

Charakterisierung extra- und intrahepatischer T-Zellen in der Autoimmunen Hepatitis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Claudia Simone Bovensiepen

aus Gera

Hamburg, Juni 2015

Gutachter

1. PD Dr. Johannes Herkel

I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Prof. Dr. Susanne Dobler

Zoologisches Institut an der Universität Hamburg

Tag der Disputation

04. September 2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Immunbiologie der T-Zellen	2
1.2.1 Immunabwehr durch T-Zellen	2
1.2.2 Der T-Zellrezeptor.....	5
1.3 Die Leber.....	6
1.3.1 Funktion und Aufbau der Leber.....	6
1.3.2 Die Leber als immunologisches Organ	7
1.3.3 T-Zellen in der Leber.....	8
1.4 Autoimmune Lebererkrankungen	9
1.4.1 Überblick.....	9
1.4.2 Die Autoimmune Hepatitis	10
1.4.3 Rekrutierung von T-Zellen in die entzündete Leber.....	14
1.5 Fragestellung	16
2 Patienten, Material und Methoden.....	17
2.1 Patienten und humanes Probenmaterial	17
2.1.1 Klinische Parameter der Patienten.....	17
2.1.2 Serumproben.....	19
2.1.3 Patientenkohorte zur Untersuchung des Serums	19
2.1.4 Buffy Coat und Vollblutproben.....	20
2.1.5 Patientenkohorte zur Untersuchung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut	20
2.1.6 Gewebeproben.....	22
2.1.7 Patientenkohorte zur Untersuchung leberinfiltrierender Lymphozyten	22
2.2 Material	25
2.2.1 Laborgeräte	25
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.2.3 Chemikalien, Kulturmedien, Reagenzien, Lösungen und Puffer	27
2.2.4 Zytokine, Enzyme, rekombinante Proteine und andere Substanzen	30
2.2.5 Synthetische Oligonukleotide.....	31
2.2.6 Antikörper.....	32
2.2.7 Fertigsysteme	33
2.2.8 Software	34

2.3	Zellbiologische Methoden	35
2.3.1	Aufreinigung und Kultivierung von Zellen	35
2.3.2	Isolierung mononukleärer Zellen aus humanem peripheren Blut	35
2.3.3	Isolierung humaner leberinfiltrierender Lymphozyten aus Leberbiopsien.....	36
2.3.4	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	36
2.3.5	Kultivierung humaner leberinfiltrierender Lymphozyten	37
2.3.6	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	38
2.4	Immunologische Methoden	39
2.4.1	Zytokinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA.....	39
2.4.2	Durchflusszytometrie	40
2.4.3	Klonalitätsbestimmung mittels Durchflusszytometrie	42
2.5	Molekularbiologische Methoden	43
2.5.1	RNA-Isolierung.....	43
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
2.5.3	Reverse Transkription.....	44
2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	45
2.6	Statistische Auswertung	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Untersuchung des Zytokinprofils im Serum von AIH-Patienten.....	48
3.1.1	T _H 1-assoziierte Zytokine im Serum.....	48
3.1.2	T _H 17-assoziiertes Zytokin im Serum	49
3.2	Charakterisierung der T-Zellen von AIH-Patienten	49
3.2.1	Verteilung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im PBMC-Kompartiment.....	50
3.2.2	Untersuchung T _H 1-assoziiierter Zytokine	51
3.2.3	Untersuchung T _H 17-assoziiierter Zytokine	59
3.2.4	Untersuchung T _H 2-assoziiierter Zytokine	65
3.2.5	Chemokine und Chemokinrezeptoren	68
3.2.6	Koloniestimulierende Faktoren und zytotoxische Effektorproteine	74
3.3	Untersuchung des T-Zellrezeptors von leberinfiltrierenden Lymphozyten aus AIH-Patienten	77
3.3.1	Klonierung und Expansion von leberinfiltrierenden Lymphozyten.....	77
3.3.2	Durchflusszytometrische Charakterisierung der TCR V β -Ketten	78
4	Diskussion	83
4.1	Das extra- und intrahepatische T-Zellprofil von AIH-Patienten	83
4.1.1	Das lymphozytäre Verhältnis in der Peripherie von AIH-Patienten	83

4.1.2	Expression und Sekretion T _H 1-spezifischer Signaturzytokine	84
4.1.3	Expression und Sekretion T _H 17-spezifischer Signaturzytokine	86
4.1.4	Expression und Sekretion T _H 2-spezifischer Signaturzytokine	89
4.1.5	Der Tumornekrosefaktor α in der Autoimmunen Hepatitis.....	90
4.1.6	Expression von Chemokinrezeptoren und Chemokinen	92
4.1.7	Expression von Kolonierstimulierenden Faktoren und zytotoxischen Molekülen	94
4.2	Das Expansionsprofil leberinfiltrierender Lymphozyten von AIH-Patienten	95
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	97
4.3.1	Das T-Zellprofil von AIH-Patienten	97
4.3.2	Das T-Zellrezeptorrepertoire von AIH-Patienten	100
5	Zusammenfassung	102
6	Abstract.....	104
7	Anhang	106
7.1	Literaturverzeichnis	106
7.2	Abkürzungsverzeichnis	126
7.3	Kongressbeiträge.....	128
7.4	Danksagung	129
7.5	Eidesstattliche Erklärung	130

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Charakteristika von Subpopulationen der CD4 ⁺ T-Helferzellen.....	3
Abb. 2: Schematische Struktur des T-Zellrezeptors.	5
Abb. 3: Zellzusammensetzung einer gesunden Leber.....	8
Abb. 4: Mechanismen des Leberschadens in der Autoimmunen Hepatitis.	13
Abb. 5: Chemokinrezeptorprofil von T _H 1- und T _H 17-Zellen.	14
Abb. 6: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation.....	35
Abb. 7: IFN γ - und TNF α -Zytokinprofil der Serumproben von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	48
Abb. 8: IL-17A-Zytokinprofil der Serumproben von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.....	49
Abb. 9: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz von CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen in AIH-Patienten und Kontrollprobanden..	50
Abb. 10: Frequenz der CD3 ⁺ , der CD3 ⁺ CD4 ⁺ und der CD3 ⁺ CD8 ⁺ PBMC von therapie-naïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.....	51
Abb. 11: Genexpressionsanalyse von <i>IL2</i> , <i>IFNG</i> und <i>TNF</i> in PBMC von therapie-naïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	52
Abb. 12: IFN γ - und TNF α -Sekretion der PBMC von therapie-naïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	53
Abb. 13: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz von IFN γ ⁺ , TNF α ⁺ und IFN γ ⁺ TNF α ⁺ Zellen innerhalb der CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellpopulation in AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	54
Abb. 14: Frequenz der IFN γ - und TNF α -produzierenden und IFN γ /TNF α -koproduzierenden CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im PBMC-Kompartiment von therapie-naïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	55
Abb. 15: Genexpressionsanalyse von <i>IL2</i> , <i>IFNG</i> und <i>TNF</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	57
Abb. 16: Frequenz der IFN γ - und TNF α -produzierenden und IFN γ /TNF α -koproduzierenden CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im LIL- und PBMC-Kompartiment von therapie-naïven AIH-Patienten..	58
Abb. 17: Genexpressionsanalyse von <i>IL17A</i> und <i>IL22</i> in PBMC von therapie-naïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden..	60
Abb. 18: IL-17A-Sekretion der PBMC von therapie-naïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	60

Abb. 19: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz von IL-17A ⁺ IFN γ ⁻ Zellen innerhalb der CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellpopulation in AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	61
Abb. 20: Frequenz der IL-17A-produzierenden CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im PBMC-Kompartiment von therapienaïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	62
Abb. 21: Genexpressionsanalyse von <i>TGFB1</i> und <i>IL6</i> in PBMC von therapienaïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden..	62
Abb. 22: Genexpressionsanalyse von <i>IL17A</i> und <i>IL22</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	63
Abb. 23: Frequenz der IL-17A-produzierenden CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im LIL- und PBMC-Kompartiment von therapienaïven AIH-Patienten.	64
Abb. 24: Genexpressionsanalyse von <i>TGFB1</i> und <i>IL6</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	65
Abb. 25: Genexpressionsanalyse von <i>IL4</i> , <i>IL10</i> und <i>IL13</i> in PBMC von therapienaïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	66
Abb. 26: Genexpressionsanalyse von <i>IL4</i> , <i>IL10</i> und <i>IL13</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	67
Abb. 27: Genexpressionsanalyse von <i>CXCR3</i> , <i>CCR5</i> und <i>CCR6</i> in PBMC von therapienaïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.....	69
Abb. 28: Genexpressionsanalyse von <i>CXCL9</i> , <i>CXCL10</i> und <i>CXCL11</i> in PBMC von therapienaïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	70
Abb. 29: Genexpressionsanalyse von <i>CCL5</i> in PBMC von therapienaïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.	71
Abb. 30: Genexpressionsanalyse von <i>CXCR3</i> , <i>CCR5</i> und <i>CCR6</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	72
Abb. 31: Genexpressionsanalyse von <i>CXCL9</i> , <i>CXCL10</i> und <i>CXCL11</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	73
Abb. 32: Genexpressionsanalyse von <i>CCL5</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.....	73
Abb. 33: Genexpressionsanalyse von <i>CSF1</i> und <i>CSF2</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	74
Abb. 34: Genexpressionsanalyse von <i>GNLY</i> , <i>GZMB</i> und <i>PRF1</i> in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden.	75
Abb. 35: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme einer potentiell monoklonalen T-Zellkultur.	78

Abb. 36: Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Messung von TCR V β -Ketten anhand einer Beispielfärbung.....	79
Abb. 37: Bestimmung der Klonalität und der TCR V β -Ketten potentiell monoklonaler T-Zellkulturen generiert aus LIL von AIH-Patienten.....	81
Tab. 1: Klinische Parameter der untersuchten Patienten.	17
Tab. 2: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Zytokinkonzentration im Serum.....	20
Tab. 3: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Genexpression in PBMC.	21
Tab. 4: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand..	21
Tab. 5: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur durchflusszytometrischen Frequenzanalyse der PBMC.	22
Tab. 6: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Genexpression in LIL.....	23
Tab. 7: Klinische Parameter der Patientenkohorten zur durchflusszytometrischen Frequenzanalyse bei LIL und PBMC von AIH-Patienten.	24
Tab. 8: Anzahl potentieller T-Zellklone isoliert aus den Leberbiopsien von vier AIH-Patienten nach visueller Beurteilung der Zellaggregation.	78

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Immunität ist definiert als der Widerstand gegenüber Krankheiten, im speziellen infektiöser Erkrankungen¹. Somit ist die Aufgabe des Immunsystems die Verteidigung des Organismus gegen extra- und intrazelluläre Pathogene, aber auch die Eliminierung von körperfremden Substanzen und schadhafte körpereigenen Zellen. Von eminenter Bedeutung ist dabei die Unterscheidung von körpereigenen Strukturen, die nicht angegriffen werden sollten und den zu beseitigenden Fremdstrukturen. Man unterteilt die humane Abwehr in die innate (angeborene) und in die adaptive (erworbene) Immunität. Da der menschliche Organismus permanent unterschiedlichen Pathogenen wie Bakterien, Viren und Pilzen ausgesetzt ist und diese Erreger ausgeklügelte Strategien zur Umgehung der schnellen Eliminierung durch das innate Immunsystem entwickelt haben, ist häufig die adaptive Immunantwort zur Kontrolle von Infektionen erforderlich². Beide Systeme unterscheiden sich in ihren Mechanismen und dem Großteil ihrer Effektorzellen, interagieren jedoch zur Generierung einer effektiven Immunantwort eng miteinander^{3,4}.

Das innate Immunsystem ist ein evolutionär hochgradig konserviertes und universelles Verteidigungssystem, welches schnell aber unspezifisch auf Pathogene und deren Bestandteile reagiert^{1,5,6}. Einen Teil des innaten Immunsystems bilden zelluläre Komponenten, welche im Blut zirkulieren oder im Gewebe residieren können. Dazu gehören Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen und Natürliche Killerzellen. Die innate Immunantwort wird innerhalb von Minuten initiiert und ist gegen ein breites Spektrum körperfremder Strukturen gerichtet. Die Identifizierung der Pathogene erfolgt durch universelle Rezeptoren der Immunzellen, die gegen konservierte, pathogeneigene Strukturen gerichtet sind. Innate Zellen einer Klasse besitzen identische polyklonale, keimbahnkodierte Rezeptoren^{6,7}, deren Struktur im Genom festgelegt und somit unabänderlich ist. Im Vergleich dazu weisen die Rezeptoren der Zellen des adaptiven Immunsystems eine hohe Diversität spezifischer Antigenrezeptoren auf⁸, was auf die zufällige somatische Rekombination verschiedener Gensegmente (Abschnitt 1.2.2) zurückzuführen ist. Als Antigen gilt jede Substanz, die vom adaptiven Immunsystem erkannt werden kann und eine Antwort (Reaktion) provoziert⁸. Die adaptive Immunantwort ist gegen spezifische pathogene Strukturen gerichtet und wirkt besonders effizient durch Expansion antigenspezifischer Lymphozyten, wobei jeder Lymphozyt nur Rezeptoren einer einzigen Spezifität aufweist. Aufgrund der klonalen Vervielfältigung dieser Zellen tritt die Antwort erst zeitverzögert ein. Das adaptive Immunsystem besteht aus B- und T-Zellen und deren Effektormolekülen⁹. B-Zellen sind die Träger der humoralen Immunantwort (lat. *humor* „Flüssigkeit“), da sie hauptsächlich über ihre sezernierten (löslichen) B-Zellrezeptoren, den Antikörpern, fungieren. T-Zellen, als Träger der zellulären Immunabwehr, sind in Abschnitt 1.2 erläutert.

