL-17+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation



AIH naiv = unbehandelte AIH-Patienten; AIH behandelt = immunsuppressiv-therapierte AIH-Patienten; IL-17+ = prozentualer Anteil der Interleukin-17-positiven Zellen; SLA+ AIH (rote Koordinatenpunkte) = AIH-Patienten, die positiv für SLA/LP-Antikörper sind; horizontaler Balken = Median

4. Analyse von peripheren regulatorischen T-Zellen

Um eine Beteiligung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) an den pathogenetischen Mechanismen der Autoimmunen Hepatitis zu überprüfen, wurde ihre Frequenz im peripheren Blut anhand verschiedener Zellmarker in der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt.

Beispielhaft für die FACS-Färbungen von peripheren T_{reg} s sind in der Grafik 4.1 die Ergebnisse eines AIH-Patienten dargestellt. Die Zellen wurden direkt nach der Isolation aus dem peripheren Blut ohne Kultivierung und ohne Stimulation mit Antigenen gefärbt. Es wurde zum Beispiel untersucht, wie groß der Anteil der Foxp3+CD127low Zellen (siehe Quadrant „Q1“ im entsprechenden Koordinatensystem der Grafik 4.1) an den unterschiedlichen Ausgangspopulationen war. Diese Ergebnisse wurden zwischen den verschiedenen Probandengruppen verglichen (siehe Grafik 4.2 bis 4.6). Es wurden im arithmetischen Mittel 315.888 Leukozyten aller Probanden dieses Versuches ausgelesen.

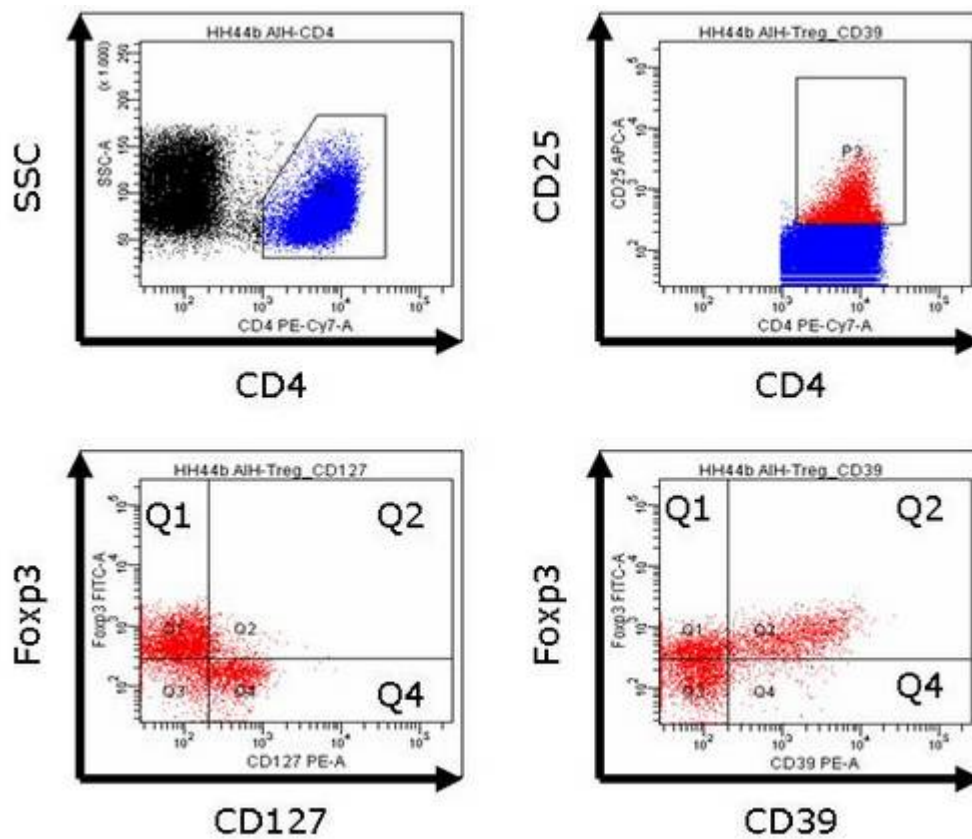
Die Grafiken 4.2 und 4.3 zeigen den prozentualen Anteil von T_{reg} s an der Population der CD4+ T-Zellen. Als zelluläre Marker für T_{reg} s wurde die Kombination aus CD25 und Foxp3 gewählt und zusätzlich entweder die Expression von CD39 (siehe Grafik 4.2) oder die herabgesetzte Expression von CD127 (CD127low) verwendet (siehe Grafik 4.3). Wurde der Marker CD39 untersucht, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der T_{reg} -Frequenz zwischen den verschiedenen Patientengruppen. Der prozentuale Anteil der T_{reg} s an den CD4+ T-Zellen lag im Median bei therapienaiven AIH-Patienten bei circa 2,8%, bei behandelten AIH-Patienten bei circa 1,2% und bei gesunden Probanden bei circa 1,7% (siehe Grafik 4.2). Wenn die T_{reg} s durch CD127low anstatt von CD39 definiert wurden, ergaben sich Mediane, die für die einzelnen Patientengruppen jeweils circa 1% höher lagen (siehe Grafik 4.3). Bei der Verwendung von CD127low zur Bestimmung der T_{reg} -Frequenz zeigten PSC-Patienten eine im Vergleich zu Gesunden signifikant geringere Frequenz von T_{reg} s im peripheren Blut, die im Median bei circa 1,6% lag ($p=0,0006$; siehe Grafik 4.3). Eine signifikant verminderte Frequenz von T_{reg} s bei PSC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden konnte auch detektiert werden, wenn der Anteil der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen an der Population aller Lymphozyten

berechnet wurde ($p=0,0022$; siehe Grafik 4.4). Der Median lag für die PSC-Patienten bei circa 0,7%. Diese Beobachtung für PSC-Patienten wurde weiterführend bestätigt, wenn der Anteil der CD4+CD25+Foxp3+CD127low T-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl untersucht wurde ($p=0,0042$; nicht als Grafik dargestellt). Der Median betrug circa 0,6%.

Bei den bisher gezeigten Ergebnissen bezüglich der Frequenz peripherer T_{reg}S konnten keine signifikanten Unterschiede für therapienaive oder behandelte AIH-Patienten untereinander oder im Vergleich zu Gesunden oder Kontrollgruppen detektiert werden. Beispielsweise lag der prozentuale Anteil der CD25+Foxp3+CD127low Zellen an den CD4+ T-Zellen im Median bei therapienaiven AIH-Patienten bei circa 3,6%, bei immunsuppressiv behandelten AIH-Patienten bei circa 2% und bei gesunden Probanden bei circa 2,3% (siehe Grafik 4.3). Weiterhin lag die Frequenz von T_{reg}S im Median bei therapienaiven und behandelten AIH-Patienten bei 1,09%, bei Gesunden bei 1,15% und bei PBC-Patienten bei 1,23%, wenn der prozentuale Anteil der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl bestimmt wurde (siehe Grafik 4.4).

Betrachtet man den Anteil von CD25 an CD4+ T-Zellen (siehe Grafik 4.5), zeigt sich, dass behandelte AIH-Patienten im Vergleich zu unbehandelten AIH-Patienten ($p=0,0006$) und im Vergleich zu Gesunden ($p=0,002$) signifikant weniger CD25 exprimierten. Auch die CD4+ Zellen von PBC-Patienten bildeten signifikant weniger CD25 als CD4+ Zellen von gesunden Probanden ($p=0,0128$). Dabei betrug der Anteil der CD25+ Zellen an den CD4+ T-Zellen im Median bei therapienaiven AIH-Patienten 12,4%, bei therapierten AIH-Patienten 4,4%, bei gesunden Probanden 10,3% und bei PBC-Patienten 7,4% (siehe Grafik 4.5). Unter den CD4+CD25+ Zellen hatten behandelte AIH-Patienten einen signifikant höheren Anteil an Foxp3-exprimierenden Zellen als Gesunde ($p=0,0023$; siehe Grafik 4.6). Auch PBC-Patienten wiesen einen signifikant höheren Anteil von Foxp3+ Zellen an den CD4+CD25+ Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden auf ($p=0,0012$). Im Median lag der Anteil der Foxp3+ Zellen an den CD4+CD25+ T-Zellen bei unbehandelten AIH-Patienten bei circa 36%, bei behandelten AIH-Patienten bei circa 48%, bei Gesunden bei circa 27% und bei PBC-Patienten bei circa 54% (siehe Grafik 4.6).

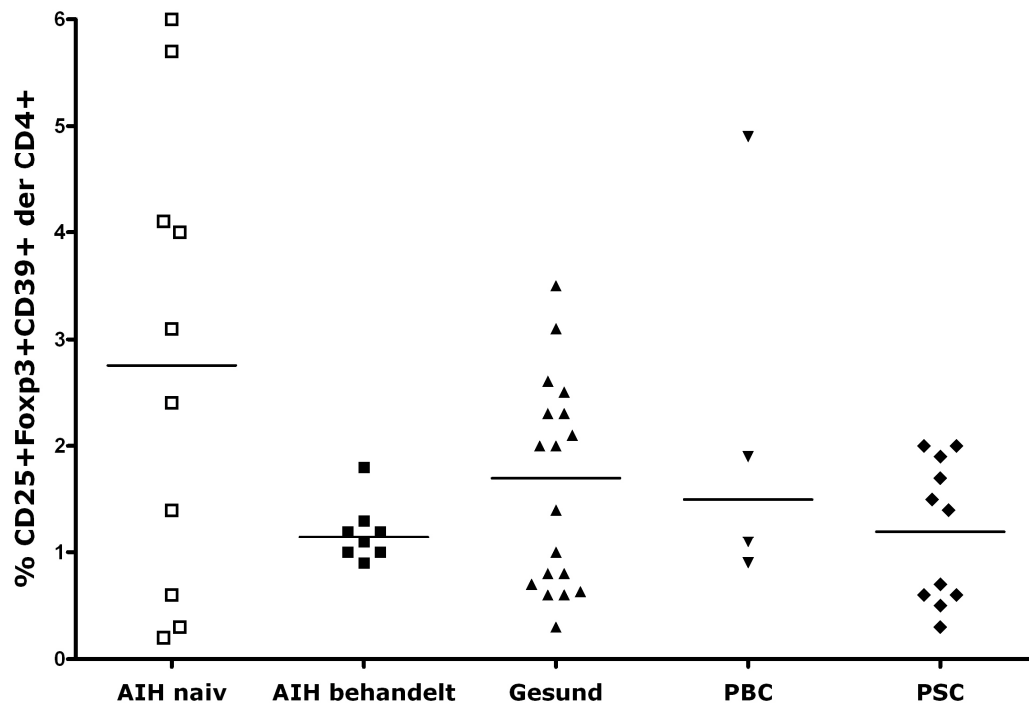
Grafik 4.1 **Beispiele von FACS-Analysen der T_{reg}**



Blau gefärbte Zellpopulation = CD4 positive Zellen; Rot gefärbte Zellpopulation = CD4 positive und CD25 positive Zellen; SSC = Side Scatter = Seitwärtsstreulicht; Q1 bis 4 = Quadrant1 bis 4