1.2 Immunbiologie der T-Zellen

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Abwehr des adaptiven Immunsystems. Im Gegensatz zu Zellen der innate Immunantwort und B-Zellen, erkennen T-Zellen ihr Antigen nicht in nativer Form, sondern erst nach Prozessierung und Präsentation über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC; *major histocompatibility complex*)^{1,8}. Das MHC-Molekül der Klasse I (MHCI) wird auf fast allen kernhaltigen somatischen Zellen exprimiert und bindet Peptide, die aus intrazellulären Proteinen generiert werden. Die konstitutive Expression von MHCII ist weitestgehend auf Antigenpräsentierende Zellen (APC; *Antigen presenting cells*) wie Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen beschränkt und bindet Peptide, die aus extrazellulären, endozytotisch aufgenommenen Proteinen prozessiert werden. Die grobe Unterteilung von T-Zellen erfolgt anhand der Expression distinkter immunphänotypischer Oberflächenmoleküle, den sog. CD (*Cluster of Differentiation*) und der Erkennung distinkter MHC-Moleküle. So exprimieren zytotoxische T-Zellen (CTL; *cytotoxic T lymphocytes*) meist den Korezeptor CD8 und erkennen ihr Antigen im Kontext von MHCI^{1,8}. Diese Zellen wirken direkt zytotoxisch. Im Gegensatz dazu modulieren T-Helferzellen (T_H) ihre Umgebung durch die Sekretion von Zytokinen, also regulatorischen Proteinen, die die Immunantwort steuern. Sie tragen den Korezeptor CD4 und erkennen ihr Antigen über MHCII^{1,8}. Allen T-Zellen ist gemeinsam, dass sie den CD3-Rezeptor tragen^{1,8}.

1.2.1 Immunabwehr durch T-Zellen

1.2.1.1 Subpopulationen der T-Helferzellen

In welche Richtung eine naive T-Zelle nach Aktivierung differenziert, ist stark vom Zytokinmilieu abhängig und dieses ist wiederum durch die Art des zu bekämpfenden Pathogens beeinflusst. CD4⁺ T_H-Zellen differenzieren in Gegenwart von spezifischen Zytokinmilieus zu verschiedenen Subtypen, welche charakteristische Phänotypen aufweisen (Abb. 1). Durch die Expression liniendefinierender Transkriptionsfaktoren wird die Entwicklung, die Produktion der Effektorzytokine sowie der Phänotyp und ihre Funktion reguliert¹⁰. Man unterscheidet zwischen T_H1-, T_H2-, T_H17-Zellen und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Jüngere Publikationen beschreiben auch T_H1/17-^{11,12}, T_H9-^{13,14}, T_H22-^{15,16} und folliculäre T_H-Zellen (T_{FH})¹⁷.

Durch Interleukin (IL)-12 wird die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-Zellen induziert¹⁸, die den Transkriptionsfaktor Tbet (*T-box-expressed-in-T-cells*) exprimieren¹⁹. T_H1-Zellen sezernieren die Zytokine Interferon (IFN) γ , IL-2 und Tumornekrosefaktor (TNF) α ^{8,20-24}. Aktivierte T_H1-Zellen werden als Helfer der zellulären Immunabwehr betrachtet, da sie Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen nehmen, aber auch B-Zellhilfe bezüglich deren Antikörperproduktion leisten⁸. Außerdem können diese Zellen die CD8⁺ T-Zellantwort unterstützen²⁵. T_H1-Antworten stehen deshalb

in Verbindung mit der Beseitigung intrazellulärer Pathogene wie Bakterien und Viren, sind aber auch mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen assoziiert^{26,27}.

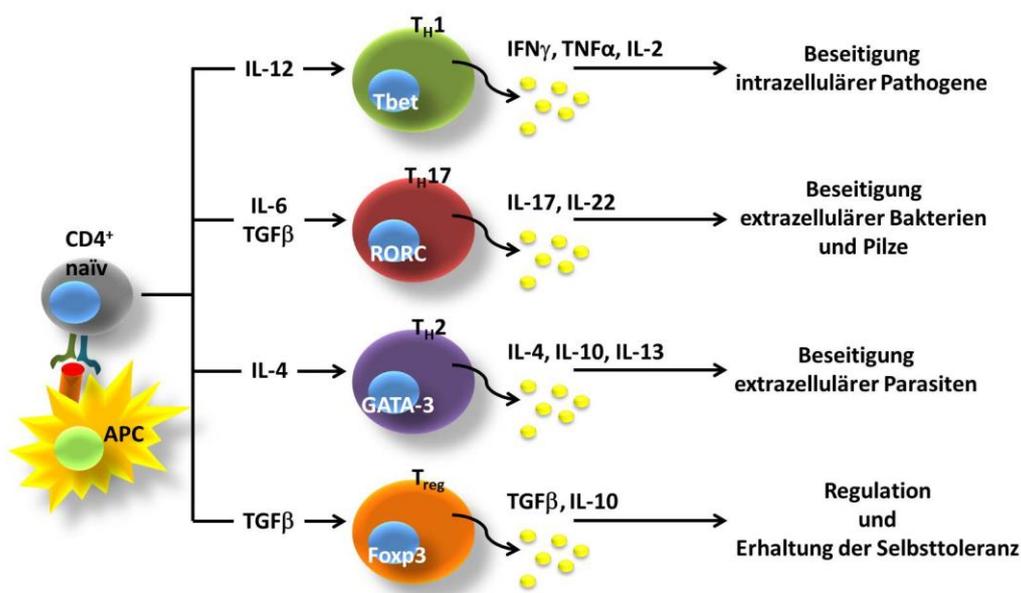


Abb. 1: Charakteristika von Subpopulationen der CD4⁺ T-Helferzellen. Naïve CD4⁺ T-Zellen können nach ihrer Aktivierung durch Antigenpräsentation je nach Zytokinmilieu zu distinkten Subtypen differenzieren, die durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren und der Sekretion typischer Zytokine charakterisiert sind. Die CD4⁺ T-Zellsubtypen sind durch unterschiedliche Effektorfunktionen definiert. APC = Antigenpräsentierende Zelle (*Antigen presenting cell*); IFN = Interferon; IL = Interleukin; TGF = Transformierender Wachstumsfaktor (*Transforming Growth Factor*); T_H = T-Helferzelle; TNF = Tumornekrosefaktor. (adaptiert nach Abbas *et al.* 2012¹, Murphy *et al.* 2008⁸, Korn *et al.* 2009²⁸ und Zheng *et al.* 1997²⁹)

Dahingegen sind T_H17-Zellen in die Eliminierung von extrazellulären Bakterien und Pilzen involviert. Des Weiteren wurde aber auch eine Beteiligung in der Pathogenese von organspezifischen Autoimmunerkrankungen festgestellt³⁰. Diese Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor RORγT (*retinoic acid-related orphan receptor γT*)³¹ bzw. im humanen System das Homolog RORC²⁸, welcher die Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 induziert^{28,32-34}. Diese Zytokine sind für die Rekrutierung, Aktivierung und Migration von neutrophilen Granulozyten unabdingbar³⁰. Naïve CD4⁺ T-Zellen differenzieren in Gegenwart des Transformierenden Wachstumsfaktors (*Transforming Growth Factor*; TGF)β und von IL-6 zu T_H17-Zellen^{28,35,36}.

Extrazelluläre Parasiten, wie Helminthen, werden mittels aktivierter T_H2-Zellen bekämpft. Diese können außerdem eine starke Antikörperproduktion durch B-Zellen induzieren, wodurch sie an der humoralen Immunantwort beteiligt sind^{8,22}. Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T_H2-Zellen erfolgt in Gegenwart von IL-4³⁷. T_H2-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA-3 (*GATA binding protein 3*) und charakteristische Zytokine sind IL-4, IL-10 und IL-13^{22,29}.

Eine weitere Form von T_H -Zellen sind die Foxp3 (*forkhead-box protein 3*)-exprimierenden T_{reg} , die autoreaktive Immunantworten supprimieren und so die immunologische Selbsttoleranz und Immunhomöostase des Organismus aktiv regulieren³⁸. Es ist gezeigt, dass eine Dysfunktion des Transkriptionsfaktors Foxp3 mit Autoimmunität korreliert³⁹ und eine anhaltende Foxp3-Expression für den Phänotyp und die Suppressorfunktion der T_{reg} entscheidend ist⁴⁰. Naïve $CD4^+$ T-Zellen differenzieren zu T_{reg} in Anwesenheit von TGF β , aber gleichzeitiger Abwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6⁴¹. Neben den beschriebenen natürlich vorkommenden nT_{reg} gibt es zusätzlich die induzierten iT_{reg} , zu denen Tr1-Zellen (Typ 1 regulatorische Zellen) und Th3-Zellen gehören⁴²⁻⁴⁴.

Klassischerweise wurden die verschiedenen $CD4^+$ T_H -Zellen als terminal ausdifferenzierte, stabile Zelllinien mit begrenzter Flexibilität angesehen⁴⁵. Die Identifizierung neuer Subpopulationen weist jedoch auf eine erhebliche Plastizität unter den T_H -Subpopulationen hin. Hierbei wird klassischen T_H1 -Zellen eine geringe und T_H2 -Zellen eine mittlere Plastizität zugewiesen⁴⁶, während iT_{reg} und T_H17 -Zellen ein hohes Maß an Plastizität zugesprochen wird⁴⁷. So können letztgenannte zu $T_H1/17$ -Zellen und diese zu nichtklassischen T_H1 -Zellen weiter differenzieren⁴⁶.

Neben $CD4^+$ T-Zellen können auch $CD8^+$ T-Zellen zu verschiedenen Subpopulationen differenzieren, die die gleichen charakteristischen Zytokine wie T_H1 -, T_H2 und T_H17 -Zellen sezernieren und dementsprechend als T_C1 -, T_C2 und T_C17 -Zellen definiert sind^{48,49}.

1.2.1.2 Zytotoxische T-Zellen

CTL sind ein Typ von T-Zellen, deren hauptsächliche Effektorfunktion die Erkennung und Eliminierung von Zellen ist, die mit Viren oder anderen intrazellulären Pathogenen infiziert oder abnormal sind¹. Dabei handelt es sich meist um $CD8^+$ T-Zellen, selten um $CD4^+$ T-Zellen⁸. Diese Zellen sind direkt zytotoxisch aktiv, indem sie die Apoptose der Zielzelle über drei mögliche Wege induzieren können⁵⁰. Zum einen über eine granulaabhängige Exozytose, bei der nach Erkennung der Zielzelle über intrazelluläre Signalübertragung lytische Proteine wie Perforin, Granzyme und Granulysin freigesetzt werden⁵¹⁻⁵³. Zum anderen erfolgt die Apoptoseinduktion über interzelluläre Fas-Rezeptor/Ligand-Interaktionen, welche sowohl wichtig sind bei der Kontrolle konstant stimulierter T-Zellen und der Aufrechterhaltung der numerischen Zellhomöostase als auch bei der Förderung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen^{54,55}. Zuletzt gibt es den Pfad der Kreuzvernetzung von TNF mit TNF-Rezeptor Typ 1. TNF ist eine Zytokin, das von aktivierten Immunzellen produziert wird und die Zellapoptose induziert, aber auch entzündliche Prozesse sowie die Zellaktivierung und -differenzierung unterstützt⁵⁶⁻⁵⁸. Ebenso wie $CD4^+$ T_H1 -Zellen können auch $CD8^+$ CTL IFN γ produzieren, jedoch in wesentlich geringeren Mengen⁵⁹.

Neben $CD8^+$ CTL sind auch $CD4^+$ T-Zellen mit zytotoxischer Kapazität in der Literatur beschrieben^{60,61}. Diese besitzen ebenfalls Granula mit lytischen Proteinen wie Granzyme und Perforin, deren zytotoxische Aktivität jedoch über eine MHCII-Aktivierung propagiert wird^{62,63}. In gesunden Individuen scheinen durchschnittlich nicht mehr als 2 % der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation ein zytotoxisches Potential aufzuweisen⁶⁰.

1.2.2 Der T-Zellrezeptor

Allen T-Zellpopulationen ist gemeinsam, dass sie ihr Antigen über ihren T-Zellrezeptor (TCR; *T cell receptor*) erkennen (Abb. 2). Dabei handelt es sich um ein Heterodimer, das auf der Oberfläche der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen verankert ist¹. Der TCR konventioneller T-Zellen setzt sich aus je einer α - und β -Kette zusammen und kommt auf > 90 % der Zellen vor, während die Restlichen einen TCR aus je einer γ - und δ -Kette tragen und den unkonventionellen T-Zellen zugeordnet werden^{64,65}.