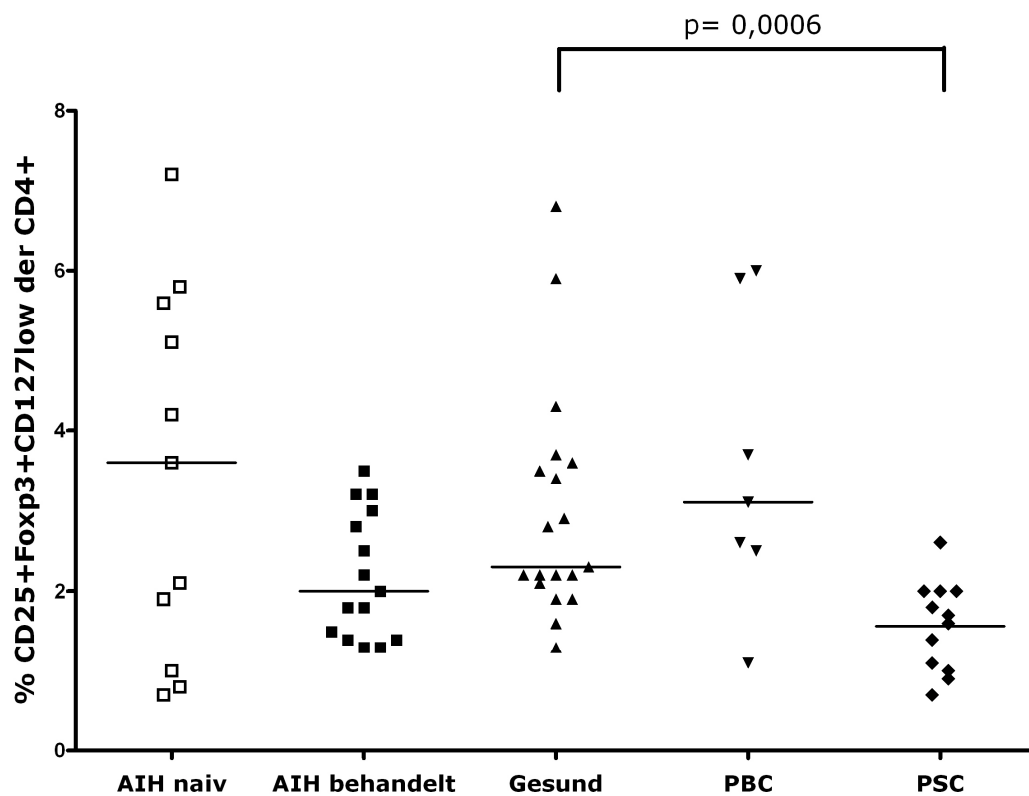
Grafik 4.2

T_{reg} -Frequenz anhand von CD39



Grafik 4.3

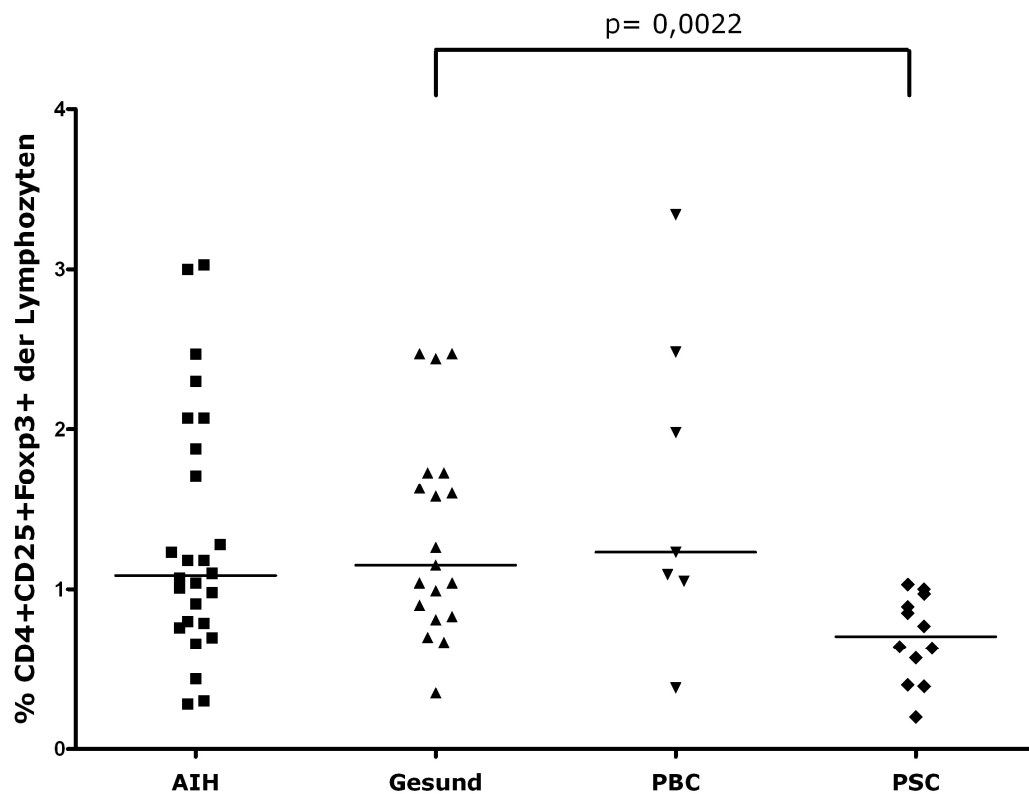
T_{reg} -Frequenz anhand von CD127low



AIH naiv = unbehandelte AIH-Patienten; AIH behandelt = immunsuppressiv-therapierte AIH-Patienten, p = p-Wert der statistischen Signifikanztestung; horizontaler Balken = Median

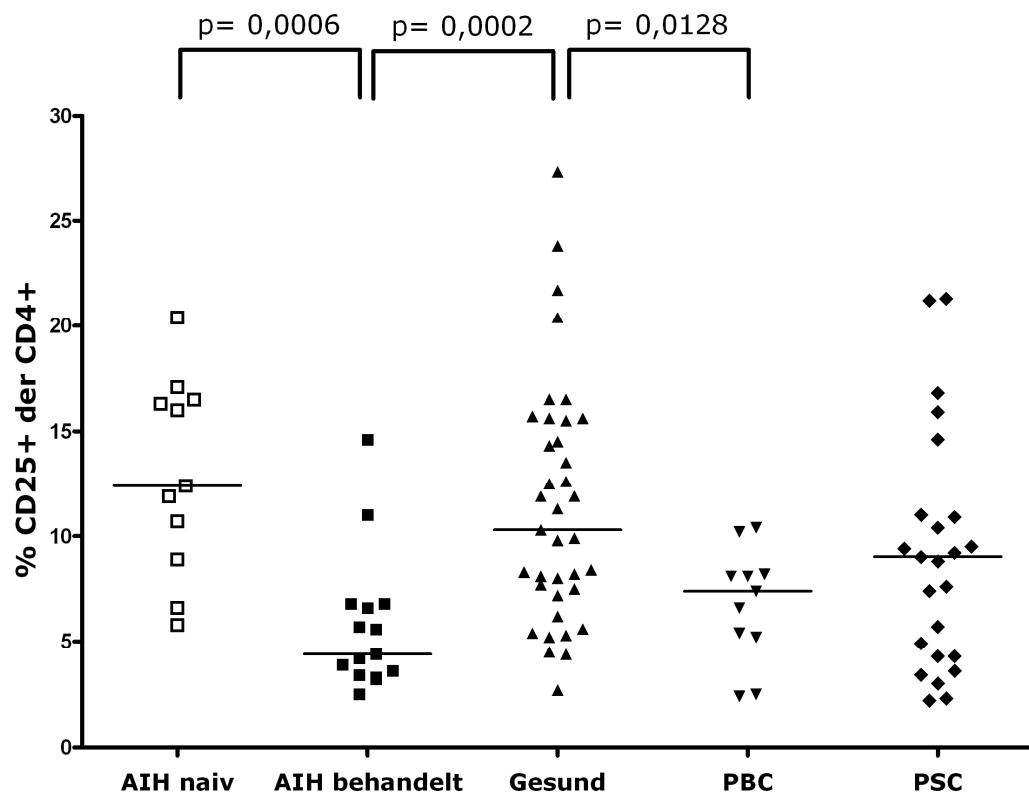
Grafik 4.4

T_{reg} -Frequenz anhand von Foxp3



Grafik 4.5

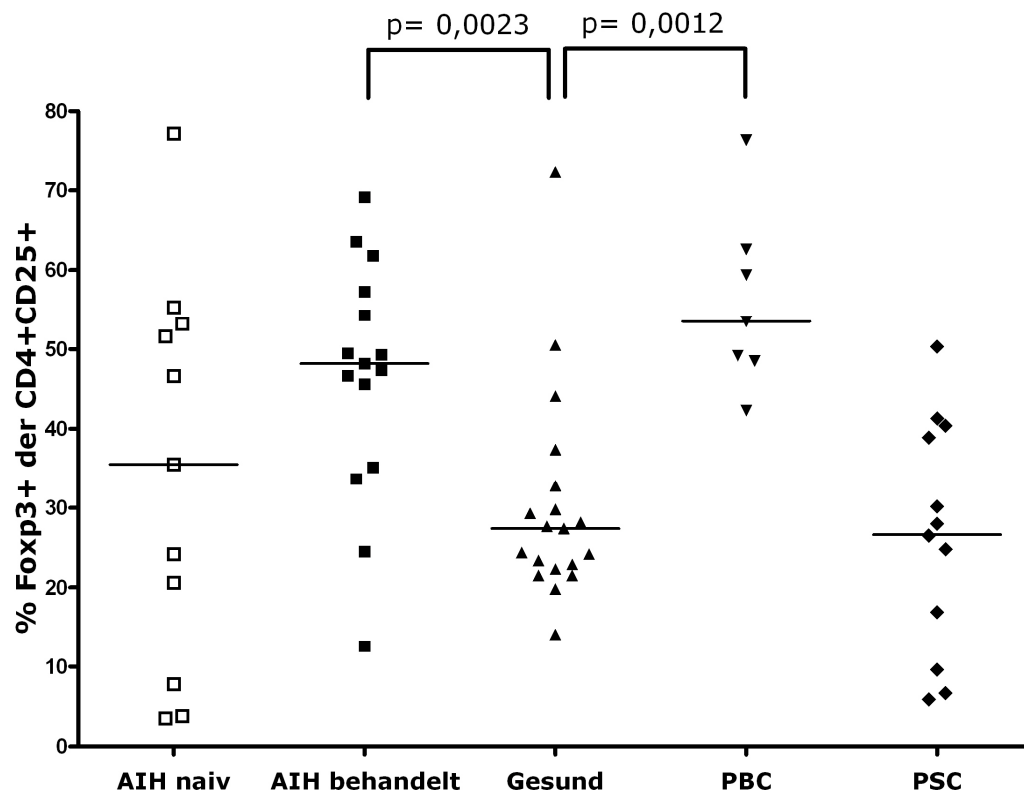
Anteil der CD25+ an CD4+ T-Zellen



AIH naiv = unbehandelte AIH-Patienten; AIH behandelt = immunsuppressiv-therapierte AIH-Patienten, p = p -Wert der statistischen Signifikanztestung; horizontaler Balken = Median

Grafik 4.6

Anteil der Foxp3+ an CD4+CD25+ T-Zellen



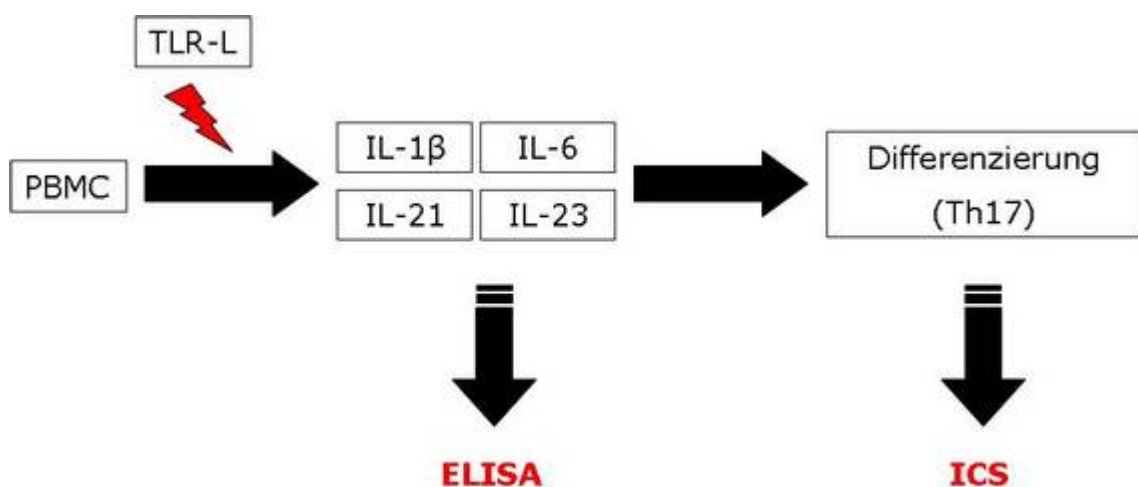
AIH naiv = unbehandelte AIH-Patienten; AIH behandelt = immunsuppressiv-therapierte AIH-Patienten, p = p-Wert der statistischen Signifikanztestung; horizontaler Balken = Median

5. Analyse von Zytokinen und T-Zellen nach TLR-Stimulation

T-Zell-Reaktionen können durch modulierende Einflüsse über Toll-like Rezeptoren (TLR) und ihre Liganden (TLR-L) geformt werden. Es sollte überprüft werden, ob PBMCs von AIH-Patienten susceptibler gegenüber bestimmten TLR-Liganden sind und ob sich diese Suszeptibilität auf proinflammatorische Differenzierungswege von T-Zellen auswirkt.

Für die Stimulation von PBMCs wurden insgesamt acht TLR-Liganden und ein NOD2-Ligand verwendet (siehe III.Material und Methoden, 2.4.1 Stimulation, Kultivierung und Restimulation von TLR-stimulierten Zellen). Die Grafik 5.1 zeigt den Ablauf dieses Versuches und die zwei Methoden zur Erhebung der Ergebnisse: zum einen die ELISA-Untersuchungen der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-21 und IL-23 aus den Kulturüberständen. Zum anderen wurde die Differenzierung der PBMCs mittels Durchflusszytometrie anhand intrazellulärer Zytokinfärbungen untersucht. Sollten die genannten Zytokine vermehrt durch die TLR-Stimulation sezerniert worden sein, wäre eine Differenzierung zu Th17-Zellen hin zu erwarten, da eine Beteiligung der genannten Zytokine an der Induktion oder Stabilisierung von Th17-Zellen durch verschiedene Arbeiten beschrieben worden ist.