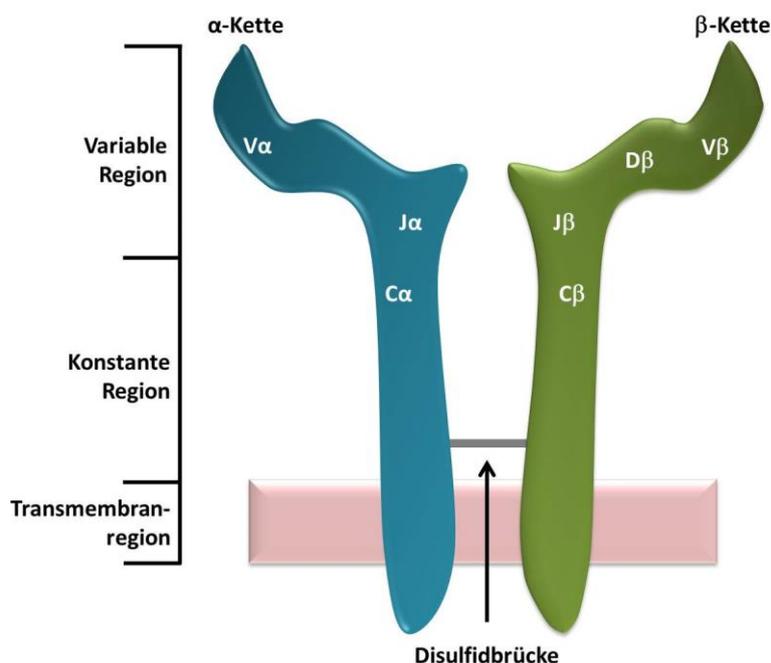


Abb. 2: Schematische Struktur des T-Zellrezeptors. Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer aus zwei transmembranen Glykoproteinketten, in der Regel eine α - und eine β -Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht aus einer V (variablen), einer C (konstanten)-Region sowie einem transmembranen und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich. Die V-Region setzt sich aus verschiedenen Segmenten zusammen; bei der α -Kette aus einem V- und einem J (*joining*)-Segment und bei der β -Kette zusätzlich aus einem D (*diversity*)-Segment. (modifiziert nach Mak & Saunders 2006⁶⁴)

Jede Kette des $\alpha\beta$ -Heterodimers besteht aus einer variablen (V; *variable*) und einer konstanten (C; *constant*) Region sowie einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Bereich. Die V-Region beider Ketten setzt sich aus einem V- und einem J (*joining*)-Segment zusammen, die β -Kette besitzt zusätzlich noch ein D (*diversity*)-Segment und somit eine höhere Variabilität als die α -Untereinheit.

Um auf die Vielzahl der pathogenen Strukturen reagieren zu können, weist die Gesamtheit der T-Zellen eine theoretische Diversität des TCR-Repertoires von $\approx 10^{18}$ verschiedenen Antigenpezifitäten auf⁸. Diese Diversität ist bedingt durch das Konzept der somatischen V(D)J-Rekombination, einem Prozess, der ausschließlich in sich entwickelnden B- und T-Zellen von Vertebraten stattfindet. Hierbei kommt es auf der Ebene der Desoxyribonukleinsäure (DNA; *deoxyribonucleic acid*) zu genetischen Umlagerungsprozessen, bei denen verschiedene funktionale Gensegmente aus den Gruppen der V-, D-, J- und C-Segmente zusammengesetzt werden. Außerdem kommt es zu einer zusätzlichen junktionalen Diversifikation durch Insertion und Deletion von Nukleotiden zwischen den einzelnen Segmenten^{1,8,66}. Eine individuelle T-Zelle trägt in der Regel zwischen $1 \cdot 10^4$ und $3 \cdot 10^4$ identische Kopien eines TCR auf ihrer Oberfläche⁶⁴, wobei bis zu 30 % der $\alpha\beta$ -T-Zellen zwei verschiedene V α -Ketten⁶⁷, aber nur bis zu 1 % zwei verschiedene V β -Ketten exprimieren^{68,69}. Dies ist auf das Phänomen der allelischen Exklusion zurückzuführen, bei der eine rearrangierte β -Kette das Rearrangement einer weiteren β -Kette unterdrückt^{70,71}. Dieses Prinzip gilt nicht für die α -Kette.

1.3 Die Leber

Die Leber, das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers, übernimmt Aufgaben wie die Regulation des Stoffwechsels, Entgiftungs- und Ausscheidungsfunktionen, die Produktion lebenswichtiger Substanzen wie Gerinnungsfaktoren und die Förderung der Glukosehomöostase⁷². Erkrankungen der Leber können angeborener, infektiöser, immunologischer, maligner oder toxischer Natur sein. Eine Form der Lebererkrankung ist die Hepatitis, die Entzündung der Leber. Diese zeichnet sich durch ein Entzündungsinfiltrat in der Leber aus und kann unter anderen durch Hepatitisviren, aber auch Giftstoffe wie Medikamente und Alkohol verursacht werden. Bei Chronifizierung der Hepatitis ist Fibrose eine Folge, bei der es zu einer Verhärtung des elastischen Lebergewebes durch Einlagerung von Kollagen sowie dem Absterben von Leberparenchymzellen, den Hepatozyten, kommt. Dadurch können Stoffwechsel- und Entgiftungsfunktionen der Leber nicht mehr adäquat ausgeführt werden und Komplikationen durch eine gestörte Blutzirkulation durch die Leber entstehen. Auch maligne Erkrankungen wie das Hepatozelluläre und Cholangiozelluläre Karzinom können die Leber primär betreffen. Eine seltene Form von Lebererkrankungen stellen autoimmune Lebererkrankungen dar, welche in Abschnitt 1.4 erörtert sind.

1.3.1 Funktion und Aufbau der Leber

Die Leber ist mit rund 1500 g das größte parenchymatöse Organ im adulten Organismus und entspricht ca. 2 % des Körpergewichts⁷³. Zu ihren Aufgaben gehören Funktionen, die andere Organe unterstützen und den gesamten Organismus beeinflussen. Essentielle Funktionen sind unter

anderem die Proteinsynthese und der Metabolismus von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Lipiden und Vitaminen. Eine weitere wichtige Funktion der Leber stellt die Degradierung und Entfernung von Toxinen, exogenen Antigenen und infektiösen Agenzien dar, welche ihr über das venöse Blut der Pfortader (*Vena portae*) zugeführt werden. Dieses Blut kommt aus dem Gastrointestinaltrakt und ist deshalb sehr antigenreich⁷⁴. Da die Leber zugeleitete Nährstoffe verarbeitet, speichert oder als Stoffwechselprodukte an das Blut wieder abgibt, kommt es hier zu einer permanenten Exposition von körpereigenen, körperfremden und pathogenen Strukturen. Aufgrund dessen entwickelte das Immunsystem spezialisierte Mechanismen der Immuntoleranz in der Leber zur Vermeidung einer immunen Überaktivierung, welche sich bei Notwendigkeit in Responsivität umkehren kann^{73,75-77}.

1.3.2 Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber ist ein Organ mit tolerogenen Eigenschaften⁷⁶, besitzt also die Fähigkeit eine Entzündungsreaktion zu unterdrücken. So ist eine ihrer immunologischen Funktionen die Eliminierung von aktivierten T-Zellen⁷⁸. Die strukturelle Organisation der Leber hat tiefgreifende Auswirkungen auf ihre Immunfunktion⁷⁹. Neben den in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen anatomischen Eigenschaften besitzt die Leber auch mikroanatomische Besonderheiten. Zusätzlich zu den parenchymatösen Zellen (Abb. 3) weist die Leber verschiedene Populationen hochspezialisierter nichtparenchymatöser Zellen auf, aus denen sich verschiedene strukturelle Systeme der Leber zusammensetzen⁷⁴. So wird das Blut aus der Pfortader durch ein Netzwerk aus kleinen Kapillargefäßen, den sog. Sinusoiden, welche von hepatischem Parenchym aus Hepatozyten umgeben sind, zu einer Zentralvene (*Vena centralis*) weitergeleitet. Die Sinusoide sind von sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC; *liver sinusoidal endothelial cells*) ausgekleidet, denen, im Vergleich zum üblichen vaskulären Endothel, die Basalmembran fehlt und die Fenestrierungen aufweisen, womit ein erleichterter Übergang von Molekülen und Antigenen aus dem Blut direkt in das Parenchym ermöglicht wird⁸⁰⁻⁸². Sie grenzen nicht direkt an die Hepatozyten, sondern sind durch einen Spaltraum, den sog. Dissé-Raum, davon getrennt. Aufgrund des schmalen Durchmessers der Sinusoide kommt es zu einer minimalen Erhöhung des Blutdruckes und somit zu einer Stauung des Blutflusses, wodurch der Kontakt zwischen den Zellen des Immunsystems verlängert und deren Extravasation, also Auswanderung, aus dem Blut in das Gewebe gefördert wird⁷⁹. Die Sinusoide weisen ein komplexes Repertoire an Zellen des Immunsystems auf, welche sowohl dem innaten als auch dem adaptiven Immunsystem zugeordnet sind: LSEC, leberresidierende Makrophagen (Kupffer-Zellen), Dendritische Zellen, hepatische Sternzellen und leberresidierende Lymphozyten^{73,79}. Die nichtparenchymatösen Zellen machen rund $\frac{1}{3}$ der Gesamtzellzahl der Leber aus.

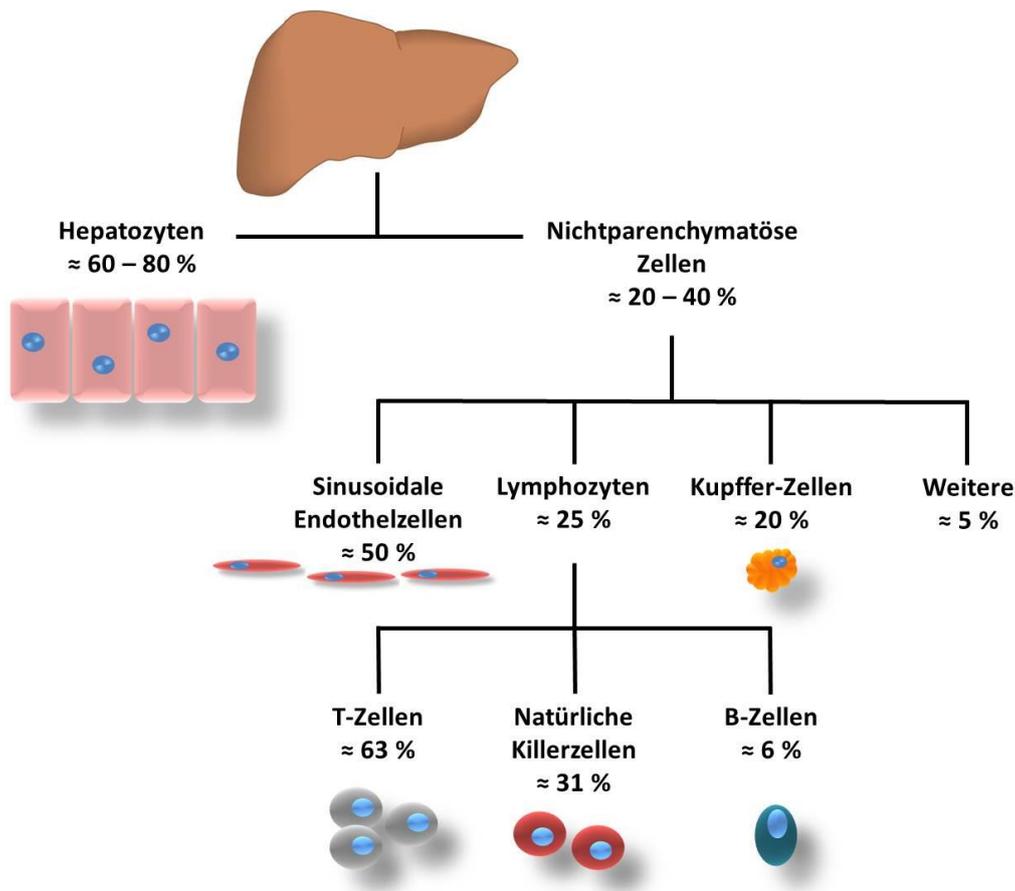


Abb. 3: Zellzusammensetzung einer gesunden Leber. Die prozentualen Angaben geben die geschätzte Frequenz der jeweiligen Zellpopulation in Bezug auf die übergeordnete Gruppe an. (modifiziert nach Racanelli *et al.* 2006⁷⁹ und Bogdanos *et al.* 2013⁷³)

1.3.3 T-Zellen in der Leber

T-Zellen haben am intrahepatischen Lymphozytenkompartiment einen Anteil von ca. 63 % (Abb. 3). Dabei unterscheiden sich die leberresidierenden T-Zellen in der Zusammensetzung funktionell und phänotypisch von zirkulierenden T-Zellen⁸³. Zu den $1 \cdot 10^{10}$ intrahepatischen Lymphozyten⁷⁹ gehören sowohl die konventionellen $CD4^+$ und $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen als auch unkonventionelle Lymphozyten wie $\gamma\delta$ -T-Zellen und andere $CD4^-CD8^-$ T-Zellen⁷⁴. Es zeigte sich, dass die intrahepatische CD4/CD8-Ratio mit 1:3,5 invers zur Ratio der zirkulierenden T-Zellen mit 2:1 ist, aber auch $\gamma\delta$ -T-Zellen kommen in der Leber fünfmal häufiger vor als in der Peripherie⁸³. Innerhalb der gesunden Leber befinden sich die Lymphozyten weitgehend in den Portalfeldern, also den Strukturen im Lebergewebe, in denen die Blutgefäße liegen; sie können aber auch im gesamten Parenchym verstreut sein⁸³. Die Zusammensetzung und Lokalisation der Lymphozytenpopulationen ändert sich eklatant im Zuge von akuten oder chronischen Erkrankungen⁷³.