Grafik 5.1 Versuchsaufbau von TLR-Stimulationen



PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells (periphere mononukleäre Blutzellen); TLR-L = Stimulation mit Toll-like Rezeptor-Liganden; ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ICS = Intracellular Cytokine Staining (Intrazelluläre Zytokinfärbung)

Die Grafiken 5.2 bis 5.7 zeigen die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen. Die Grafiken 5.2 und 5.3 beschreiben die sezernierte Menge von IL-1 β nach der Stimulation von PBMCs mit dem TLR4-Liganden LPS und dem NOD2-Liganden MDP. Diese Liganden konnten bei AIH-Patienten im Vergleich zu Gesunden die größte Menge an IL-1 β freisetzen, allerdings ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu erreichen. Für IL-1 β ergab sich nach der Stimulation mit LPS im Median ein Wert von circa 7500pg/ml für AIH-Patienten im Vergleich zu circa 5000pg/ml bei gesunden Probanden (siehe Grafik 5.2). Weiterhin konnte für IL-1 β nach der Stimulation mit MDP bei AIH-Patienten im Median ein Wert von circa 6000pg/ml im Vergleich zu circa 2200pg/ml bei Gesunden registriert werden (siehe Grafik 5.3).

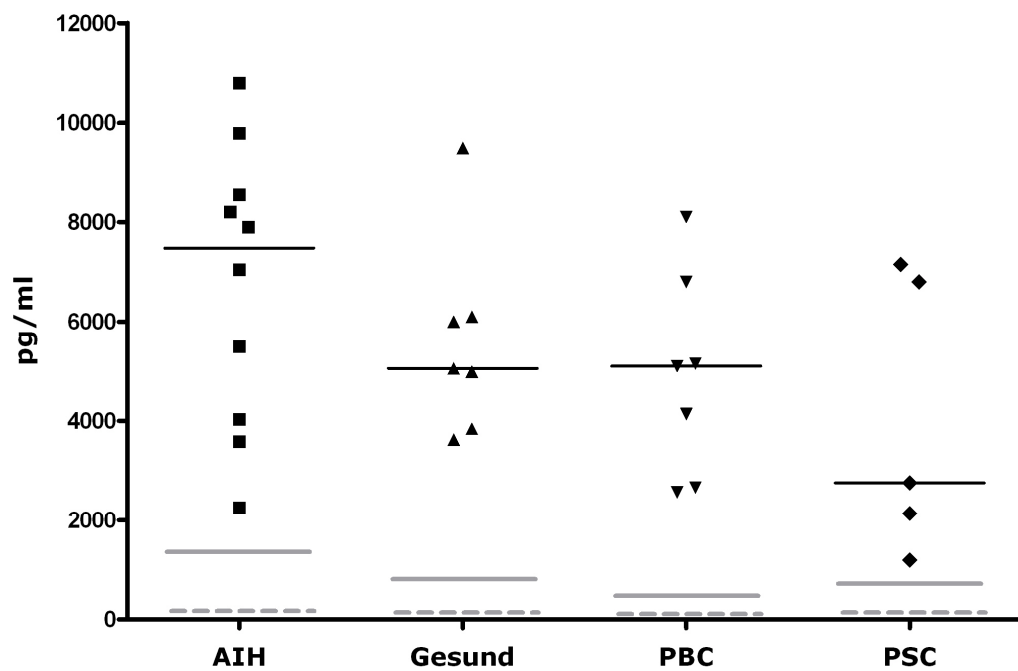
Bei keiner TLR-Ligandenstimulation ließen sich signifikante Unterschiede oder zumindest Tendenzen für das Zytokin IL-6 feststellen. In der Grafik 5.4 ist beispielhaft die Menge von IL-6 im Kulturüberstand nach der Aktivierung von PBMCs mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) abgetragen. Dabei lag der Median für AIH-Patienten bei circa 21.000pg/ml und für gesunde Probanden bei circa 18.000pg/ml.

Bezüglich der sezernierten Menge von IL-21 ergaben sich keine für die AIH relevanten Unterschiede (siehe Grafik 5.5 und Grafik 5.6). Es konnten aber signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und PSC-Patienten festgestellt werden: nach der Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) produzierten PBMCs von PSC-Patienten signifikant weniger IL-21 ($p=0,0286$; siehe Grafik 5.5) und nach der Stimulation mit dem TLR2-Liganden LTA signifikant mehr IL-21 ($p=0,0286$; siehe Grafik 5.6). Der Median der sezernierten Menge von IL-21 lag bei der Stimulation mit Poly(I:C) für PSC-Patienten bei circa 150pg/ml und für Gesunde bei circa 1500pg/ml (siehe Grafik 5.5) und bei der Stimulation mit LTA für PSC-Patienten bei circa 1700pg/ml im Vergleich zu gesunden Probanden bei circa 500pg/ml (siehe Grafik 5.6)

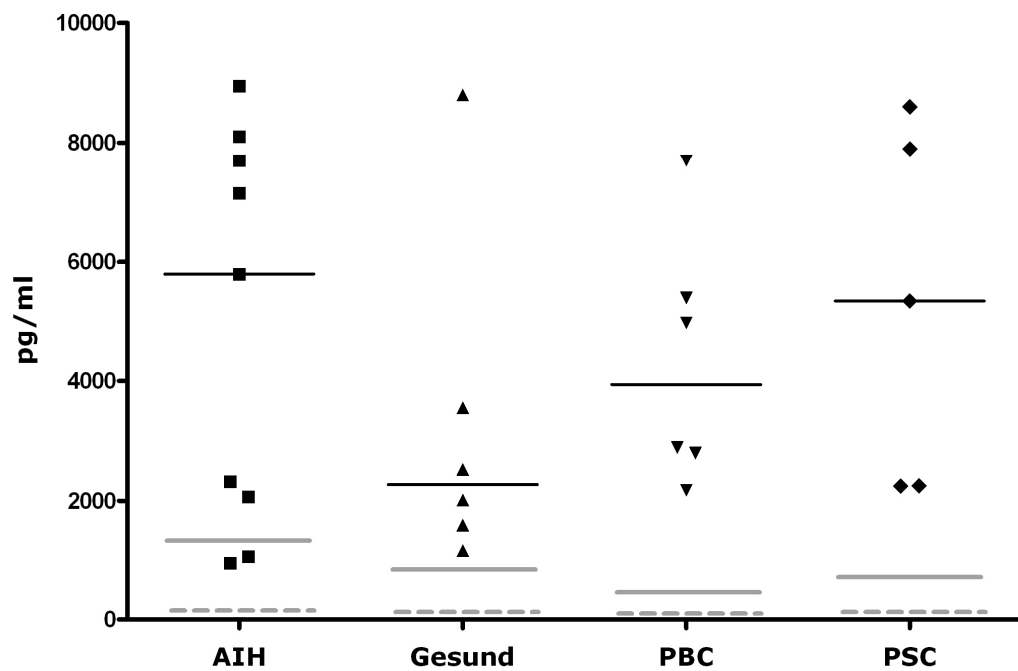
Für die sezernierte Menge von IL-23 ergaben sich für keinen TLR-Liganden und für keine Patientengruppe signifikante Unterschiede oder Tendenzen. Beispielhaft zeigt die Grafik 5.7 die Stimulation mit dem TLR9-Liganden ODN 2395. Im Median ergaben sich Werte von circa 75pg/ml bei AIH-Patienten im Vergleich zu circa 100pg/ml bei Gesunden.

Die Grafiken 5.8 und 5.9 zeigen die Resultate der Differenzierungsanalysen mittels FACS. Um die Differenzierungswege charakterisieren zu können, wurden die Oberflächenmarker CD4 und CD8 und die intrazellulären Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-17 angefärbt. Es wurden im arithmetischen Mittel aller Probanden dieses Versuches 42.395 Leukozyten ausgelesen. Bei der AIH zeichnete sich ein Trend ab, dass die Lymphozyten nach der Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) vermehrt zu IFN- γ - und TNF- α -doppelpositiven CD8⁺ Zellen differenzieren, allerdings ohne signifikanten Unterschied zu Gesunden (siehe Grafik 5.8). Der prozentuale Anteil der IFN- γ +TNF- α + Zellen an den CD8⁺ T-Zellen lag im Median bei AIH-Erkrankten bei circa 14% und bei gesunden Probanden bei circa 4%. Signifikante Unterschiede ergaben sich für die Stimulation mit dem TLR5-Liganden Flagellin, die zu einer verstärkten Differenzierung von IL-17+CD8⁺ T-Zellen führte ($p=0,0238$; siehe Grafik 5.9). Der prozentuale Anteil der IL-17+ Zellen an den CD8⁺ T-Zellen betrug im Median bei AIH-Patienten 1,85% im Vergleich zu Gesunden mit 0,4%.

Grafik 5.2 IL-1 β ELISA nach Stimulation mit LPS

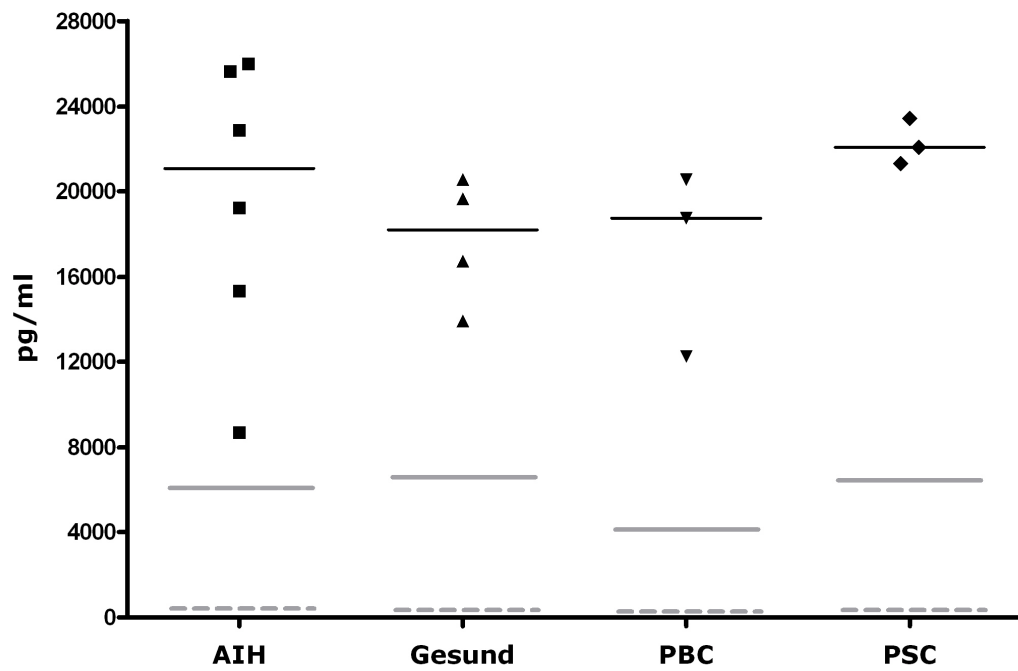


Grafik 5.3 IL-1 β ELISA nach Stimulation mit MDP

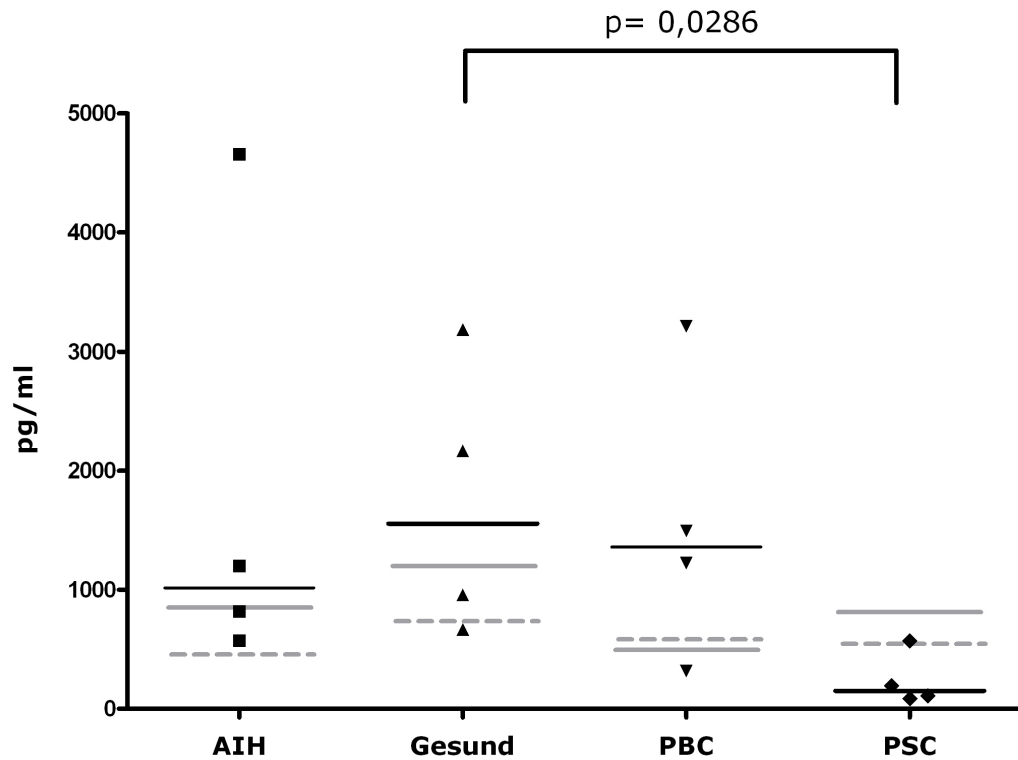


Negativkontrolle: grauer gestrichelter Balken = Zellkultur ohne Antigen; **Positivkontrolle:** grauer durchgezogener Balken = Stimulation mit ConA; horizontaler Balken = Median

Grafik 5.4 IL-6 ELISA nach Stimulation mit Poly(I:C)

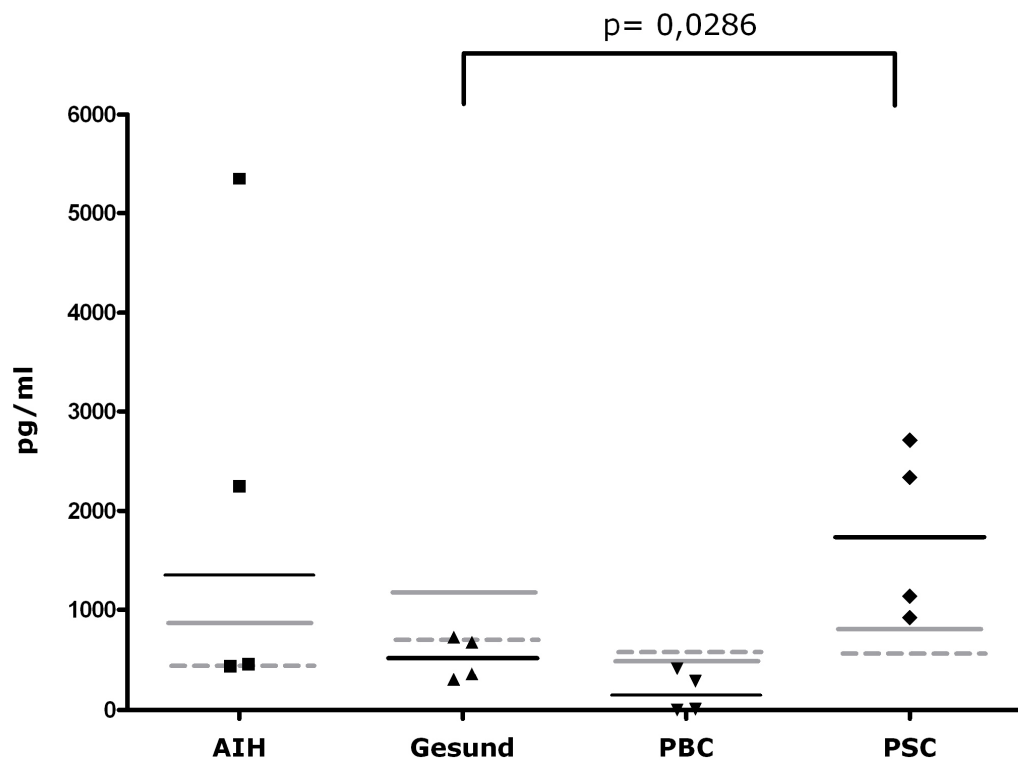


Grafik 5.5 IL-21 ELISA nach Stimulation mit Poly(I:C)

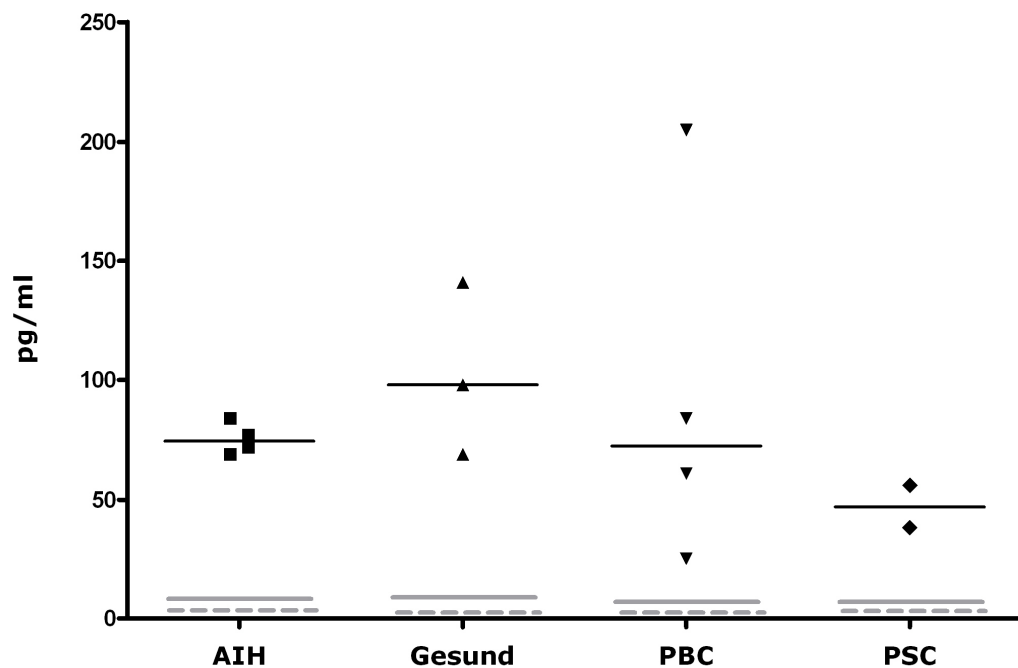


Negativkontrolle: grauer gestrichelter Balken = Zellkultur ohne Antigen; **Positivkontrolle:** grauer durchgezogener Balken = Stimulation mit ConA; horizontaler Balken = Median; p = p-Wert der statistischen Signifikanztestung

Grafik 5.6 IL-21 ELISA nach Stimulation mit LTA

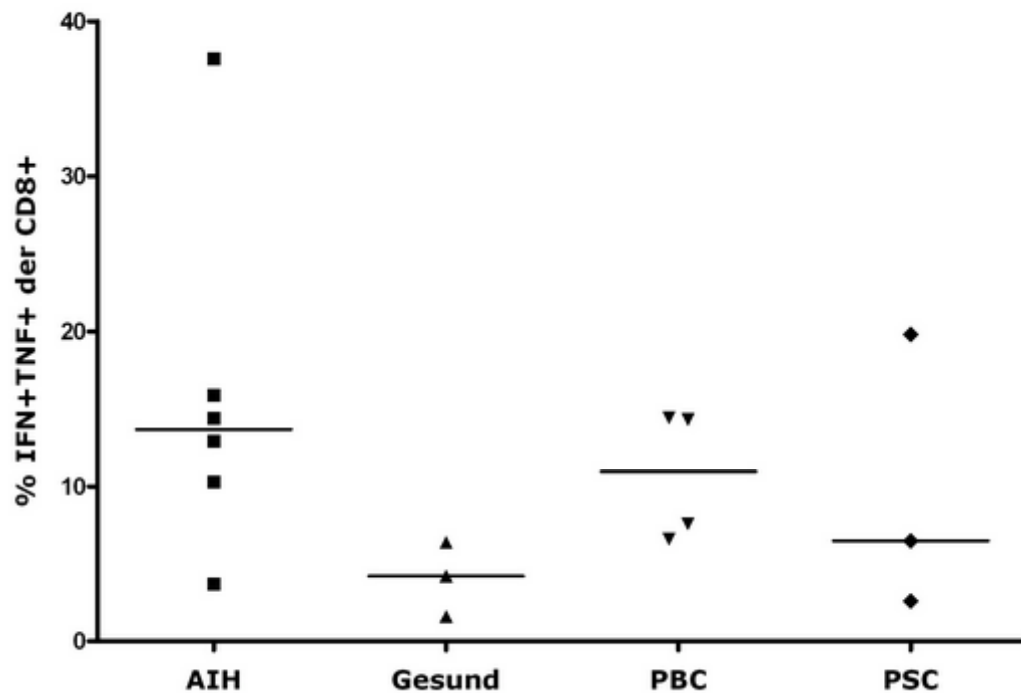


Grafik 5.7 IL-23 ELISA nach Stimulation mit ODN 2395

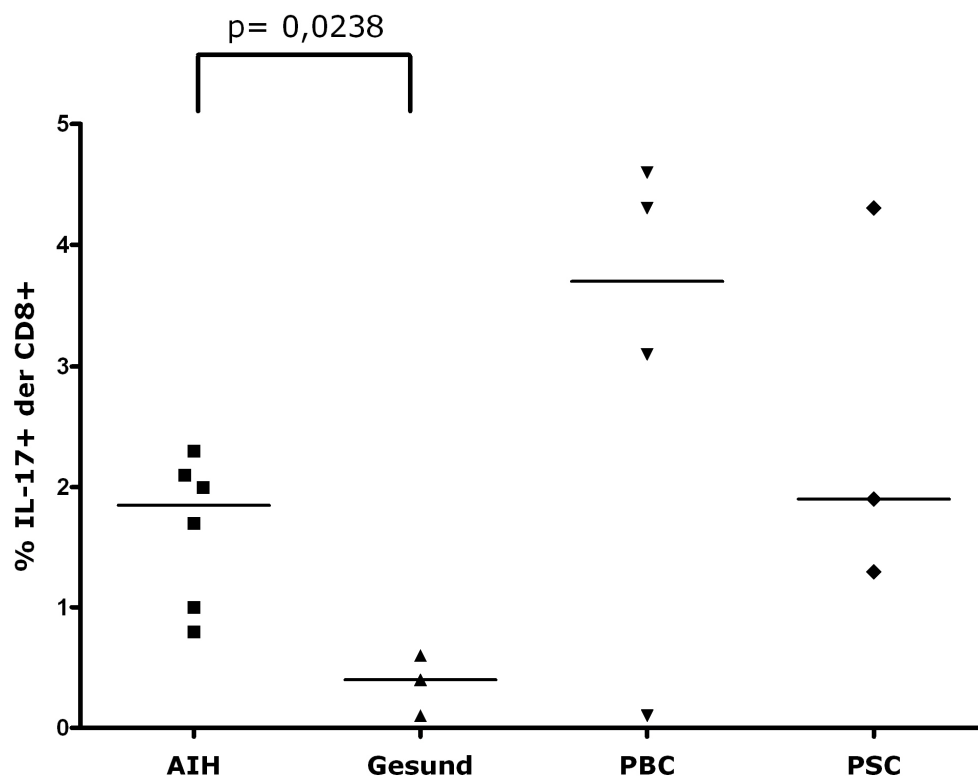


Negativkontrolle: grauer gestrichelter Balken = Zellkultur ohne Antigen; **Positivkontrolle:** grauer durchgezogener Balken = Stimulation mit ConA; horizontaler Balken = Median; p = p-Wert der statistischen Signifikanztestung

Grafik 5.8 Differenzierung nach Stimulation mit Poly(I:C)



Grafik 5.9 Differenzierung nach Stimulation mit Flagellin



IFN+TNF+ = prozentualer Anteil der Interferon γ positiven Zellen und TNF- α positiven Zellen;
 IL-17+ = prozentualer Anteil der Interleukin-17 positiven Zellen; horizontaler Balken = Median;
 p=p-Wert der statistischen Signifikanztestung

V. Diskussion

1. Genetischer Hintergrund und Effektorzellen im Mausmodell

Die Ergebnisse aus den Transferversuchen von SLA/LP-sensibilisierten Abwehrzellen zur Induktion einer murinen Hepatitis zeigen, dass der genetische Hintergrund der Mäuse eine Bedeutung für den Mechanismus der primären Stimulation hat. Wenn die Immunzellen auf dem IL-10 -/- Hintergrund mit SLA/LP aktiviert wurden, konnten starke entzündungszellige Infiltrate in den Lebern nach dem Transfer registriert werden.