In aller Regel führt die Aktivierung naiver T-Zellen durch Hepatozyten zur Toleranzinduktion anstatt zu inflammatorischen Immunreaktionen⁸⁴. Die Toleranz gegenüber Leberantigenen ist nicht auf eine generelle Immunsuppression, sondern auf spezifische Prozesse zurückzuführen; dabei sind

spezifische TCR/MHC-Interaktionen an den tolerogenen Mechanismen beteiligt. Im Falle der CD4⁺ T-Zellen erfolgt die Aktivierung durch leberspezifische APC wie Kupferzellen, Dendritische Zellen und LSEC, was zu einer Immundeprivation führt. Hierbei differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen zu antiinflammatorischen T_H2-Zellen oder T_{reg}, statt zu proinflammatorischen T_H1- oder T_H17-Zellen⁸⁵⁻⁸⁸. Dahingegen wird MHCI von allen Leberzellen exprimiert, die damit als APC für CD8⁺ T-Zellen fungieren können. In der Leber kann die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zu deren Deletion oder Induktion von Anergie führen^{84,89-92}.

Die Immunantwort auf viele hepatotrope Pathogene wie Hepatitis-B-Virus, ist mit einer starken und andauernden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort assoziiert⁷⁹. Aufgrund einer vorwiegenden Präsentation intrazellulärer Peptide durch MHCI kommt den intrahepatischen CD8⁺ T-Zellen eine tragende Rolle zu. Zu den Effektorfunktionen zählen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ und TNF α , aber auch zytolytische Mechanismen wie die Freisetzung von Perforin und Granzymen sowie die Fas-vermittelte Apoptose^{93,94}. Studien zeigen, dass aktivierte CD8⁺ T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-spezifität in die Leber rekrutiert und/oder dort festgehalten werden^{95,96}. Nach Erkennung ihres Antigens kommt es zu einer schnellen Proliferation dieser Zellen⁹⁵ und zu einer frühen und schnell wieder abfallenden IFN γ -Produktion sowie einer später einsetzenden und anhaltenden Granzym B-Produktion und Zytotoxizität⁷⁹.

1.4 Autoimmune Lebererkrankungen

1.4.1 Überblick

Selbsttoleranz bezeichnet die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems, körpereigene Stoffe von körperfremden zu unterscheiden und diese zu tolerieren. Autoimmunität repräsentiert die Störung oder das Versagen von Mechanismen der Selbsttoleranz, bei dem eine Immunreaktion gegenüber Selbstantigenen generiert wird^{1,8}. Somit stellt Selbsttoleranz eine Kardinalfunktion des normalen Immunsystems dar und dessen Versagen führt zu Autoimmunerkrankungen¹. Da Autoimmunerkrankungen nur bei 3 - 8 % der Bevölkerung auftreten⁹⁷, sind autoimmune Lebererkrankungen aufgrund der tolerogenen Eigenschaften der Leber vergleichsweise seltener. In der hepatischen Toleranz scheinen diverse intrahepatische Zellen und das außergewöhnliche Mikromilieu der Leber involviert zu sein. Limmer *et al.*⁹⁸ zeigten, dass ein Toleranzbruch *per se* nicht ausreicht, um leberspezifische Autoimmunität zu induzieren, sondern dass für eine organspezifische Autoimmunerkrankung zumindest zwei unabhängige Schritte notwendig sind: Zum einen die Umkehr der peripheren Toleranz, was zu einer funktionellen Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen führt. Zum anderen die Konditionierung des hepatischen Mikromilieus, welches die aktivierten T-Zellen befähigt, Gewebeschäden zu verursachen. Dennoch ist beim derzeitigen Stand der Forschung unklar, welche Ursachen zu autoimmunem Lebererkrankungen führen. Spekuliert wird unter anderem über

interkurrente Infekte, molekulares Mimikry, aber auch Umweltfaktoren und genetische Prädisposition scheinen Autoimmunität zu induzieren⁹⁹⁻¹⁰⁶. Ist es zu einer intrahepatischen Immunreaktion mit entsprechender Immunaktivierung gekommen, chronifiziert dieser Prozess häufig durch das veränderte, proinflammatorische Zytokinmilieu. Zu den autoimmunen Erkrankungen der Leber zählen die Primär Biliäre Zirrhose (PBC), die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) und die Autoimmune Hepatitis (AIH) sowie deren Überlappungsformen. Die Ätiopathogenese der verschiedenen autoimmunen Lebererkrankungen ist nicht gut verstanden, führt aber bei Nichtbehandlung zu einer Leberzirrhose. Von den drei autoimmunen Lebererkrankungen gilt die AIH als typische Autoimmunerkrankung, da sie durch autoreaktive T-Zellen, inflammatorische Infiltrate, erhöhte γ -Globulinspiegel, Autoantikörper und genetische Prädisposition gekennzeichnet ist. Meist zeigt sie ein gutes Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie^{107,108}.

1.4.2 Die Autoimmune Hepatitis

1.4.2.1 Definition, Diagnostik und Therapie

Die AIH ist eine progrediente und immunvermittelte, entzündliche Lebererkrankung, die sich in akuter oder chronischer Form präsentiert und unbehandelt zu Fibrose bzw. Zirrhose führt¹⁰⁹⁻¹¹². Die Erkrankung zeigt eine Prävalenz von 10,7 - 23,9/100.000 Einwohnern in Europa¹¹³⁻¹¹⁵ und kann Personen jeder Altersgruppe betreffen, wobei das mittlere Alter bei Diagnosestellung zwischen 40 und 50 Jahren liegt¹⁰⁸. Auch Manifestationen in Kindheit und jungem Erwachsenenalter sind üblich und zeigen häufig einen akuten ikterischen Krankheitsbeginn¹¹⁶. Frauen sind von dieser Erkrankung häufiger betroffen als Männer¹⁰⁷⁻¹¹². Klinisch zeigt die AIH vielfältige Symptome: Über ein Drittel der Patienten fallen klinisch durch eine akute ikterische Hepatitis bis hin zu einem fulminanten Leberversagen auf^{108,117-120}, die Mehrheit der Patienten zeigt jedoch unspezifische Symptome wie Fatigue, Gewichtsverlust, Oberbauch- oder Gelenkschmerzen. Einige Patienten sind beschwerdearm, so dass die AIH erst spät diagnostiziert wird und bei der Diagnosestellung bereits eine Zirrhose besteht^{108,111}. Die Heterogenität der klinischen AIH-Präsentation erschwert somit die Diagnosestellung, weshalb vier Diagnosekriterien zum Nachweis der AIH festgelegt wurden: Laborchemisch zeichnet sich die Erkrankung durch spezifische Autoantikörper, erhöhte Aminotransferasenwerte, einer spezifischen Erhöhung von Immunglobulin G (IgG) im Serum und/oder einer Hypergammaglobulinämie aus, die in aller Regel 1,2- bis 3-mal über der Norm liegt^{109,110}. Da aber Aminotransferasen und IgG-Werte nicht den Umfang der inflammatorischen Aktivität oder die An- bzw. Abwesenheit einer Zirrhose wiedergeben, ist zur Diagnosesicherung eine Leberhistologie zwingend notwendig sowie der Ausschluss anderer Hepatitiden^{110,111}. Es gibt mehrere klinische Diagnosescores der AIH: Zum einen den Score der „*International Autoimmune Hepatitis Group*“^{121,122} und zum anderen den vereinfachten Score¹²³. Die Prognose einer unbehandelten AIH ist

schlecht, jedoch konnte schon in den 70er Jahren gezeigt werden, dass eine immunsuppressive Therapie zu einer Verringerung der Mortalität in der frühen aktiven Phase der Erkrankung führt¹²⁴⁻¹²⁷. Die derzeitige Standardtherapie der AIH basiert auf der Gabe von Glukokortikoiden wie Prednisolon in Kombination mit Azathioprin als steroidsparende Maßnahme^{107-112,128}. Dies führt bei 85 % der Patienten zu einer Remission, die meist durch eine fortdauernde Medikation aufrechterhalten bleibt^{112,129-131}. Da durch Glukokortikoide bei andauernder systemischer Anwendung starke Nebenwirkungen auftreten wie das Cushing-Syndrom, die Schwächung der Immunabwehr, aber auch die Entstehung und Verstärkung von Diabetes mellitus^{128,132,133}, ist die Entwicklung einer steroidfreien AIH-Therapie erstrebenswert.

1.4.2.2 Genetische Prädisposition

Es wird postuliert, dass Autoimmunerkrankungen in genetisch prädisponierten Personen in Kombination mit einem Umweltantigen ausgelöst werden^{109,134}. Bei europäischen und nordamerikanischen AIH-Patienten konnte eine Assoziation von Genen innerhalb des humanen Leukozytenantigen (HLA; *human leukocyte antigen*)-Systems mit einer AIH-Suszeptibilität hergestellt werden, im speziellen mit den Allelen HLA-DR3 (*DRB1*0301*) und DR4 (*DRB1*0401*)^{109,115,135}. Dabei handelt es sich um MHCII-Moleküle, die daran beteiligt sind, antigene Peptide gegenüber CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren und somit an der Initiierung der adaptiven Immunantwort involviert sind¹¹¹. Ferner zeigen AIH-Patienten eine Häufung weiterer Autoimmunerkrankungen, insbesondere Schilddrüsenerkrankungen¹⁰⁷⁻¹¹¹.

1.4.2.3 Autoantikörper

Autoimmunerkrankungen sind gekennzeichnet durch die Produktion von Antikörpern, die gegen körpereigene Zellen oder Gewebe gerichtet sind. Die AIH wird anhand von Autoantikörperspektren in mehrere Typen unterteilt: Für die AIH Typ I sind antinukleäre Antikörper (ANA) und Antikörper gegen glatte Muskulatur (SMA; *smooth muscle antibodies*) charakteristisch^{111,136}. Es gibt Hinweise, dass der SMA-Antikörpertiter mit der Schwere der Erkrankung korreliert¹³⁷. Bei der AIH Typ II sind Antikörper gegen Mikrosomen der Leber und Niere (LKM; *liver kidney microsomes*) charakteristisch^{111,136}, die gegen Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) gerichtet sind¹³⁸⁻¹⁴¹. Dieser Typ stellt eine Sondergruppe dar, da er sich vornehmlich bei Kindern und jungen Erwachsenen manifestiert und die Patienten in der Regel einen schweren Verlauf zeigen und lebenslang therapiert werden müssen¹⁰⁹. Ein möglicher AIH Typ III zeichnet sich durch Autoantikörper gegen lösliches Leberantigen (SLA/LP; *soluble liver antigen/liver pancreas*) aus^{142,143}, die gegen die O-Phosphoserinyl-tRNA:Selenocysteinylyl-tRNA-Synthase (SepSecS) gerichtet sind^{144,145}. Es wurde zeitweise diskutiert, ob der Typ III eine eigenständige Entität darstellt, dann aber aufgrund des gleichen klinischen Verlaufs dem Typ I zugeordnet. Jedoch sind einzig die

SLA/LP-Antikörper spezifisch für die AIH, während die anderen Autoantikörper auch in Patienten mit viraler Hepatitis oder anderen immunvermittelten Erkrankungen auftreten können^{128,146,147}.

1.4.2.4 Pathogenetische Aspekte

Bei der AIH kommt es zu einer progredienten Zerstörung des Leberparenchyms durch das körpereigene Immunsystem, wobei die Ätiopathogenese bisher unzureichend verstanden ist. Ungeachtet der auslösenden Faktoren, scheint der Pathomechanismus der AIH komplex zu sein¹⁴⁸. Dabei führt eine fehlgeleitete Immunregulation und die damit verbundene Gegenwart von autoreaktiven T-Zellen zu einer fortschreitenden Zerstörung von Hepatozyten in der Leber^{107,111}. Die AIH zeichnet sich histologisch durch ein dichtes mononukleäres Zellinfiltrat aus, welches sich aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie Makrophagen, Granulozyten und antikörpersezernierenden Plasmazellen zusammensetzt und somit einen zellulären autoaggressiven Angriff der Leber impliziert^{109,148}. Dass T-Zellen, vor allem CD4⁺ T-Zellen, eine eminente Rolle in der AIH-Immunpathogenese spielen¹⁰⁷, zeigt die genetische Prädisposition der AIH-Patienten bezüglich der MHCII-Moleküle HLA-DR3 und DR4¹³⁵, der Nachweis von CD4⁺ T-Zellen in den lymphozytären Infiltraten in der Leber^{109,111,148} und die Identifikation von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen¹⁴⁹⁻¹⁵².

Mutmaßliche Mechanismen zur Induktion des Leberschadens in der AIH sind in Abb. 4 dargestellt. Die Immunantwort wird ausgelöst, indem naiven T-Zellen Autoantigene präsentiert werden. Studien gehen davon aus, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen *in situ* aktiviert werden^{153,154}. Dabei ist die Differenzierung in Gegenwart von entsprechenden Kostimuli abhängig vom Zytokinmilieu (Abschnitt 1.2.1.1). Die Gegenwart von IL-12 fördert die Differenzierung zu T_H1-Zellen, die IL-2 und IFN γ sekretieren und so die Makrophagendifferenzierung induzieren, die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen unterstützen und CD8⁺ T-Zellen aktivieren¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. CD8⁺ CTL produzieren wiederum IFN γ und TNF α und wirken zytotoxisch nach Erkennung ihres MHCI/Antigen-Komplexes¹⁵⁸. Hepatozyten exprimieren unter normalen Bedingungen kaum MHCI und kein MHCII^{159,160}. Die Exposition von IFN γ führt zu einer MHCI-Aufregulierung auf den Hepatozyten und somit CD8⁺ T-Zellaktivierung, aber auch zu einer aberranten MHCII-Expression, wodurch Hepatozyten als APC für CD4⁺ T-Zellen fungieren können^{111,161,162}. Die IL-4-gestützte Differenzierung zu T_H2-Zellen führt zur Sekretion von IL-10, IL-4 und IL-13, die wiederum die B-Zellmaturierung und die daraus resultierende Autoantikörperproduktion unterstützen. B-Zellen sind in die antikörpervermittelte hepatozelluläre Schädigung involviert, wobei erhöhte Antikörpertiter mit der Schwere der AIH korrelieren^{111,148}.

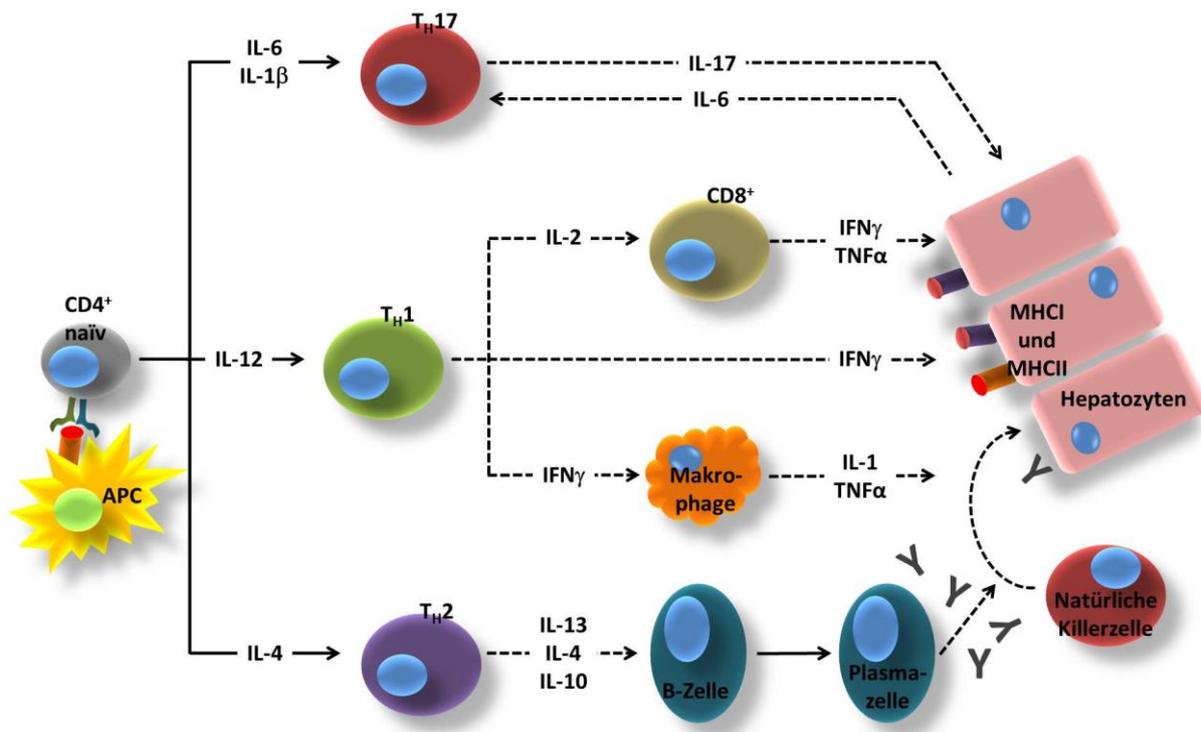


Abb. 4: Mechanismen des Leberschadens in der Autoimmunen Hepatitis. Die Aktivierung naiver T_H -Zellen durch Präsentation eines autoantigenen Peptids mit adäquater Kostimulation führt entsprechend des Zytokinmilieus zur Differenzierung von T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zellen, deren Effektormoleküle direkt oder indirekt zum hepatozellulären Schaden führen: T_H1 -Zytokine stimulieren zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen, führen zu einer Aufregulation der MHC I- und Induktion der MHC II-Expression auf Hepatozyten und aktivieren Makrophagen. T_H2 -Zytokine fördern die Antikörpersekretion durch B-Zellen, wobei Autoantikörper in die antikörpervermittelte Zytotoxizität involviert sind. Pathogene T_H17 -Zellen sezernieren das proinflammatorische Zytokin IL-17, welches die hepatozelluläre IL-6-Sekretion fördert, das wiederum die T_H17 -Entwicklung unterstützt. APC = Antigenpräsentierende Zelle (*Antigen presenting cell*); IFN = Interferon; IL = Interleukin; MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*); TGF = Transformierender Wachstumsfaktor (*Transforming Growth Factor*); T_H = T-Helferzelle; TNF = Tumornekrosefaktor. (nach Liberal *et al.* 2013¹¹¹)

T_H17 -Zellen fördern die Entzündung durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17 und induzieren die hepatozelluläre IL-6-Sekretion, welches wiederum die T_H17 -Aktivierung unterstützt^{111,163}. Eine unzureichend kontrollierte T_H17 -Effektorantwort gilt als Treiber der Entzündungsreaktion bei autoimmunen Erkrankungen^{28,41,164,165}. T_{reg} scheinen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Immuntoleranz und -aktivierung zu haben⁷⁴. Die Mechanismen, die zum Zusammenbruch der Selbsttoleranz bei Autoimmunerkrankungen führen, sind noch nicht vollständig geklärt. So besagen diverse Studien, dass die Immunregulation bei AIH-Patienten aufgrund numerischer und funktioneller T_{reg} -Beeinträchtigungen versagt¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Dies konnte jedoch durch Peiseler *et al.* nicht bestätigt werden¹⁶⁹.

1.4.3 Rekrutierung von T-Zellen in die entzündete Leber

Die Rekrutierung von Zellen ist ein eminenter Mechanismus für verschiedene biologische Prozesse wie Entzündung, Tumormetastasierung oder Stammzellmigration. Dabei kommt es zur Migration von zirkulierenden Zellen aus dem Blut- oder Lymphstrom in das umliegende Gewebe, wobei Chemokine von zentraler Bedeutung sind. Hierbei handelt es sich um chemotaktische Zytokine, die selektiv an Chemokinrezeptoren der Zielzellen binden und eine zielgerichtete Migration entlang eines Konzentrationsgradienten induzieren^{170,171}. Die lymphozytäre Infiltration der Leber erfolgt aufgrund diverser Stimuli wie Hepatitisviren, toxischer Schädigung oder Autoimmunerkrankungen¹⁷². Chemokine tragen zur Pathogenese der AIH bei, indem sie die Migration und Positionierung von entzündlichen und Immunzellen in der Leber orchestrieren¹⁷³. Viele Chemokinrezeptoren binden affinitätspezifisch verschiedene Chemokine und diverse Chemokine binden an mehr als einen Rezeptor, was darauf hinweist, dass Redundanz und Promiskuität charakteristisch für das Chemokinsystem sind¹⁷⁴. Des Weiteren sind Chemokine und Chemokinrezeptoren nützlich bei der Identifizierung unterschiedlicher T-Zellsubpopulation¹⁷⁵. In Abb. 5 ist das Chemokinrezeptorprofil von T_H1 - und T_H17 -Zellen veranschaulicht und den zur Rekrutierung in die Leber notwendigen Liganden. Leberinfiltrierende T-Zellen zeigen eine stark erhöhte Expression des Rezeptors CXCR3¹⁷⁶, wobei $CD4^+$ als auch $CD8^+$ Effektorzellen in der Leber signifikant mehr CXCR3 exprimieren als im Blut¹⁷⁷. Die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 werden durch die T_H1 -Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ induziert^{24,178,179}. CXCL9 rekrutiert sowohl T_H1 - als auch T_H17 -Zellen in die Leber^{173,180,181}. Auch CXCL10 unterstützt die proinflammatorische T_H1 -Antwort¹⁸² und ist assoziiert mit einer progredienten Fibrose¹⁸³. CXCL11 gilt ebenfalls als proinflammatorisch und rekrutiert aktivierte, jedoch nicht unstimulierte T-Zellen mit einer höheren Affinität für CXCR3 an als CXCL9 und CXCL10¹⁸⁴.

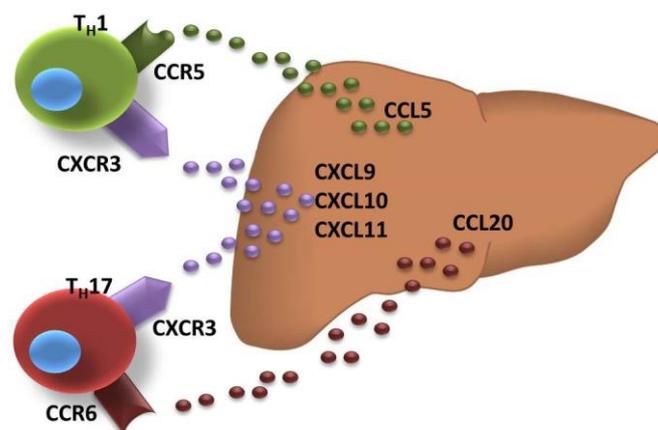


Abb. 5: Chemokinrezeptorprofil von T_H1 - und T_H17 -Zellen. Für T_H1 -Zellen ist die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5, für T_H17 -Zellen von CXCR3 und CCR6 charakteristisch. Die Rekrutierung proinflammatorischer Zellen in die entzündete Leber erfolgt entlang eines Chemokingradienten. CXCR3-spezifische Liganden sind CXCL9, CXCL10 und CXCL11, ein CCR5-Ligand in der Leber ist CCL5 und der CCR6-spezifische Ligand ist CCL20. CCL/CXCL = Chemokinligand; CCR/CXCR = Chemokinrezeptor; T_H = T-Helferzelle.

Ein weiterer relevanter Chemokinrezeptor ist CCR5, der auf aktivierten leberinfiltrierenden Lymphozyten in der entzündeten Leber nachweisbar ist¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. CCR5 ist für T_H1-Zellen charakteristisch¹⁸⁸ und wird zusammen mit CXCR3 auf der Zelloberfläche exprimiert^{24,189}. Auch auf CD8⁺ T-Zellen wird die CXCR3/CCR5-Rezeptorkombination exprimiert^{24,190}. Ein Ligand für CCR5 ist CCL5, welcher profibrotische Eigenschaften hat und die Infiltration von Immunzellen in die Leber erhöht¹⁹¹⁻¹⁹³. Für T_H17-Zellen ist die Expression des Rezeptors CCR6 in Kombination mit CXCR3 charakteristisch, welche für die Rekrutierung und Positionierung im entzündeten Lebergewebe erforderlich sind^{24,181,194,195}. CCL20 ist der einzige spezifische Ligand für CCR6 und fördert die Rekrutierung von T_H17-Zellen in die Leber^{181,195}.

1.5 Fragestellung

Die AIH ist eine entzündliche Lebererkrankung autoimmuner Genese, die durch den Verlust der intrahepatischen Immuntoleranz charakterisiert ist und zur Zerstörung des Leberparenchyms führt. Der Pathomechanismus der AIH ist bisher unvollständig verstanden. Verschiedene Aspekte deuten jedoch darauf hin, dass T-Zellen eine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der AIH einnehmen. So zeigen AIH-Patienten eine genetische Prädisposition bezüglich der MHCII-Moleküle HLA-DR3 und DR4. Außerdem sind T-Zellen im zellulären Infiltrat der Leber nachgewiesen. Zusätzlich konnten T-Zellepitope auf Autoantigenen in der AIH identifiziert werden. Jedoch sind der Phänotyp und die Funktion der T-Zellen in AIH-Patienten bisher unzureichend beschrieben. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher anhand der Charakterisierung von T-zellspezifischen Zytokinen, Chemokinen und zytotoxischen Proteinen das Profil von zirkulierenden (extrahepatischen) und leberinfiltrierenden (intrahepatischen) T-Zellen in AIH-Patienten evaluiert werden. Hierfür sollten Lymphozyten aus dem Vollblut von AIH-Patienten vor Therapiebeginn isoliert und hinsichtlich ihrer Expression und Sekretion von T_H1 -, T_H17 - und T_H2 -spezifischen Zytokinen charakterisiert werden. Zur Untersuchung der migratorischen Eigenschaften sollte das Expressionsmuster T-zellrelevanter Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden analysiert werden. Zudem sollten leberinfiltrierende Lymphozyten aus Lebergewebe von mehrheitlich nichttherapierten AIH-Patienten isoliert und ebenfalls hinsichtlich der Expression und Sekretion T-Zellspezifischer Zytokine und Chemokine untersucht werden. Zusätzlich sollte das zytotoxische Potential dieser Zellen anhand der Expression von zytotoxischen Effektorproteinen evaluiert werden.