Folgende Aspekte dieses Versuches müssen diskutiert werden: Zum einen zeigte sich, dass im Transferversuch 2 die histologischen Ergebnisse nicht durch die Transaminasenmessungen bestätigt wurden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass im Transferversuch 2 die Mäuse 9 Tage nach dem Zelltransfer hepatektomiert und gleichzeitig die Transaminasenmessungen durchgeführt wurden und somit eventuell der Zeitpunkt der maximalen Transaminasenspiegel im peripheren Blut verpasst wurde. Bei Buxbaum et al. (2008) lag das Maximum des Serum-Transaminasenanstiegs einer in der Maus induzierten Hepatitis bei Tag 3 mit einer Normalisierung an Tag 14. Bei Derkow et al. (2007) war der Maximalwert des GPT-Verlaufs an Tag 7 mit einer Rückkehr zu den Ausgangswerten zwischen den Tagen 12 bis 15 zu verzeichnen. Zum anderen muss angeführt werden, dass ein Kritikpunkt des in dieser Arbeit verwendeten Mausmodells und auch diverser etablierter Tiermodelle darin besteht, dass durch Transferversuche eine transiente Hepatitis induziert und damit nicht der chronische Charakter der Autoimmunen Hepatitis des Menschen simuliert wird.

Die Resultate der vorliegenden Transferversuche zeigen, dass weitere Experimente erforderlich sind: die in die Leber eingewanderten Effektorzellen müssen genauer charakterisiert werden. Durch welche Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Zytokine lassen sie sich beschreiben? Handelt es sich um ein homogenes Zellinfiltrat oder können diverse Zellarten mit unterschiedlichen Aufgaben registriert werden? Beispielsweise konnten Kido et al. (2008) in ihren Transferversuchen eines Mausmodells der AIH die unterschiedliche Bedeutung von transferierten CD4+ und CD8+ Zellen erfassen. Den CD4+ T-Zellen wurde

eine induzierende Rolle bei der Hepatitis und eine Beteiligung bei der Rekrutierung von CD8+ in die Leber zugesprochen, wohingegen die CD8+ T-Zellen für den Progress der Entzündung zum fatalen Leberzelluntergang verantwortlich waren. Es muss differenziert werden zwischen für die Ätiologie der AIH relevanten Immunzellen und der Abwehrzellen, die unspezifisch im Rahmen einer allgemeinen Entzündungsreaktion aktiviert wurden. Hinsichtlich der Effektorzellen stellt sich die Frage, ob Th17-Zellen in den zellulären Infiltraten der Leber repräsentiert sind. Sind sie spezifisch an einer Immunreaktion gegenüber dem SLA/LP-Molekül beteiligt, wie die laborinternen Vorarbeiten vermuten lassen? Weiterhin muss aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ein Graduierungsmaß dieser induzierten Hepatitis anhand histologischer Merkmale erstellt werden, um das Ausmaß der entzündlichen Infiltrate besser quantifizieren zu können. Kleinere und quantitativ weniger entzündliche Läsionen wurden nämlich auch beobachtet, wenn die Abwehrzellen aus SLA/LP-sensibilisierten IL-10 -/- Mäusen in Wildtyp-Mäuse transferiert wurden.

Die Bedeutung des genetischen Hintergrundes der IL-10 -/- Mäuse muss nähergehend untersucht werden. Wahrscheinlich ist der Knockout von Interleukin-10 am Aktivierungsprozeß der Effektorzellen beteiligt. Beeinflußt die unterbrochene Signalkaskade von IL-10 initiale Prozesse wie die Antigenpräsentation oder wirkt es nachgeschaltet immunsuppressiv? Spielt IL-10 auch im humanen Organismus eine Rolle bei der Immunantwort gegenüber SLA/LP?

2. SLA/LP-spezifische T-Zellen

Durch mehrere antigenspezifische Restimulationen konnten aus dem peripheren Blut von AIH-Patienten sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen isoliert und expandiert werden, die eine IFN- γ -Expression als Reaktion auf verschiedene Protein- und Peptidformen des SLA/LP-Moleküls aufwiesen. Diese Zytokinproduktion konnte nur beobachtet werden, wenn die Patienten auch laborchemisch verifiziert Autoantikörper gegen SLA/LP besaßen. Gesunde Probanden oder PBC-Patienten waren meistens anerg gegenüber dem SLA/LP-Molekül im Rahmen der untersuchten Zellarten und Zytokine.

Somit kann auch für SLA/LP-spezifische T-Zellen bestätigt werden, was für Lymphozyten allgemein bereits bekannt war: sie zirkulieren durch die Blutbahn, um auf ihr spezifisches Antigen zu treffen. Hinzu kommt, dass diese Ergebnisse im Einklang mit den Versuchen stehen, die zur LKM-1-positiven Autoimmunen Hepatitis durchgeführt wurden. Löhr et al. (1996) haben gezeigt, dass sowohl T-Zell-Klone, die aus Leberbiopsien generiert wurden, als auch PBMCs aus der Peripherie von Patienten mit einer LKM-1-positiven AIH dann eine verstärkte Proliferation aufweisen, wenn ihnen durch Antigen-präsentierende Zellen und MHC II restringiert das LKM-1-Molekül dargeboten wird. Dieser Effekt war spezifisch und konnte weder bei Gesunden noch bei Patienten mit anderen chronischen Lebererkrankungen beobachtet werden. Ob diese T-Zell-Antworten auch die Leberschädigung bei der Autoimmunen Hepatitis vermitteln, bleibt ungeklärt.

Inwiefern die in dieser Arbeit beschriebene IFN- γ -Expression der SLA/LP-spezifischen T-Zellen eine pathogenetische Relevanz hat, bedarf weiterer Forschungsarbeit. Es ist möglich, dass die Produktion von IFN- γ durch die Zellkulturbedingungen begünstigt wurde und nicht spezifisch für die pathogenetischen Prozesse der Autoimmunen Hepatitis ist. Im Allgemeinen ist über IFN- γ bekannt, dass es vorrangig von CD4+Th1 Zellen und CD8+ Zellen exprimiert wird und der zellvermittelten Immunabwehr dient. Beispielsweise induziert Interferon- γ eine verstärkte Expression von MHC-Molekülen, die eine vermehrte Antigenpräsentation ermöglicht, oder es führt zu einer Aktivierung von Makrophagen. Es bleibt somit zu klären, ob IFN- γ für die AIH eine grundlegende, proinflammatorische Effektorfunktion einnimmt. Andererseits wird dem Zytokin IFN- γ bei autoimmunen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose und ihren Tiermodellen eine protektive Rolle zugesprochen, z.B. durch die Inhibition von Th17-Zellen (Chu et al. 2000).

Da sich, wie in dieser Arbeit gezeigt, T-Zell-Reaktionen gegenüber dem SLA/LP-Molekül nachweisen lassen, schließen sich weitere Fragen nach dem Ursprung dieser Immunantwort an: wie kommt es zu einer humoralen und durch diese Arbeit beschriebenen zellulären Immunreaktion gegen ein primär intrazellulär lokalisiertes Antigen? Wird SLA/LP über MHC-Moleküle den T-Zellen aktiv präsentiert oder durch Zelluntergang dem Immunsystem

zugänglich gemacht? Und durch welche Antigen-präsentierenden Zellen wird das SLA/LP-Molekül präsentiert?

3. Regulatorische T-Zellen

Die vorliegenden Untersuchungen zu der Frequenz peripherer T_{reg}S konnten keine Unterschiede für AIH-Patienten im Vergleich zu Gesunden oder anderen autoimmunen Lebererkrankungen hervorbringen. Dies gilt sowohl für die Färbungen der extrazellulären Marker CD39 und CD127, aber auch des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3. Damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit in direktem Gegensatz zu denen von Longhi et al. (2004, 2005 und 2008), die eine verminderte Frequenz von T_{reg}S bei AIH-Patienten registriert hatten. Im Jahr 2004 zeigten Longhi et al., dass AIH Patienten signifikant weniger T_{reg}S im peripheren Blut aufweisen als eine gesunde Kontrollgruppe, wobei nur die Oberflächenmarker CD4 und CD25 verwendet wurden. Dies wurde durch eine weitere Veröffentlichung der Arbeitsgruppe im Jahr 2005 bestätigt. Im Jahr 2008 belegten Longhi et al. eine verminderte Foxp3-Expression in CD4+CD25+ T-Zellen von AIH-Patienten im Vergleich zu Gesunden, allerdings nicht durch FACS-Analysen wie in dieser Arbeit, sondern durch Methoden wie die Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Immunoblots.

Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Longhi et al. und denen dieser Arbeit. Zum einen definierte die Arbeitsgruppe von Longhi et al. die regulatorischen T-Zellen als CD4+CD25+ Zellen. Andere Arbeiten haben aber gezeigt, dass nur die 1-2% der CD25+ Zellen der CD4+T-Zellen, die das CD25-Molekül am stärksten exprimieren (CD25 high), auch relativ gut die T_{reg}s repräsentieren (Earle et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die regulatorischen T-Zellen nicht allein durch den CD4+CD25+-Status definiert, sondern es wurden immer zusätzliche Marker für T_{reg}S verwendet, wie z.B. die Oberflächenantigene CD127 oder CD39 oder das intrazelluläre Foxp3. Dadurch sollte eine Kontamination der T_{reg}-Population mit aktivierten, nicht-regulatorischen T-Zellen vermieden werden. Weiterhin lag bei Longhi et al. in den oben genannten drei Veröffentlichungen das mediane Alter der AIH-Patienten zwischen 11 und 15 Jahren und das der Kontrollgruppen zwischen 27 und 30 Jahren. In dieser Arbeit waren die AIH-Patienten aller

Versuche im Median 54 Jahre alt (Spannweite: 18 bis 78 Jahre) und die Kontrollgruppe gesunder Probanden im Median 29 Jahre alt. Da juvenile AIH-Patienten, die oft den LKM-1-positiven Typ 2 der Autoimmunen Hepatitis aufweisen, teilweise andere klinische Verläufe zeigen als adulte, müssen auch die immunologischen Komponenten der Erkrankung zu verschiedenen Alterszeitpunkten differenziert betrachtet werden (Mieli-Vergani und Vergani 2009). Das junge Alter der untersuchten AIH-Patienten von Longhi et al. spiegelt sich dementsprechend auch in dem relativ hohen Anteil von LKM-1-positiven AIH-Patienten wieder. In den Veröffentlichungen von Longhi et al. der Jahre 2004 und 2005 beträgt der Anteil der LKM-1-positiven Patienten an allen untersuchten AIH-Erkrankten 26,8% (11/41) und 17,9% (5/28). Für diesen Typ 2 der Autoimmunen Hepatitis sind andere klinische Verläufe beschrieben als für den Typ 1 der AIH (Gregorio et al. 1997). Allgemein ist 1-3% der AIH-Patienten positiv für LKM-1-Antikörper (Lüth und Lohse 2006). Der Anteil der LKM-1-positiven AIH-Patienten an dem gesamten AIH-Kollektiv aller Versuche dieser Arbeit betrug 4,4% (2/45).

Es muss weiterhin betont werden, dass Untersuchungen von Immunzellen von Patienten immer eine Korrelation mit den aktuellen klinischen Parametern erforderlich machen. Befanden sich die Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme und damit der Isolation der T_{reg}s in einem entzündlichen Schub der Erkrankung? Waren die AIH-Patienten therapienaiv oder wurden sie immunsuppressiv behandelt? Dies sind alles Faktoren, die Einfluß auf diverse T-Zell-Populationen haben können. In den vorliegenden Untersuchungen exprimierten die CD4⁺ T-Zellen von therapienaiven AIH-Patienten vermehrt CD25 auf der Zelloberfläche, wahrscheinlich weil die Mehrzahl der Patienten sich im entzündlichen Schub der AIH im Rahmen der Erstdiagnose befanden und die T-Zellen aktiviert waren (siehe Grafik 4.5). Therapierte AIH-Patienten zeigten eine verminderte Expression von CD25 auf CD4⁺ T-Zellen, was als eine reduzierte Aktivierung der Effektorzellen aus dem peripheren Blut und somit als Therapieerfolg gewertet wurde (siehe Grafik 4.5). Während der immunsuppressiven Therapie exprimierten CD4⁺CD25⁺ Zellen vermehrt Foxp3 (siehe Grafik 4.6), was wahrscheinlich Ausdruck einer bereits von Zhang et al. (2005) beschriebenen in-vivo-Expansion von regulatorischen T-Zellen während lymphopenischer Phasen ist. Diese Beobachtungen fordern eine Korrelation

zwischen klinischen und experimentellen Daten, insbesondere bei chronisch-progressiven Erkrankungen, bei denen die immunologische Situation auf lokaler und systemischer Ebene nicht als konstant anzusehen ist.

Diverse Arbeitsgruppen haben für gesunde Probanden beschrieben, dass der Anteil der CD25⁺CD127^{low} Zellen an der CD4⁺T-Zell-Population bei circa 6% liegt (Seddiki et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zu diesen Zellmarkern der Transkriptionsfaktor Foxp3 angefärbt und anhand dieser drei Zellmarker waren circa 2% der CD4⁺Zellen als regulatorische T-Zellen bei Gesunden anzusehen. In dieser Arbeit wurde weiterhin die Aussagekraft von CD39 als Oberflächenmarker von T_{reg}S für die jeweiligen Patientengruppen untersucht. Die Kombinationen aus CD25, Foxp3 und CD127 oder aus CD25, Foxp3 und CD39 lieferten für verschiedene Kollektive vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der T_{reg}-Frequenz. Allein die Patientengruppe der PSC-Erkrankten wies im Vergleich zu Gesunden einen signifikant geringeren Anteil von CD25⁺Foxp3⁺CD127^{low} Zellen an den CD4⁺ Zellen auf. Dies wurde durch den Anteil der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl bestätigt. Somit fand sich in dieser Arbeit als Nebebefund eine verminderte Frequenz peripherer T_{reg}S bei Erkrankten der PSC.

Wenn man wie in dieser Arbeit die Beteiligung von T_{reg}S an organspezifischen Autoimmunerkrankungen untersucht, muss man sich vergegenwärtigen, dass die aus dem peripheren Blut aquirierten T_{reg}S nicht unbedingt die Situation des lokalen Entzündungsgeschehens repräsentieren (van Amelsfort et al. 2004). Hinzukommend üben T_{reg}S ihre regulatorische Funktion unter anderem durch direkte Zellkontakte aus, sodass Analysen von leberständigen regulatorischen T-Zellen in der Zukunft notwendig sind. Weiterhin muss überprüft werden, ob die suppressive Funktionalität der regulatorischen T-Zellen bei der AIH eingeschränkt ist. Longhi et al. (2005) konnten zeigen, dass T_{reg}S von AIH-Patienten während der aktiven Krankheitsphase nicht in der Lage sind, eine CD8⁺ T-Zellantwort bezüglich Proliferation und Zytokinproduktion zu limitieren.

4. Zytokine und T-Zellen nach TLR-Stimulation

Die Versuche zu den TLR-Liganden sind als eine Art Übersicht zu verstehen, um Tendenzen ausfindig zu machen, für welche Liganden die AIH-Patienten

suszeptibler sind als Gesunde oder Vergleichsgruppen. Es wurde überprüft, ob sich diese mögliche Suszeptibilität dadurch ausdrückt, dass vermehrt proinflammatorische, Th17-begünstigende Zytokine ausgeschüttet werden und dadurch eine Zelldifferenzierung zu IL-17 exprimierenden Effektorzellen begünstigt wird.

Die PBMCs von AIH-Patienten sezernierten vermehrt das Zytokin IL-1 β nach der Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS und dem NOD2-Liganden MDP, allerdings ohne ein Signifikanzniveau im Vergleich zu Gesunden zu erreichen. Über IL-1 β ist bekannt, dass es im humanen Organismus ein essentielles Zytokin für die Induktion der Th17-Zellen darstellt (Acosta-Rodriguez et al. 2007, Wilson et al. 2007). Allerdings führten die Liganden LPS und MDP nicht zu einer durch die Sekretion von IL-1 β vermittelten Differenzierung zu Th17-Zellen. Nur nach der Stimulation mit dem TLR5-Liganden Flagellin konnten signifikant mehr IL-17+CD8+ T-Zellen in den FACS-Analysen detektiert werden. Zusammenfassend aus den vorliegenden Ergebnissen erscheinen der TLR4-Ligand LPS, der TLR5-Ligand Flagellin und der NOD2-Ligand MDP am vielversprechendsten, um ihre Bedeutung an einer proinflammatorischen Th17-Antwort im Rahmen der AIH weiter zu untersuchen. Einige Publikationen stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine Arbeitsgruppe konnte herausarbeiten, dass eine maximale Expression von IL-17 durch humane CD4+ memory-Zellen erreicht werden kann, wenn die CD4+ Zellen durch solche Monozyten stimuliert wurden, die zuvor TLR-Liganden gebunden hatten (Evans et al. 2007). Dieser Einfluß der Monozyten auf die Th17-Differenzierung war vorrangig zellkontaktabhängig. Die verwendeten Liganden von TLR2, von TLR4 und von TLR5 waren vergleichbar hinsichtlich ihres Potentials der Th17-Induktion. Andere Arbeiten belegen, dass die Ligation der TLR4-, TLR9- und NOD2-Rezeptoren eine Th17-Antwort begünstigt (Higgins et al. 2006, Meyers et al. 2006, van Beelen et al. 2007).

Die in den Versuchen dieser Arbeit analysierten Effektorzellen, die TLR-Liganden-abhängig vermehrt bei AIH-Patienten induziert wurden, sind IL-17+CD8+ T-Zellen sowie IFN- γ - und TNF- α -doppelpositive CD8+ T-Zellen. Diese Ergebnisse könnten Ausdruck einer Suszeptibilität der Erkrankten für diese Liganden sein. Der Fokus vieler Arbeiten über eine Beteiligung von Th17-Zellen an Autoimmunerkrankungen richtete sich initial auf IL-17+CD4+ T-

Zellen. Erst durch neuere Arbeiten wurden IL-17+CD8+ T-Zellen und ihre Einordnung in inflammatorische Prozesse näher definiert. In einem humanen Modell konnten beispielsweise TLR-stimulierte Dendritische Zellen antigenspezifisch eine IL-17-Sekretion von CD8+ Zellen induzieren (Roses et al. 2008). Eine Beteiligung dieser IL-17+CD8+ T-Zellen an den Entzündungsvorgängen der AIH muss überprüft werden.

Es müssen folgende Punkte für weiterführende Arbeiten bedacht werden: unter der verwendeten Zellpopulation der PBMCs sind verschiedene Zellen summiert und somit lässt sich die zelluläre Quelle der aus den Kulturüberständen nachgewiesenen Zytokine nicht zurückverfolgen. Dendritische Zellen und Monozyten stellen potentielle Quellen von Zytokinen dar, um Differenzierungswege der Effektorzellen zu regulieren. Außerdem konnte nicht unterschieden werden, ob die vier analysierten Zytokine für die Differenzierungsvorgänge notwendig waren oder ob andere Signalmoleküle oder gar Zellkontakte den Ausschlag gaben. Weiterhin spiegelt dieser systemische Versuchansatz nicht das immunologische Milieu vor Ort in der Leber wieder, wo andere Zytokine, andere Effektorzellen und andere Zellverbände vorherrschend sein können.

Allgemein wurden in dieser Arbeit einzelne immunologische Aspekte sowohl auf der proinflammatorischen als auch auf der regulierenden Seite einer gestörten Balance bei der AIH untersucht. Es muss aber auch eine Untersuchung von möglichen Schnittstellen erfolgen. Als Beispiel hierfür sollen Monozyten bzw. gewebsständige Makrophagen genannt werden. Diese können durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, z.B. bedingt durch eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber der Aktivierung von TLR, an Autoimmunprozessen beteiligt sein und Effektorantworten formen (Burger 2000, Mao et al. 2005). Die Interaktion der Monozyten/Makrophagen mit den tolerogenen T_{reg}S ist sogar bidirektional: in homeostatischen Verhältnissen werden humane Monozyten/Makrophagen durch T_{reg}S reguliert, im Rahmen pathologischer Prozesse mindern Monozyten die Funktionalität von T_{reg}S, z.B. durch die Sekretion von TNF-α (Taams et al. 2005).

VI. Zusammenfassung

Das SLA/LP-Molekül stellt für diese Arbeit ein Autoantigen dar, anhand dessen für die AIH spezifische zelluläre Effektorantworten und T-Zell-Reaktionen analysiert werden konnten.

Zunächst wurde in einem murinen Transferversuch gezeigt, dass die Primärstimulation von Entzündungszellen mit dem SLA/LP-Protein durch den genetischen Hintergrund der IL-10 ^{-/-} Mäuse begünstigt wird. Mit dem SLA/LP-Protein aktivierte Lymphknotenzellen aus IL-10 ^{-/-} Mäusen konnten in gesunden Mäusen eine Hepatitis induzieren.

Auf der Effektorseite konnten beim Menschen entzündliche T-Zell-Reaktionen gegenüber dem SLA/LP-Antigen näher gehend beschrieben werden. Eine Effektorantwort ließ sich nur nachweisen, wenn die T-Zellen von AIH-Patienten stammten, die positiv für SLA/LP-Autoantikörper waren. Diese T-Zell-Antworten waren durch IFN- γ -exprimierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gekennzeichnet und lieferten signifikante Ergebnisse im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Eine gestörte antiinflammatorische T-Zellreaktion - gemessen an einer verminderten Frequenz von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) im peripheren Blut der Erkrankten - wurde nicht registriert. Die T_{reg}s wurden dabei anhand der relativ spezifischen Oberflächenmarker Foxp3, CD39 und CD127 definiert. Eine mögliche Dysfunktion der regulatorischen T-Zellen wurde allerdings nicht überprüft.

Der TLR4-Ligand LPS, der TLR5-Ligand Flagellin und der NOD2-Ligand MDP konnten modulierend auf die T-Zell-Antworten von AIH-Erkrankten einwirken. Diese Immunmodulation wurde anhand von resultierenden Zytokinmustern und T-Zell-Differenzierungen verifiziert. Dabei war von den untersuchten Zytokinen tendentiell IL-1 β für die AIH am relevantesten. Zum Teil bewirkten die TLR-Liganden eine Differenzierung zu proinflammatorischen IL-17⁺CD8⁺ T-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit umfassen einige neue Aspekte über T-Zellen und deren Beteiligung an der Pathogenese der Autoimmunen Hepatitis. Insbesondere die krankheitsspezifischen, proinflammatorischen Immunantworten gegenüber dem SLA/LP-Antigen erscheinen als vielversprechender Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten.

VII. Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout
AIH	Autoimmune Hepatitis
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
CD	Cluster of Differentiation
CFA	Complete Freund's Adjuvant = komplettes Freund'sches Adjuvans
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
DNA	Deoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäuren
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting = Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum = Fetales Kälberserum
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gy	Gray
HBV/HCV	Hepatitis-B-Virus/ Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen = Humanes Leukozytenantigen
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
LKM	Liver Kidney Microsomes = Leber- und Nierenmikrosomen
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichoic Acid = Lipoteichonsäure
MDP	Muramyldipeptid
MHC	Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
ODN	Oligodinukleotid

PBC	Primär Biliäre Zirrhose
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells = periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PGN	Peptidoglycan
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
P/S	Penicillin/Streptomycin
RE/ml	Relative Einheiten/Milliliter
RNA	Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäuren
RT	Raumtemperatur
SLA/LP	Soluble Liver Antigen/Liver Pancreas antigen = lösliches Leberantigen/Leber-Pankreas-Antigen
SMA	Smooth Muscle Antibody = Antikörper gegen glatte Muskulatur
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp

VIII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Grafik 1.1	Übersicht der TLR und ihrer Liganden.....	17
Grafik 1.2	Nachweis des SLA/LP-Proteins.....	39
Grafik 1.3	Versuchsablauf vom Transferversuch 1.....	41
Grafik 1.4	Versuchsablauf vom Transferversuch 2.....	42
Grafik 1.5	Dichtegradientenzentrifugation.....	44
Grafik 2.1	Serumwerte von GOT bei Transfer-Versuch 1.....	58
Grafik 2.2	Serumwerte von GPT bei Transfer-Versuch 1.....	58
Grafik 2.3	Serumwerte von GOT bei Transfer-Versuch 2.....	59
Grafik 2.4	Serumwerte von GPT bei Transfer-Versuch 2.....	59
Grafik 2.5	Histologien der Transferversuche.....	60
Grafik 3.1	Versuchsablauf von SLA/LP-spezifischen Zelllinien.....	63
Grafik 3.2	Beispiel von FACS-Analysen der Zelllinien.....	66
Grafik 3.3	TNF-a+CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation.....	67
Grafik 3.4	IL-17+CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation.....	67
Grafik 3.5	TNF-a+CD8+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation.....	68
Grafik 3.6	IL-17+CD8+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation.....	68
Grafik 3.7	IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation.....	69
Grafik 3.8	IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation.....	69
Grafik 3.9	IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA2 Peptid-Stimulation.....	70
Grafik 3.10	IFN+CD8+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation.....	70
Grafik 3.11	IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation.....	71
Grafik 3.12	IFN+CD4+ Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation.....	71
Grafik 3.13	IFN+CD8+ Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation.....	72
Grafik 3.14	Beispiel von IL17+CD8+ T-Zellen der Zelllinien.....	72
Grafik 3.15	IL17+CD8 Zelllinien nach SLA1 Peptid-Stimulation.....	73
Grafik 3.16	IL17+CD8 Zelllinien nach SLA2 Peptid-Stimulation.....	73
Grafik 3.17	IL17+CD8 Zelllinien nach SLA Protein-Stimulation.....	74
Grafik 4.1	Beispiele von FACS-Analysen der T _{reg}	77
Grafik 4.2	T _{reg} -Frequenz anhand von CD39.....	78
Grafik 4.3	T _{reg} -Frequenz anhand von CD127 ^{low}	78
Grafik 4.4	T _{reg} -Frequenz anhand von Foxp3.....	79
Grafik 4.5	Anteil der CD25+ an CD4+ T-Zellen.....	79