Beim derzeitigen Stand der Forschung ist noch unklar, inwieweit die Leberentzündung in der AIH tatsächlich durch autoantigenspezifische T-Zellen angetrieben ist. Eine weiterer möglicher Mechanismus der Leberschädigung stellt die Rekrutierung einer Vielzahl unspezifischer inflammatorischer „Bystander“-T-Zellen durch einige wenige autoreaktive T-Zellen dar. Im zweiten Teil der Arbeit sollten daher leberinfiltrierende Lymphozyten aus dem Lebergewebe von therapienaïven AIH-Patienten isoliert und T-Zellen auf Einzelzellniveau kloniert werden. Mittels TCR-Repertoireanalyse sollte untersucht werden, ob die intrahepatischen zellulären Infiltrate von AIH-Patienten eine antigengetriebene oligo- bzw. monoklonale Expansion von T-Zellen oder eine polyklonale Expansion vieler, womöglich unspezifischer T-Zellen widerspiegeln.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten und humanes Probenmaterial

2.1.1 Klinische Parameter der Patienten

Der Diagnosesicherung einer AIH liegen unter anderem erhöhte Werte der Aminotransferasen ASAT (Aspartat-Aminotransferase) und ALAT (Alanin-Aminotransferase) sowie Hypergammaglobulinämie bzw. eine spezifische Erhöhung des γ -Globulins IgG im Serum zugrunde¹¹¹. Bei den Aminotransferasen handelt es sich um Enzyme, die physiologisch innerhalb der Zelle vorliegen. Die ASAT kommt vor allem in Hepatozyten, aber auch in Zellen des Herz- und der Skelettmuskeln, des Gehirns, der Niere und des Pankreas vor. Die ALAT ist nahezu leberspezifisch und zeigt im Falle einer akuten oder chronischen Hepatitis eine höhere Konzentration im Serum als die ASAT. Der Normbereich für die ASAT und ALAT liegt bei Männern zwischen 10-50 IU/L und bei Frauen zwischen 10-35 IU/L, der für IgG im Allgemeinen zwischen 7-16 g/L. Zur Evaluierung der AIH wurde der vereinfachte Diagnosescore nach Hennes *et al.*¹²³ herangezogen. Dieser Score unterscheidet zwischen einer definitiven (mindestens 7 Punkte) und einer wahrscheinlichen (mindestens 6 Punkte) AIH-Diagnose. Dabei werden vier Kriterien berücksichtigt: erhöhte Autoantikörpertiter, erhöhtes IgG, die Leberhistologie und der Ausschluss einer Virushepatitis. Die AIH kann zu einem akuten Leberversagen führen oder als chronische Form über eine Fibrosierung des Lebergewebes zur Zirrhose führen. Von einer Chronifizierung der Hepatitis spricht man, wenn diese länger als sechs Monate anhält. In Tab. 1 sind die klinischen Parameter der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten aufgeführt.

Tab. 1: Klinische Parameter der untersuchten Patienten. ♀ = weiblich; ♂ = männlich; AIH = Autoimmune Hepatitis; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; ALAT = Alanin-Aminotransferase; IgG = Immunglobulin G; n. u. = nicht untersucht. Normbereiche: ASAT und ALAT bei Frauen 10-35 IU/L, bei Männern 10-50 IU/L; IgG 7,00-16,00 g/L. Vereinfachter Diagnosescore nach Hennes *et al.*¹²³: ≥ 6 = AIH wahrscheinlich, ≥ 7 = AIH gesichert. Der Status der AIH-Erkrankung ist eingestuft als ⁽¹⁾ komplette bzw. ⁽²⁾ partielle Remission.

Patient	Diagnose	♀/♂	Alter	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	IgG (g/L)	vereinfachter AIH-Score	immun-suppressive Therapie	Probe
#1	AIH ⁽¹⁾	♀	62	27	23	11,82	-	+	Serum
#2	AIH ⁽¹⁾	♂	59	24	36	14,20	-	+	Serum
#3	AIH ⁽¹⁾	♀	47	23	28	14,10	-	+	Serum
#4	AIH ⁽²⁾	♀	74	33	37	17,70	-	+	Serum
#5	AIH ⁽¹⁾	♀	72	27	13	12,40	-	+	Serum
#6	AIH ⁽²⁾	♀	51	42	60	18,00	-	+	Serum
#7	AIH ⁽²⁾	♀	44	17	21	16,70	-	+	Serum

Patient	Diagnose	♀/♂	Alter	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	IgG (g/L)	vereinfachter AIH-Score	immun- suppressive Therapie	Probe
#8	AIH ⁽²⁾	♀	36	18	17	16,20	-	+	Serum
#9	AIH	♀	83	808	664	22,9	8	-	Vollblut
#10	AIH	♀	47	77	126	19,41	8	-	Vollblut, Gewebe
#11	AIH	♀	33	59	112	22,59	8	-	Vollblut, Gewebe
#12	AIH	♀	78	663	815	33,3	8	-	Vollblut, Gewebe
#13	AIH	♂	37	73	172	20,9	8	-	Vollblut
#14	AIH	♀	46	88	162	16,2	7	-	Vollblut
#15	AIH	♀	56	457	840	25,8	8	-	Vollblut
#16	AIH	♀	52	488	593	13,6	6	-	Vollblut
#17	AIH	♀	46	99	217	22,9	8	-	Vollblut
#18	AIH	♀	64	63	77	12,8	6	-	Vollblut
#19	AIH	♀	58	789	455	30,8	8	-	Vollblut
#20	AIH	♀	59	433	957	16,2	7	-	Vollblut
#21	AIH	♀	27	1339	940	8,76	6	-	Gewebe
#22	AIH	♀	44	82	64	26,38	8	+	Gewebe
#23	AIH	♀	38	53	80	19,33	8	+	Gewebe
#24	AIH	♀	28	85	116	27,37	8	-	Gewebe
#25	AIH	♀	66	19	21	11,9	6	+	Gewebe
#26	AIH	♀	53	518	416	51,6	8	-	Gewebe
#27	AIH	♀	54	48	36	25	8	-	Gewebe
#28	AIH	♀	43	272	493	17,4	7	-	Gewebe
#29	AIH	♀	37	857	2550	15,3	6	-	Gewebe
#30	AIH	♂	28	2207	2592	23,6	8	-	Gewebe
#31	bzgl. Leber gesund	♀	44	22	34	8,45		-	Serum
#32	bzgl. Leber gesund	♂	73	77	45	18,60		-	Serum
#33	bzgl. Leber gesund	♂	26	20	12	9,63		-	Serum
#34	bzgl. Leber gesund	♀	79	50	61	n. u.		-	Serum
#35	bzgl. Leber gesund	♂	20	97	121	9,13		-	Serum
#36	bzgl. Leber gesund	♀	18	15	20	11,00		-	Serum
#37	bzgl. Leber gesund	♀	70	23	19	n. u.		-	Serum

Patient	Diagnose	♀/♂	Alter	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	IgG (g/L)	vereinfachter AIH-Score	immunsuppressive Therapie	Probe
#38	bzgl. Leber gesund	♀	36	n. u.	n. u.	n. u.		-	Serum
#39	bzgl. Leber gesund	♂	64	31	31	16,70		-	Serum
#40	Adenom	♀	30	51	n. u.	n. u.		-	Gewebe
#41	Adenom	♀	18	69	n. u.	n. u.		-	Gewebe
#42	NASH	♀	60	45	42	n. u.		-	Gewebe
#43	NASH	♂	59	41	66	n. u.		-	Gewebe

Zusätzlich wurden Vollblutproben von insgesamt zehn gesunden Probanden analysiert, bei denen die klinischen Parameter ASAT und ALAT und IgG nicht untersucht wurden. Diese Probanden waren zum Zeitpunkt der Probennahme nicht immunsuppressiv therapiert.

2.1.2 Serumproben

Bei den untersuchten Serumproben handelte es sich um Restmaterial aus der Diagnostik der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Blutserum ist der flüssige Teil des Blutes, welcher sich nach abgeschlossener Blutgerinnung als klarer Überstand abtrennt. Zur Serumgewinnung wurde den Patienten Vollblut mithilfe spezieller Serumröhrchen (S-Monovette® 7,5 ml, Serum-Gel, steril) entnommen, diese abzentrifugiert und das Serum als Überstand abgenommen. Die Probenlagerung erfolgte bei -80 °C.

2.1.3 Patientenkohorte zur Untersuchung des Serums

Zur Untersuchung des Zytokinprofils von AIH-Patienten wurden unter anderem Serumproben verwendet. Die klinischen Parameter der Patienten- und Kontrollkollektive sind in Tab. 2 aufgeführt. Nicht untersuchte Parameter einzelner Probanden in den jeweiligen Kohorten wurden bei den Berechnungen der medianen Konzentrationen des jeweiligen Parameters nicht berücksichtigt. Die Patientenkohorte bestand aus je vier Patienten mit AIH in kompletter Remission bzw. partieller Remission, welche zum Zeitpunkt der Probennahme immunsuppressiv therapiert wurden. Eine komplette Remission ist dadurch definiert, dass die Werte der Aminotransferasen und von IgG unter der Obergrenze des Normbereichs liegen; eine partielle Remission wird definiert durch a) eine Besserung der Aminotransferasenwerte auf das zweifache der Obergrenze des Normbereiches oder b) eine Normalisierung der Aminotransferasenwerte ohne komplette Normalisierung des IgG¹⁰⁸. Die

Kontrollgruppe umfasste neun Patienten mit Erkrankungen verschiedener Symptomatik, die bezüglich der Leber als gesund eingestuft und nicht immunsuppressiv therapiert wurden.

Tab. 2: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Zytokinkonzentration im Serum. AIH = Autoimmune Hepatitis; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; ALAT = Alanin-Aminotransferase; IgG = Immunglobulin G. Normbereiche: ASAT und ALAT bei Frauen 10-35 IU/L, bei Männern 10-50 IU/L; IgG 7,00-16,00 g/L. Für das Alter, die ASAT-, ALAT- und IgG-Werte sind die Mediane und Datenbereiche (in Klammern) angegeben. Nicht untersuchte Parameter wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen: Parameter bei * 1 Proband bzw. *** 3 Probanden nicht untersucht.

Diagnose- gruppe	Geschlecht (m/w)	Median Alter (Jahre)	Median ASAT (IU/L)	Median ALAT (IU/L)	Median IgG (g/L)
AIH (n = 8)	1/7	55 (36-74)	25,5 (17-42)	25,5 (17-60)	15,20 (11,82-18,00)
Kontrolle (n = 9)	4/5	44 (18-79)	27,0* (15-97)	32,5* (12-121)	10,32*** (8,45-18,60)

Zur Zeit der Probennahme wiesen die untersuchten Patienten mit einer AIH-Erkrankung eine mediane ASAT von 25,5 IU/L und eine mediane ALAT von 25,5 IU/L auf und lagen somit unabhängig vom Geschlecht im Normbereich. Auch die Patienten der Kontrollgruppe lagen mit einer medianen ASAT von 27,0 IU/L und medianen ALAT von 32,5 IU/L unabhängig vom Geschlecht im Normbereich. In der AIH-Kohorte war das mediane IgG mit 15,20 g/L um 0,80 g/L unter der Obergrenze des Normbereiches. In der Kontrollkohorte war das mediane IgG mit 10,32 g/L niedriger als in der AIH-Gruppe.

2.1.4 Buffy Coat und Vollblutproben

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC; *peripheral blood mononuclear cells*) wurden aus Vollblut und Buffy Coats isoliert. Die Bereitstellung von humanem Vollblut zu Untersuchungszwecken erfolgte freundlicherweise durch die Leberambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Zur Entnahme wurden sterile S-Monovetten® (Kalium-EDTA) benutzt. Die Verwendung der humanen Blutproben erfolgte nach den Richtlinien der lokalen Ethikkommission. Die Buffy Coats wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen wurden. Hierbei handelt es sich um ein Konzentrat aus Leukozyten und Thrombozyten.

2.1.5 Patientenkohorte zur Untersuchung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut

In Tab. 3 sind die klinischen Charakteristika der AIH-Patienten und Kontrollprobanden zur Untersuchung des Genexpressionsprofils der PBMC angegeben. Die acht Patienten der AIH-Kohorte wiesen zum Zeitpunkt der Probennahme eine erhöhte mediane ASAT von \approx 273 IU/L und eine erhöhte mediane ALAT von \approx 383 IU/L auf. Das mediane IgG lag bei \approx 22 g/L. Alle acht Patienten

waren zum Zeitpunkt der Probennahme therapienaiv. Die Kontrollkohorte umfasste zehn gesunde Probanden, die bei der Probenentnahme nicht immunsuppressiv therapiert wurden. Die ASAT-, ALAT- und IgG-Werte dieser Probanden wurden nicht ermittelt.

Tab. 3: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Genexpression in PBMC. AIH = Autoimmune Hepatitis; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; ALAT = Alanin-Aminotransferase; IgG = Immunglobulin G; n. u. = nicht untersucht. Normbereiche: ASAT und ALAT bei Frauen 10-35 IU/L, bei Männern 10-50 IU/L; IgG 7,00-16,00 g/L. Für das Alter, die ASAT-, ALAT- und IgG-Werte sind die Mediane und Datenbereiche (in Klammern) angegeben.