Grafik 4.6	Anteil der Foxp3+ an CD4+CD25+ T-Zellen.....	80
Grafik 5.1	Versuchsaufbau von TLR-Stimulationen.....	81
Grafik 5.2	IL-1β ELISA nach Stimulation mit LPS.....	84
Grafik 5.3	IL-1β ELISA nach Stimulation mit MDP.....	84
Grafik 5.4	IL-6 ELISA nach Stimulation mit Poly(I:C).....	85
Grafik 5.5	IL-21 ELISA nach Stimulation mit Poly(I:C).....	85
Grafik 5.6	IL-21 ELISA nach Stimulation mit LTA.....	86
Grafik 5.7	IL-23 ELISA nach Stimulation mit ODN 2395.....	86
Grafik 5.8	Differenzierung nach Stimulation mit Poly(I:C).....	87
Grafik 5.9	Differenzierung nach Stimulation mit Flagellin.....	87
 Tabelle 1	 Antigene zur Stimulation der Zelllinien.....	 47
Tabelle 2	Aminosäuresequenzen der eingesetzten Peptide.....	47
Tabelle 3	Eingesetzte Toll-like Rezeptor-Liganden.....	53
Tabelle 4	Patientenkollektiv.....	62

IX. Literaturverzeichnis

- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007).** Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8(9): 942-949.
- Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, Neuhaus P, Lerut J, Salizzoni M, Pollard S, Muhlbacher F, Rogiers X, Garcia Valdecasas JC, Berenguer J, Jaeck D, Moreno Gonzalez E (2003).** Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 9(12): 1231-1243.
- Aggarwal S und Gurney AL (2002).** IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 71(1): 1-8.
- Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM (1996).** Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev* 152: 21-45.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001).** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857): 732-738.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M, et al. (1999).** International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 31(5): 929-938.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001).** CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167(3): 1245-1253.
- Baeres M, Herkel J, Czaja AJ, Wies I, Kanzler S, Cancado EL, Porta G, Nishioka M, Simon T, Daehnrich C, Schlumberger W, Galle PR, Lohse AW (2002).** Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 51(2): 259-264.
- Bambha K, Kim WR, Talwalkar J, Torgerson H, Benson JT, Therneau TM, Loftus EV, Jr., Yawn BP, Dickson ER, Melton LJ, 3rd (2003).** Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a United States community. *Gastroenterology* 125(5): 1364-1369.
- Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grutzkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Turbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J (2007).** DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37(9): 2378-2389.
- Benoist C und Mathis D (2001).** Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2(9): 797-801.

- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006).** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441(7090): 235-238.
- Blasius AL und Beutler B (2010).** Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32(3): 305-315.
- Bluestone JA und Abbas AK (2003).** Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3(3): 253-257.
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk K (2007).** Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110(4): 1225-1232.
- Burger D (2000).** Cell contact-mediated signaling of monocytes by stimulated T cells: a major pathway for cytokine induction. *Eur Cytokine Netw* 11(3): 346-353.
- Buxbaum J, Qian P, Allen PM, Peters MG (2008).** Hepatitis resulting from liver-specific expression and recognition of self-antigen. *J Autoimmun* 31(3): 208-215.
- Cario E und Podolsky DK (2000).** Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68(12): 7010-7017.
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P (1998).** Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 161(1): 409-414.
- Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK (2000).** Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192(1): 123-128.
- Chung IY, Dong HF, Zhang X, Hassanein NM, Howard OM, Oppenheim JJ, Chen X (2004).** Effects of IL-7 and dexamethasone: induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4+ cells. *Cell Immunol* 232(1-2): 57-63.
- Corpechot C, Carrat F, Bahr A, Chretien Y, Poupon RE, Poupon R (2005).** The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 128(2): 297-303.
- Cowling DC, Mackay IR, Taft LI (1956).** Lupoid hepatitis. *Lancet* 271(6957): 1323-1326.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003).** Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421(6924): 744-748.
- Czaja AJ, Kruger M, Santrach PJ, Moore SB, Manns MP (1997).** Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 92(12): 2197-2200.
- Czaja AJ (2005).** Autoantibodies in autoimmune liver disease. *Adv Clin Chem* 40: 127-164.

- Czaja AJ (2008).** Genetic factors affecting the occurrence, clinical phenotype, and outcome of autoimmune hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6(4): 379-388.
- Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC (2008).** Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 31(3): 252-256.
- Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, Feigenbaum L, Town T, Ward JM, Flavell RA, Bolland S (2007).** Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* 27(5): 801-810.
- Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T, Wiedenmann B, Ploegh HL, Schott E (2007).** Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology* 46(4): 1155-1165.
- Devendra D, Jasinski J, Melanitou E, Nakayama M, Li M, Hensley B, Paronen J, Moriyama H, Miao D, Eisenbarth GS, Liu E (2005).** Interferon-alpha as a mediator of polyinosinic:polycytidylic acid-induced type 1 diabetes. *Diabetes* 54(9): 2549-2556.
- Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR (1997).** Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 71(8): 6011-6019.
- Donaldson PT (2002).** Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 22(4): 353-364.
- Dooms H und Abbas AK (2006).** Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators. *Immunol Rev* 211: 23-38.
- Earle KE, Tang Q, Zhou X, Liu W, Zhu S, Bonyhadi ML, Bluestone JA (2005).** In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* 115(1): 3-9.
- Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C (2004).** Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200(3): 277-285.
- Evans HG, Suddason T, Jackson I, Taams LS, Lord GM (2007).** Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43): 17034-17039.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003).** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4): 330-336.
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G (2009).** Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227(1): 106-128.
- Frenzel C, Herkel J, Luth S, Galle PR, Schramm C, Lohse AW (2006).** Evaluation of F-actin ELISA for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 101(12): 2731-2736.
- Gantner F, Leist M, Kusters S, Vogt K, Volk HD, Tiegs G (1996).** T cell stimulus-induced crosstalk between lymphocytes and liver macrophages results in augmented cytokine release. *Exp Cell Res* 229(1): 137-146.

- Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY (2006).** Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(17): 6659-6664.
- Gohlke F, Lohse AW, Dienes HP, Löhr H, Marker-Hermann E, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH (1996).** Evidence for an overlap syndrome of auto-immune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 24(6): 699-705.
- Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP (2005).** Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 174(3): 1259-1268.
- Gorham JD, Lin JT, Sung JL, Rudner LA, French MA (2001).** Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis. *J Immunol* 166(10): 6413-6422.
- Goulis J, Leandro G, Burroughs AK (1999).** Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Lancet* 354(9184): 1053-1060.
- Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, Mowat AP, Vergani D, Mieli-Vergani G (1997).** Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 25(3): 541-547.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997).** A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652): 737-742.
- Hanley PJ, Musset B, Renigunta V, Limberg SH, Dalpke AH, Sus R, Heeg KM, Preisig-Muller R, Daut J (2004).** Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(25): 9479-9484.
- Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK (2003).** Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* 170(9): 4432-4436.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005).** Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6(11): 1123-1132.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001).** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410(6832): 1099-1103.
- He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H (2006).** CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 177(10): 6852-6858.

- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004).** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663): 1526-1529.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000).** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-745.
- Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Pares A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW (2008).** Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 48(1): 169-176.
- Herkel J, Heidrich B, Nieraad N, Wies I, Rother M, Lohse AW (2002).** Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas. *Hepatology* 35(2): 403-408.
- Herkel J, Manns MP, Lohse AW (2007).** Selenocysteine, soluble liver antigen/liver-pancreas, and autoimmune hepatitis. *Hepatology* 46(1): 275-277.
- Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH (2006).** TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177(11): 7980-7989.
- Holdener M, Hintermann E, Bayer M, Rhode A, Rodrigo E, Hintereder G, Johnson EF, Gonzalez FJ, Pfeilschifter J, Manns MP, Herrath MG, Christen U (2008).** Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J Exp Med* 205(6): 1409-1422.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003).** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609): 1057-1061.
- Invernizzi P, Crosignani A, Battezzati PM, Covini G, De Valle G, Larghi A, Zuin M, Podda M (1997).** Comparison of the clinical features and clinical course of antimitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 25(5): 1090-1095.
- Invernizzi P und Mackay IR (2008).** Autoimmune liver diseases. *World J Gastroenterol* 14(21): 3290-3291.
- Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006).** The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126(6): 1121-1133.
- Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thorn M, Ohlsson R, Winqvist O (2008).** FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One* 3(2): e1612.
- Kanzler S, L  hr H, Gerken G, Galle PR, Lohse AW (2001).** Long-term management and prognosis of autoimmune hepatitis (AIH): a single center experience. *Z Gastroenterol* 39(5): 339-341, 344-338.
- Kaplan MM und Gershwin ME (2005).** Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 353(12): 1261-1273.

- Karrar A, Broome U, Sodergren T, Jaksch M, Bergquist A, Bjornstedt M, Sumitran-Holgersson S (2007).** Biliary epithelial cell antibodies link adaptive and innate immune responses in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 132(4): 1504-1514.
- Kattah MG, Wong MT, Yocum MD, Utz PJ (2008).** Cytokines secreted in response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human Th17 cells. *Arthritis Rheum* 58(6): 1619-1629.
- Kawai T und Akira S (2007).** Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13(11): 460-469.
- Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH (2006).** Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203(4): 883-895.
- Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, Bianchi F, Williams R, Mieli-Vergani G, Vergani D (2003).** Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 170(3): 1481-1489.
- Kido M, Watanabe N, Okazaki T, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Nishio A, Honjo T, Chiba T (2008).** Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. *Gastroenterology* 135(4): 1333-1343.
- Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, Coppel RL, Kaplan MM, Gershwin ME (2002a).** Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 109(9): 1231-1240.
- Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, Luketic V, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME (2002b).** Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med* 195(1): 113-123.
- Klatskin G (1958).** Subacute hepatic necrosis and postnecrotic cirrhosis due to anicteric infections with the hepatitis virus. *Am J Med* 25(3): 333-358.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006).** IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177(1): 566-573.
- Krawitt EL (2006).** Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 354(1): 54-66.
- Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL, Aujla SJ, Reardon B, Moore M, Shea P, Schreckhise R, Bukowski TR, Presnell S, Guerra-Lewis P, Parrish-Novak J, Ellsworth JL, Jaspers S, Lewis KE, Appleby M, Kolls JK, Rixon M, West JW, Gao Z, Levin SD (2007).** Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* 179(8): 5462-5473.
- Ia 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(3): 1611-1617.

- Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W, Moritoki Y, Ansari AA, Kemper C, Price J, Atkinson JP, Coppel RL, Gershwin ME (2009).** Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 32(1): 43-51.
- Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM (2005).** Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 11(2): 138-145.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005).** IL-23 drives a pathogenic Tcell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201(2): 233-240.
- Lee YM und Kaplan MM (1995).** Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 332(14): 924-933.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA (2006).** Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203(10): 2271-2279.
- Liew FY, Komai-Koma M, Xu D (2004).** A toll for T cell costimulation. *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2: ii76-ii78.
- Linden A (2001).** Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 126(3): 179-184.
- Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VA, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, Harnois D, Jorgensen R, Petz J, Keach J, Mooney J, Sargeant C, Braaten J, Bernard T, King D, Miceli E, Schmoll J, Hoskin T, Thapa P, Enders F (2009).** High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 50(3): 808-814.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006).** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203(7): 1701-1711.
- Löhr H, Treichel U, Poralla T, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B (1990).** The human hepatic asialoglycoprotein receptor is a target antigen for liver-infiltrating T cells in autoimmune chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 12(6): 1314-1320.
- Löhr H, Manns M, Kyriatsoulis A, Lohse AW, Trautwein C, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B (1991).** Clonal analysis of liver-infiltrating T cells in patients with LKM-1 antibody-positive autoimmune chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 84(2): 297-302.
- Löhr HF, Schlaak JF, Lohse AW, Bocher WO, Arenz M, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH (1996).** Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticlonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 24(6): 1416-1421.
- Lohse AW, Manns M, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH, Cohen IR (1990).** Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology* 11(1): 24-30.
- Lohse AW (1991).** Experimental models of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 11(3): 241-247.