Diagnose- gruppe	Geschlecht (m/w)	Median Alter (Jahre)	Median ASAT (IU/L)	Median ALAT (IU/L)	Median IgG (g/L)	therapienaiv/ immunsuppressive Therapie
AIH (n = 8)	1/7	49,5 (33-83)	272,5 (59-808)	382,5 (112-840)	21,75 (13,60- 33,30)	8/0
Gesund (n = 10)	1/9	27 (24-37)	n. u.	n. u.	n. u.	10/0

Das Zytokinprofil der PBMC von AIH-Patienten wurde außerdem in Zellkulturüberständen untersucht. Die klinischen Parameter der AIH-Patienten- und Kontrollgruppen sind in Tab. 4 aufgeführt. Die mediane ASAT mit 445 IU/L und mediane ALAT mit 524 IU/L in der AIH-Kohorte lagen zum Zeitpunkt der Probennahme über der Obergrenze des Normbereiches von 35 IU/L. Das mediane IgG lag mit 19,55 g/L ebenfalls über dem Normbereich. Alle AIH-Patienten dieser Kohorte wurden zum Zeitpunkt der Probennahme nicht immunsuppressiv therapiert. Die klinischen Parameter ASAT, ALAT und IgG der sechs therapienaiven Kontrollprobanden wurden nicht untersucht.

Tab. 4: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand. AIH = Autoimmune Hepatitis; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; ALAT = Alanin-Aminotransferase; IgG = Immunglobulin G; n. u. = nicht untersucht. Normbereiche: ASAT und ALAT bei Frauen 10-35 IU/L, bei Männern 10-50 IU/L; IgG 7,00-16,00 g/L. Für das Alter, die ASAT-, ALAT- und IgG-Werte sind die Mediane und Datenbereiche (in Klammern) angegeben.

Diagnose- gruppe	Geschlecht (m/w)	Median Alter (Jahre)	Median ASAT (IU/L)	Median ALAT (IU/L)	Median IgG (g/L)	therapienaiv/ immunsuppressive Therapie
AIH (n = 6)	0/6	54 (46-59)	445 (88-789)	524 (162-957)	19,55 (13,60- 30,80)	6/0
Gesund (n = 6)	1/5	28 (26-32)	n. u.	n. u.	n. u.	6/0

Des Weiteren wurde die Zellfrequenz verschiedener PBMC-Populationen anhand ihres Zytokinprofils mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Tab. 5 sind die klinischen Daten der AIH-Patienten- und Kontrollkohorte aufgelistet.

Tab. 5: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur durchflusszytometrischen Frequenzanalyse der PBMC. AIH = Autoimmune Hepatitis; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; ALAT = Alanin-Aminotransferase; IgG = Immunglobulin G; n. u. = nicht untersucht. Normbereiche: ASAT und ALAT bei Frauen 10-35 IU/L, bei Männern 10-50 IU/L; IgG 7,00-16,00 g/L. Für das Alter, die ASAT-, ALAT- und IgG-Werte sind die Mediane und Datenbereiche (in Klammern) angegeben.

Diagnose- gruppe	Geschlecht (m/w)	Median Alter (Jahre)	Median ASAT (IU/L)	Median ALAT (IU/L)	Median IgG (g/L)	therapienaiv/ immunsuppressive Therapie
AIH (n = 6)	0/6	54 (46-83)	278 (63-808)	405 (77-840)	19,55 (12,80- 25,80)	6/0
Gesund (n = 8)	1/7	28 (26-32)	n. u.	n. u.	n. u.	8/0

Alle untersuchten Proben der AIH-Kohorte waren zum Zeitpunkt der Probenahme von therapienaiven Patienten. Diese wiesen eine erhöhte mediane ASAT mit 278 IU/L und eine erhöhte mediane ALAT mit 405 IU/L auf. Das mediane IgG lag mit ≈ 20 g/L ebenfalls über dem Normbereich. Die ASAT-, ALAT und IgG-Werte der acht gesunden und therapienaiven Kontrollprobanden wurden nicht gemessen.

2.1.6 Gewebeproben

Leberinfiltrierende Lymphozyten (LIL; *liver infiltrating lymphocytes*) wurden aus Leberbiopsien isoliert. Diese Gewebezylinder wurden den Patienten mittels der nicht-invasiven Minilaparoskopiemethode entnommen¹⁹⁶. Die Entnahme der Biopsien erfolgte freundlicherweise durch Mitglieder der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Verwendung der humanen Gewebeproben erfolgte nach schriftlicher Zustimmung der Patienten und gemäß den Richtlinien der lokalen Ethikkommission.

2.1.7 Patientenkohorte zur Untersuchung leberinfiltrierender Lymphozyten

Die klinischen Parameter der AIH-Patienten- und der Kontrollkohorte bezüglich der Untersuchung des Genexpressionsprofils von LIL auf Ribonukleinsäure (RNA, *ribonucleic acid*)-Ebene sind in Tab. 6 aufgeführt. Nicht untersuchte Parameter einzelner Probanden in den jeweiligen Kohorten wurden bei den Berechnungen der medianen Konzentrationen des jeweiligen Parameters nicht berücksichtigt.

Als Kontrollgruppe wurden jeweils zwei Adenom- und Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)-Patienten zusammengefasst. Bei einem Leberadenom handelt es sich um einen benignen Tumor. Im Rahmen der Adenombehandlung wird ein Teil des umgebenden Lebergewebes zusätzlich herausgeschnitten, um eine vollständige Entfernung des Tumors zu gewährleisten. Dieses nichtadenomatöse, mutmaßlich gesunde Gewebe wurde zur Isolierung von LIL verwendet. Bei der NASH handelt es sich um eine chronische Entzündung, die im Rahmen der Verfettung der Leber auftritt¹⁹⁷. Sie ist nicht durch Alkoholabusus bedingt, zeigt jedoch histologisch ähnliche Merkmale wie eine alkoholinduzierte Fettleber in Bezug auf den Hepatozytenschaden, die Kollageneinlagerung, entzündliche Zellinfiltrate und nekrotische Veränderungen. Die Werte der Aminotransferasen liegen im Allgemeinen unter 100 IU/L, wobei die ALAT in der Regel höher als die ASAT ist. Die NASH ist häufig assoziiert mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 und kann progredient zur Leberzirrhose führen.

Das Kollektiv der AIH-Erkrankten umfasste sieben therapienaïve Patienten und drei immunsuppressiv therapierte Patienten. Die medianen ASAT und ALAT waren in der AIH-Kohorte mit ≈ 80 IU/L bzw. 114 IU/L erhöht. Im Vergleich dazu waren die medianen ASAT und ALAT der Kontrollen mit 48 IU/L bzw. 54 IU/L niedriger. Das mediane IgG der AIH-Gruppe lag mit 23,80 g/L ebenfalls über dem Normbereich. Die IgG-Werte der Kontrollprobanden wurden nicht bestimmt.

Tab. 6: Klinische Parameter der Patienten- und Kontrollkohorte zur Untersuchung der Genexpression in LIL.

AIH = Autoimmune Hepatitis; NASH = Nichtalkoholische Steatohepatitis; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; ALAT = Alanin-Aminotransferase; IgG = Immunglobulin G; n. u. = nicht untersucht. Normbereiche: ASAT und ALAT bei Frauen 10-35 IU/L, bei Männern 10-50 IU/L; IgG 7,00-16,00 g/L. Für das Alter, die ASAT-, ALAT- und IgG-Werte sind die Mediane und Datenbereiche (in Klammern) angegeben. Nicht untersuchte Parameter wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen: Parameter bei ** 2 Probanden nicht untersucht.

Diagnose- gruppe	Geschlecht (m/w)	Median Alter (Jahre)	Median ASAT (IU/L)	Median ALAT (IU/L)	Median IgG (g/L)	therapienaïv/ immunsuppressive Therapie
AIH (n = 10)	0/10	45,5 (27-78)	79,5 (19-1339)	114 (21-940)	23,80 (8,76- 51,60)	7/3
Kontrolle (n = 4)	1/3	44,5 (18-60)	48 (41-69)	54** (42-66)	n. u.	4/0

In Tab. 7 sind die klinischen Daten der Patientenkohorten aufgelistet, bei denen die Zellfrequenz verschiedener Zellpopulationen anhand des Zytokinprofils analysiert wurde. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurden LIL von AIH-Patienten untersucht und mit PBMC von AIH-Patienten verglichen.

Tab. 7: Klinische Parameter der Patientenkohorten zur durchflusszytometrischen Frequenzanalyse bei LIL und PBMC von AIH-Patienten. AIH = Autoimmune Hepatitis; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; ALAT = Alanin-Aminotransferase; IgG = Immunglobulin G. Normbereiche: ASAT und ALAT bei Frauen 10-35 IU/L, bei Männern 10-50 IU/L; IgG 7,00-16,00 g/L. Für das Alter, die ASAT-, ALAT- und IgG-Werte sind die Mediane und Datenbereiche (in Klammern) angegeben.

Diagnose- gruppe	Geschlecht (m/w)	Median Alter (Jahre)	Median ASAT (IU/L)	Median ALAT (IU/L)	Median IgG (g/L)	therapienaiv/ immunsuppressive Therapie
AIH LIL (n = 3)	1/2	37 (28-43)	857 (272- 2207)	2550 (493- 2592)	17,40 (15,30- 23,60)	3/0
AIH PBMC (n = 6)	0/6	54 (46-83)	278 (63-808)	405 (77-840)	19,55 (12,80- 25,80)	6/0

Die AIH-Kohorte, aus deren Leberbiopsien LIL isoliert und zur Frequenzanalyse verwendet wurden, zeigten zum Zeitpunkt der Probennahme eine erhöhte mediane ASAT von 857 IU/L und eine erhöhte mediane ALAT von 2550 IU/L. Das mediane IgG lag mit 17,40 g/L ebenfalls über dem Normbereich. Die Daten der AIH-Patienten zur Untersuchung der Frequenz von PBMC entsprechen denen in Tab. 5.

2.2 Material

2.2.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Systec VX-120	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
CO ₂ -Inkubator	MCO-19AIC(UV)	SANYO Electric Biomedical Co. Ltd., München
Durchflusszytometer	LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrühilfebox	Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Scientific, Dreieich
Eisbehälter	Magic Touch	Bel-Art Products, Wayne, NJ, USA
ELISA-Auslesegerät	Opsys MRX TC II	Dynex Technologies, Denkendorf
Flockeneisbereiter	AF-10	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Hämozytometer	Neubauer-improved, Tiefe 0,100 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen
Kolbenhubpipetten	Einkanalpipetten: Eppendorf Research® Plus (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) 8-Kanalpipetten: Eppendorf Research® Plus (0,5-10 µl, 30-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlgeräte	4 °C-Kühlschrank -20 °C-Gefrierschrank -80 °C-Gefriertruhe Ultra Low	Robert Bosch GmbH, Stuttgart Liebherr, Bulle, Schweiz SANYO Electric Biomedical Co. Ltd., München
Lichtmikroskope	Axiovert 40 CFL ICS Standard 25 BH2	Carl Zeiss Microimaging, Jena Carl Zeiss Microimaging, Jena Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
pH-Meter	S20 - SevenEasy™ pH	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Pipettierhilfe	pipetus® PIPETBOY acu 2	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Röntgenanlage zur Bestrahlung	Xstrahl RS225	Gulmay Medical Inc., Suwanee, GA, USA
Schüttelwasserbad	GFL Typ 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttler und Heizblock	Thermomixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Sicherheitswerkbank	MSC-Advantage™	Thermo Scientific, Dreieich
Stickstofftank	V3000-AB	Custom BioGenic Systems Inc., Bruce Twp., MI, USA
Thermocycler	DNA Engine Dyad® ViiA™ 7 Real-Time PCR System	MJ Research Inc., St. Bruno, Kanada Applied Biosystems®, Darmstadt

Gerät	Modell	Hersteller
Spektralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Dreieich
Vakuumpumpe	BVC 21	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex-Schüttler	VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Waagen	Scout® Pro	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
	A200S Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifugen	MyFuge™ 12	Benchmark Scientific Inc., Edison, NJ, USA
	Microcentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
	Rotanta 460S	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
	Rotina 35	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Abdeckfolie für ELISA-Platten	Rotilabo®-Abdeckfolien für Mikrottestplatten	Carl Roth, Karlsruhe
Abdeckfolie für qPCR-Platten	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Blut- und Serumentnahmesystem	Safety-multifly-Set®-Set 21G mit langem Schlauch und montiertem Multi-Adapter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	S-Monovette® Kalium-EDTA 7,5 ml, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	S-Monovette® 7,5 ml, Serum-Gel, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
ELISA-Platten	F96 MaxiSorp™ Nunc-Immuno™ plate	Thermo Scientific, Dreieich
Pipettenspitzen	Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter:	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1250 µl	
qPCR-Platten	MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Kanülen	Microlance™ 3; 21G x 1½“ Nr. 2, 0,8 mm x 40 mm	BD Biosciences, Heidelberg
Kompensationspartikel	CompBeads, Anti-mouse Ig, κ	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen	CryoPure Gefäß, 1,6 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Laborglaswaren	DURAN®, versch. Größen	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main
Röhren für Durchflusssyotometrie	Röhre 5 ml, 75 x 12 mm, PS Matrix™ 1.4 ml Röhre, PP, Rundboden	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Reagenzreservoir	100 ml, PS, steril	VWR International GmbH, Darmstadt

Material	Modell	Hersteller
Reaktionsgefäße	0,2 ml (für PCR)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterilfiltereinheiten	Filtropur BT50, 500 ml, 0.2 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	Auffanggefäß 500 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	Steriflip™ Sterile Disposable Vacuum Filtration System, 50 ml	Merck Millipore, Billerica; MA, USA
Zellkulturflaschen	25 cm ² ohne Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten	48-Loch-Flachbodenplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen
	96-Loch-Rundbodenplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.2.3 Chemikalien, Kulturmedien, Reagenzien, Lösungen und Puffer

Zur Herstellung der Lösungen und Puffer wurde, falls nicht anders angegeben, vollentsalztes Wasser aus der Entsalzungsanlage des Hauses bzw. Aqua ad iniectabilia der Fa. Baxter verwendet.

- **ABTS-Substratlösung**
1 mg/ml ABTS
1 µl/ml H₂O₂ (30 %)
in Citratpuffer (pH 4,5); die Lösung wurde sofort verwendet
- **Aqua ad iniectabilia**
Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
- **Aqua destillata**
UltraPur™ DNase/RNase-Free Distilled Water
Gibco®/Life Technologies, Darmstadt
- **Biocoll**
gepuffert mit 10 mM HEPES, 1,077 g/ml, isotonisch
Biochrom GmbH, Berlin
- **Biopsiemedium**
1 Vol.-% Penicillin/Streptomycin-Stammlösung
in RPMI 1640-Medium
- **Citratpuffer, pH 4,5**
Citronensäure 40 mM
Na₂HPO₄ 60 mM
steril filtriert und autoklaviert

- **Citronensäure (C₆H₈O₇)**
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- **Diammonium-2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)**
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- **Dimethylsulfoxid (DMSO)**
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- **Dinatriumphosphat (Na₂HPO₄)**
Carl Roth, Karlsruhe
- **ELISA-Verdünnungspuffer**
0,05 Vol.-% Tween® 20
0,1 Gew.-% BSA
in 1x PBS
- **ELISA-Blockierungspuffer**
1 Gew.-% BSA
in 1x PBS
- **ELISA-Waschpuffer**
0,05 Vol.-% Tween® 20
in 1x PBS
- **Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)**
C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ x 2 H₂O
Carl Roth, Karlsruhe
- **Einfriermedium**
10 Vol.-% DMSO
in FCS (Abschnitt 2.2.4); steril filtriert
- **Ethanol ≥99,8 % unvergällt**
Emprove® exp, Merck KGaA, Darmstadt
- **Ethanol ≥99,8 % vergällt**
Carl Roth, Karlsruhe
- **Ethanol 70 %**
70 Vol.-% Ethanol ≥99,8 % vergällt
- **FACSFlow Sheath Fluid, 20 l**
BD Biosciences, Heidelberg
- **FACS Clean Solution**
BD Biosciences, Heidelberg

- **FACSRinse Solution, 5 l**
BD Biosciences, Heidelberg
- **Flüssiger Stickstoff**
Linde AG, Pullach
- **Kaliumchlorid (KCl)**
Merck KGaA, Darmstadt
- **Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)**
Merck KGaA, Darmstadt
- **Natriumchlorid (NaCl)**
Carl Roth, Karlsruhe
- **Penicillin/Streptomycin-Stammlösung**
10⁴ IU/ml Penicillin
10⁴ µg/ml Streptomycin
Gibco®/Life Technologies, Darmstadt
- **1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; *Phosphate-Buffered Saline*), pH 7,4**
KCl 2,7 mM
KH₂PO₄ 1,5 mM
NaCl 137 mM
Na₂HPO₄ 6,5 mM
autoklaviert
- **2-Propanol (Isopropanol, IPA)**
Sigma-Aldrich, Seelze
- **Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium**
Gibco®/Life Technologies, Darmstadt
- **Trypanblauammlösung**
Trypan Blue Stain (0.4 %),
Gibco®/Life Technologies, Darmstadt
- **Tween® 20**
Carl Roth, Karlsruhe
- **T-Zellkulturmedium**
5 Vol.-% humanes AB-Serum (Abschnitt 2.2.4)
1 Vol.-% Penicillin/Streptomycin-Stammlösung
1,25 mg/l Amphotericin B (Abschnitt 2.2.4)
in RPMI 1640-Medium; steril filtriert

- **Vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)**
Entsalzungsanlage des Hauses
- **Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %**
Carl Roth, Karlsruhe

2.2.4 Zytokine, Enzyme, rekombinante Proteine und andere Substanzen

Die folgend aufgeführten Substanzen wurden aliquotiert und soweit nicht anders angegeben bei -20 °C gelagert. Die Aliquote wurden nach dem erstmaligen Auftauen für höchstens vier Wochen bei 4 °C gelagert, um mehrfache Einfrier-Auftau-Zyklen zu verhindern und so den Verlust der Aktivität zu vermeiden.

- **Amphotericin B aus *Streptomyces sp.***
gelöst in DMSO
Sigma-Aldrich, Seelze
- **Bovines Serumalbumin (BSA) „Fraction V“**
PAA Laboratories, Pasching, Österreich
- **Fetales Kälberserum (FCS; *Fetal calf serum*)**
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- **GolgiPlug™**
Proteintransportinhibitor mit Brefeldin A
Lagerung bei 4 °C
BD Biosciences, Heidelberg
- **Humanes AB-Serum**
Human Serum „off the clot“, Type AB
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- **Ionomycin**
Calciumionophor aus *Streptomyces conglobatus*
gelöst in DMSO
Lagerung bei -80 °C
Sigma-Aldrich, Seelze
- **rh IL-2 (rekombinantes humanes Interleukin-2)**
Proleukin® S; 18 Mio. I.E. Pulver zur Herstellung einer Injektions- oder Infusionslösung,
Wirkstoff: Aldesleukin
gelöst in 1x PBS
Novartis Pharma GmbH, Nürnberg

- **Pacific Orange-N-Hydroxysuccinimid (PacO-NHS)**

gelöst in DMSO

Lagerung bei -80 °C

Life Technologies, Darmstadt

- **Phytohämagglutinin (PHA)**

Lektin aus *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne)

gelöst in 1x PBS

Sigma-Aldrich, Seelze

- **Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)**

gelöst in DMSO

Lagerung bei -80 °C

Sigma-Aldrich, Seelze

2.2.5 Synthetische Oligonukleotide

2.2.5.1 Primer für Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Bestimmung der RNA-Expression mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (Abschnitt 2.5.4.1) wurden die TaqMan® Gene Expression Assays (Fa. Applied Biosystems by Life Technologies) verwendet. Die Sonden wurden in Aliquoten bei -20 °C gelagert.

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Sondennummer	Konjugat
CCL5	chemokine (C_C motif) ligand 5	Hs00174575_m1	FAM
CCR5	chemokine (C_C motif) receptor 5	Hs99999149_s1	FAM
CCR6	chemokine (C_C motif) receptor 6	Hs01890706_s1	FAM
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	Hs00174164_m1	FAM
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Hs00929873_m1	FAM
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Hs01847760_s1	FAM
CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Hs00171065_m1	FAM
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs01124251_g1	FAM
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Hs04187682_g1	FAM
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs03929097_g1	FAM
GNLY	granulysin	Hs00246266_m1	FAM
GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic t-lymphocyte-associated serine esterase 1)	Hs01554355_m1	FAM
IFNg	interferon, gamma	Hs00989291_m1	FAM
IL2	interleukin 2	Hs00174114_m1	FAM
IL4	interleukin 4	Hs00174122_m1	FAM
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	Hs00985639_m1	FAM
IL10	interleukin 10	Hs00961622_m1	FAM

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Sondennummer	Konjugat
IL13	interleukin 13	Hs00174379_m1	FAM
IL17A	interleukin 17A	Hs00174383_m1	FAM
IL22	interleukin 22	Hs01574154_m1	FAM
PRF1	perforin 1 (pore forming protein)	Hs00169473_m1	FAM
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	Hs00998133_m1	FAM
TNF	tumor necrosis factor	Hs01113624_g1	FAM

2.2.6 Antikörper

2.2.6.1 Unmarkierte Antikörper zur In-vitro-Stimulierung

Die Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

Spezifität	Klon	Isotyp	Hersteller
anti-human CD3	OKT3	Maus IgG2a, κ	Biolegend, Fell
anti-human CD28	CD28.2	Maus IgG1, κ	Biolegend, Fell

2.2.6.2 Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

Spezifität	Klon	Konjugat	Isotyp	Hersteller
anti-human CD3	UCHT1	Alexa Fluor® 700	Maus IgG1, κ	Biolegend, Fell
anti-human CD4	RPA-T4	V450	Maus IgG1, κ	BD Horizon™, Heidelberg
anti-human CD8	RPA-T8	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen™, Heidelberg
anti-human CD8a	RPA-T8	APC	Maus IgG1, κ	Biolegend, Fell
anti-human IFN γ	B27	APC	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen™, Heidelberg
anti-human TNF α	MAb11	PE	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen™, Heidelberg
anti-human IL-17A	N49-653	Alexa Fluor® 488	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen™, Heidelberg

2.2.6.3 IOTest® Beta Mark TCR V β Repertoire Kit

Zur Untersuchung des TCR V β -Repertoires wurde das durchflusszytometrisch-basierte *IOTest® Beta Mark TCR V β Repertoire Kit* (Fa. Beckman Coulter) verwendet (Abschnitt 2.2.7). Das Fertigsystem besteht aus acht Mischungen, welche jeweils aus einem FITC-, einem PE- und einem FITC+PE-konjugierten Antikörper bestehen und in der Gesamtheit gegen 24 verschiedene TCR V β -Epitope gerichtet sind. Die Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

Name	Klon	IMGT-Name	Fluorochrom
Vb 1	BL37.2	TRBV9	FITC+PE
Vb 2	MPB2D5	TRBV20-1	FITC+PE
Vb 3	CH92	TRBV28	FITC
Vb 4	WJF24	TRBV29-1	FITC+PE
Vb 5.1	IMMU157	TRBV5-1	FITC+PE
Vb 5.2	36213	TRBV5-6	PE
Vb 5.3	3D11	TRBV5-5	PE
Vb 7.1	ZOE	TRBV4-1 – 4-3	FITC+PE
Vb 7.2	ZIZOU4	TRBV4-3	FITC
Vb 8	56C5.2	TRBV12-3, 12-4	FITC
Vb 9	FIN9	TRBV3-1	PE
Vb 11	C21	TRBV25-1	PE
Vb 12	VER2.32	TRBV10-3	FITC
Vb 13.1	IMMU222	TRBV6-5, 6-6, 6-9	PE
Vb 13.2	H132	TRBV6-2	PE
Vb 13.6	JU74.3	TRBV6-6	FITC+PE
Vb 14	CAS1.1.3	TRBV27	FITC
Vb 16	TAMAYA1.2	TRBV14	FITC
Vb 17	E17.5F3	TRBV19	FITC+PE
Vb 18	BA62.6	TRBV18	PE
Vb 20	ELL1.4	TRBV30	FITC
Vb 21.3	IG125	TRBV11-2	FITC
Vb 22	IMMU546	TRBV2	FITC+PE
Vb 23	AF23	TRBV13	PE

2.2.7 Fertigsysteme

Die Lagerung der Fertigsysteme erfolgte nach Herstellerangaben.

System	Hersteller
Cytofix/Cytoperm™ Solution (1X)	BD Biosciences, Heidelberg
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems®, Darmstadt
Human IFN- γ Standard ELISA Development Kit	PeproTech, Hamburg
Human IL-17A Standard ELISA Development Kit	PeproTech, Hamburg
Human TNF- α Standard ELISA Development Kit	PeproTech, Hamburg
IOtest® Beta Mark TCR V β Repertoire Kit	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Perm/Wash™ Buffer (10X)	BD Biosciences, Heidelberg
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.2.8 Software

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometrie	FlowJo FACS analysis software V7.6.5	Tree Star, Inc.
	FACSDiva™ Software 6.0	BD Pharmingen
	FACSDiva™ Software 8.0	BD Pharmingen
Konzentrationsbestimmung	NanoDrop 2000/2000c Software 1.6.198	Thermo Fisher Scientific Inc.
qPCR-Auswertung	ViiA 7 Analysesoftware	Applied Biosystems®
Statistik und Darstellung	GraphPad Prism 6 for Windows V6.01	GraphPad Software, Inc.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Aufreinigung und Kultivierung von Zellen

Die Aufreinigung und Kultivierung der Zellen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Dafür wurden autoklavierte bzw. steril verpackte und endotoxinfreie Einmalartikel (Plastikwaren) benutzt. Die verwendeten Lösungen wurden mittels eines 0,2 µm-Sterilfilters filtriert oder autoklaviert. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

2.3.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus humanem peripheren Blut

PBMC wurden aus Buffy Coats und aus Vollblut (Abschnitt 2.1.4) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (Abb. 6). Die hierfür verwendete Biocoll-Trennlösung besteht aus dem hydrophilen Polymer Polysucrose und ist in wässriger Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml erhältlich. Da die mittlere Dichte von Erythrozyten und Granulozyten mit 1,100 bzw. 1,079-1,092 g/cm³ höher ist¹⁹⁸, können diese Zellen bei der Zentrifugation sedimentieren. Im Gegensatz dazu ist die mittlere Dichte von PBMC wie Lymphozyten und Monozyten mit 1,070 bzw. 1,065 g/cm³ geringer¹⁹⁸. Aufgrund dessen können sich PBMC in der Grenzschicht zwischen Trennlösung und Plasma anreichern und bilden dort die sog. Intermediärphase. Die oberste Schicht bildet das Blutplasma, der flüssige Anteil des Blutes, in dem aufgrund von Größe und Dichte der Großteil der Thrombozyten enthalten ist.