- Lohse AW, Gerken G, Mohr H, Löhr HF, Treichel U, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH (1995).** Relation between autoimmune liver diseases and viral hepatitis: clinical and serological characteristics in 859 patients. *Z Gastroenterol* 33(9): 527-533.
- Lohse AW, zum Buschenfelde KH, Franz B, Kanzler S, Gerken G, Dienes HP (1999).** Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatitic form of PBC in genetically susceptible individuals. *Hepatology* 29(4): 1078-1084.
- Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D (2004).** Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 41(1): 31-37.
- Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, Bogdanos DP, Heneghan M, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D (2005).** Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 25(1): 63-71.
- Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y (2006).** Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 176(7): 4484-4491.
- Longhi MS, Meda F, Wang P, Samyn M, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y (2008).** Expansion and de novo generation of potentially therapeutic regulatory T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 47(2): 581-591.
- Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D (2009).** Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 34(1): 7-14.
- Lüth S und Lohse AW (2006).** Autoimmune hepatitis. *Clin Med* 6(1): 25-28.
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A (2003).** Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198(3): 513-520.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006).** Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441(7090): 231-234.
- Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Buschenfelde KH (1987).** Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1(8528): 292-294.
- Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF (1991).** LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 88(4): 1370-1378.
- Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, Coppel RL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME (2005).** Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 42(4): 802-808.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997).** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640): 394-397.
- Medzhitov R und Janeway CA, Jr. (1998).** Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 10(5): 351-353.

- Meyers JA, Mangini AJ, Nagai T, Roff CF, Sehy D, van Seventer GA, van Seventer JM (2006).** Blockade of TLR9 agonist-induced type I interferons promotes inflammatory cytokine IFN-gamma and IL-17 secretion by activated human PBMC. *Cytokine* 35(5-6): 235-246.
- Mieli-Vergani G und Vergani D (2009).** Autoimmune hepatitis in children: what is different from adult AIH? *Semin Liver Dis* 29(3): 297-306.
- Migliaccio C, Van de Water J, Ansari AA, Kaplan MM, Coppel RL, Lam KS, Thompson RK, Stevenson F, Gershwin ME (2001).** Heterogeneous response of antimitochondrial autoantibodies and bile duct apical staining monoclonal antibodies to pyruvate dehydrogenase complex E2: the molecule versus the mimic. *Hepatology* 33(4): 792-801.
- Mix H, Weiler-Normann C, Thimme R, Ahlenstiel G, Shin EC, Herkel J, David CS, Lohse AW, Rehmann B (2008).** Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 135(6): 2107-2118.
- Mori Y, Mori T, Ueda S, Yoshida H, Iesato K, Wakashin Y, Wakashin M, Okuda K (1985).** Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice: transfer of spleen cells sensitized with liver proteins. *Clin Exp Immunol* 61(3): 577-584.
- Moseley TA, Haudenschield DR, Rose L, Reddi AH (2003).** Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(2): 155-174.
- Muratori P, Czaja AJ, Muratori L, Pappas G, Maccariello S, Cassani F, Granito A, Ferrari R, Mantovani V, Lenzi M, Bianchi FB (2005).** Genetic distinctions between autoimmune hepatitis in Italy and North America. *World J Gastroenterol* 11(12): 1862-1866.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A (2000).** Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164(11): 5998-6004.
- Nishioka M (1998).** Heterogeneity of antigenic sites recognized by anti-liver/kidney microsomal antibody type I in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 33(4): 606-608.
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C (2007).** Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448(7152): 480-483.
- Obst R, van Santen HM, Mathis D, Benoist C (2005).** Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *J Exp Med* 201(10): 1555-1565.
- Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Koda T, Nishimura S, Iwakura Y, Sekikawa K, Nishimura T (2000).** Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen. *J Immunol* 165(2): 956-961.
- Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM (2000).** Cooperative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 6(5): 393-396.

- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005).** A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11): 1133-1141.
- Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S (2006).** Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 312(5780): 1669-1672.
- Pratt DS, Fawaz KA, Rabson A, Dellelis R, Kaplan MM (1997).** A novel histological lesion in glucocorticoid-responsive chronic hepatitis. *Gastroenterology* 113(2): 664-668.
- Reijonen H, Mallone R, Heninger AK, Laughlin EM, Kochik SA, Falk B, Kwok WW, Greenbaum C, Nepom GT (2004).** GAD65-specific CD4+ T-cells with high antigen avidity are prevalent in peripheral blood of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 53(8): 1987-1994.
- Rizzetto M, Swana G, Doniach D (1973).** Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 15(3): 331-344.
- Roda JM, Parihar R, Carson WE, 3rd (2005).** CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells. *J Immunol* 175(3): 1619-1627.
- 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(2): 217-225.
- Roses RE, Xu S, Xu M, Koldovsky U, Koski G, Czerniecki BJ (2008).** Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. *J Immunol* 181(7): 5120-5127.
- Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T (1985).** Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161(1): 72-87.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995).** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3): 1151-1164.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T (2001).** Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182: 18-32.
- Sakaguchi S (2004).** Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.
- Scheiffarth F, Warnatz H, Mayer K (1967).** Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis. *J Immunol* 98(2): 396-401.

- Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (1998).** Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4⁺CD28⁻ T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 161(2): 1018-1025.
- Schlaak JF, Löhr H, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B (1993).** Analysis of the in vitro cytokine production by liver-infiltrating T cells of patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 94(1): 168-173.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999).** Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274(25): 17406-17409.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, 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(7): 1693-1700.
- Shevach EM (2009).** Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30(5): 636-645.
- Shigematsu H, Shimoda S, Nakamura M, Matsushita S, Nishimura Y, Sakamoto N, Ichiki Y, Niho Y, Gershwin ME, Ishibashi H (2000).** Fine specificity of T cells reactive to human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant auto-antigen in primary biliary cirrhosis: implications for molecular mimicry and cross-recognition among mitochondrial autoantigens. *Hepatology* 32(5): 901-909.
- Shimoda S, Harada K, Niino H, Yoshizumi T, Soejima Y, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakamura M, Komori A, Migita K, Nakanuma Y, Ishibashi H, Selmi C, Gershwin ME (2008).** Biliary epithelial cells and primary biliary cirrhosis: the role of liver-infiltrating mononuclear cells. *Hepatology* 47(3): 958-965.
- Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M (1999).** Expression of IL-17 in human memory CD45RO⁺ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine* 11(4): 257-266.
- Simone R, Floriani A, Saverino D (2009).** Stimulation of Human CD4 T Lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 Up-Regulates Expression of Costimulatory and Modulates Proliferation. *Open Microbiol J* 3: 1-8.
- Stechemesser E, Klein R, Berg PA (1993).** Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 18(1): 1-9.
- Strassburg CP und Manns MP (2002).** Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 22(4): 339-352.
- Suzuki Y, Kobayashi M, Hosaka T, Someya T, Akuta N, Suzuki F, Tsubota A, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Matsuda M, Sato J, Miyakawa Y, Kumada H (2004).** Peripheral CD8⁺/CD25⁺ lymphocytes may be implicated in hepatocellular injuries in patients with acute-onset autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol* 39(7): 649-653.
- Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP (2005).** Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol* 66(3): 222-230.

- Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML (2006).** Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 203(3): 505-511.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003).** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999).** Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11(4): 443-451.
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S (2000).** Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164(2): 554-557.
- Teufel A, Worns M, Weinmann A, Centner C, Piendl A, Lohse AW, Galle PR, Kanzler S (2006).** Genetic association of autoimmune hepatitis and human leucocyte antigen in German patients. *World J Gastroenterol* 12(34): 5513-5516.
- Teufel A, Galle PR, Kanzler S (2009).** Update on autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 15(9): 1035-1041.
- Theofilopoulos AN (1995).** The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today* 16(3): 150-159.
- Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Shichiri M, Yamamura K (1994).** Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 614-618.
- Tsianos EV, Hoofnagle JH, Fox PC, Alspaugh M, Jones EA, Schafer DF, Moutsopoulos HM (1990).** Sjogren's syndrome in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 11(5): 730-734.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A (1999).** The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401(6755): 811-815.
- van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS (2004).** CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 50(9): 2775-2785.
- van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SA, Kapsenberg ML, de Jong EC (2007).** Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27(4): 660-669.
- van de Water J, Surh CD, Leung PS, Krams SM, Fregeau D, Davis P, Coppel R, Mackay IR, Gershwin ME (1989).** Molecular definitions, autoepitopes, and enzymatic activities of the mitochondrial autoantigens of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 9(2): 132-137.
- van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, Bruijn JA, De Fijter JW, Van Es LA, Daha MR (1998).** Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 9(8): 1526-1534.

- Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe 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(6): 650-657.
- Waldenström J (1950).** Leber, Blutproteine und Nahrungseiweiss. *Dtsch Ges Verdau Stoffwechselkr* 15: 113-119.
- Walker MR, Kasprawicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF (2003).** Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112(9): 1437-1443.
- Wang AP, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H (2005).** Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 25(1): 85-91.
- Wang CX, Teufel A, Cheruti U, Grotzinger J, Galle PR, Lohse AW, Herkel J (2006).** Characterization of human gene encoding SLA/LP autoantigen and its conserved homologs in mouse, fish, fly, and worm. *World J Gastroenterol* 12(6): 902-907.
- Weiner HL (2001).** Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182: 207-214.
- Wen L, Peakman M, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D (1990).** T-cell-directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 336(8730): 1527-1530.
- Werner M, Prytz H, Ohlsson B, Almer S, Bjornsson E, Bergquist A, Wallerstedt S, Sandberg-Gertzen H, Hultcrantz R, Sangfelt P, Weiland O, Danielsson A (2008).** Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 43(10): 1232-1240.
- Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, von Andrian UH, Ahmed R (2003).** Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4(3): 225-234.
- Whitacre CC (2001).** Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2(9): 777-780.
- Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW (2000).** Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 355(9214): 1510-1515.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R (2007).** Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8(9): 950-957.
- Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM (2007).** Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem* 282(18): 13447-13455.
- Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, Schwarzenberger P, Shellito JE, Kolls JK (2001).** Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(3): 335-340.

- Yuan J, Palioura S, Salazar JC, Su D, O'Donoghue P, Hohn MJ, Cardoso AM, Whitman WB, Soll D (2006).** RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): 18923-18927.
- Zhang SY, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, von Bernuth H, Yang K, Abel L, Picard C, Puel A, Casanova JL (2007).** Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev* 220: 225-236.

X. Danksagungen

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. Ansgar W. Lohse dafür bedanken, dass ich innerhalb seiner Klinik meine Doktorarbeit anfertigen durfte. Durch Seminare, klinische Vorlesungen und Vorträge weckte er mein Interesse an der Autoimmunen Hepatitis und meinen forschersischen Ehrgeiz.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, PD Dr. Johannes Herkel, insbesondere für das große Vertrauen und die Freiheiten, die ich für meine Arbeit genießen durfte. Sein stetiger Rat war mir eine große Hilfe.

Ich bedanke mich bei PD Dr. Christoph Schramm, der mir durch seine Arbeit in der I. Medizinischen Klinik bei der Bereitstellung von Patientenblut sehr behilflich war und ohne dessen Engagement große Teile meiner Doktorarbeit niemals so reibungslos verlaufen wären.

Ich danke auch Dr. Christina Weiler-Normann für die praktische Einarbeitung im Labor und die fortdauernde Unterstützung. Die praktische und thematische Betreuung war äußerst hilfreich.

Bedanken möchte ich mich auch bei Felix Rolf Stahl, der zeitgleich mit mir seine experimentelle Arbeit im Labor durchgeführt hat. Die fachlichen Gespräche mit ihm waren eine Bereicherung.

Für die herzliche kollegiale Zusammenarbeit danke ich Antonella Carambia, Dorothee Schwinge und Tanja Trautmann.

Für die stetige technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft danke ich Marko Hilken, Agnes Malotta, Meike Petersen, Nicola Peters und Helga Reschke.

Ich möchte abschließend dem Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danken, das diese Arbeit durch ein Stipendium unterstützt hat. Die forschersische Ausbildung, die ich dadurch erhalten habe, bildet einen Grundstein meiner Karriere.

XI. Lebenslauf

Name	Marcial Sebode
Geburtsort	Northeim
Geburtsdatum	06.12.1981

Juni 2001	Schulabschluss „Allgemeine Hochschulreife“, Willich-Schiefbahn
-----------	--

Ab Oktober 2003	Medizinstudium, Universität Hamburg
-----------------	-------------------------------------

September 2005	Abschluss „Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“
----------------	---

Famulaturen

August 2006	Hämatologie/Onkologie, Gemeinschaftspraxis Detken/Seraphin, Northeim
-------------	---

September 2006	Innere Medizin, Krankenhaus Neu-Mariahilf, Göttingen
----------------	---

Oktober 2006	Unfallchirurgie, Universitätsklinikum, Bonn
--------------	---

November 2006	Gastroenterologie, Universitätsklinikum, Düsseldorf
---------------	---

Doktorarbeit

August 2007 bis August 2009	Doktorarbeit in der I. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
--------------------------------	--

Oktober 2007 bis Oktober 2008	Stipendium des Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“ des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf
----------------------------------	--

Praktisches Jahr

August 2009 bis Dezember 2009	Chirurgie, G. F. Jooste Hospital, Kapstadt, Südafrika
----------------------------------	---

Dezember 2009 bis Februar 2010	Innere Medizin, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
-----------------------------------	---

Februar 2010 bis April 2010	Innere Medizin, King's College Hospital, London, UK
--------------------------------	---

April 2010 bis Juli 2010	Tropenmedizin, Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
-----------------------------	---

XII. 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.

Unterschrift: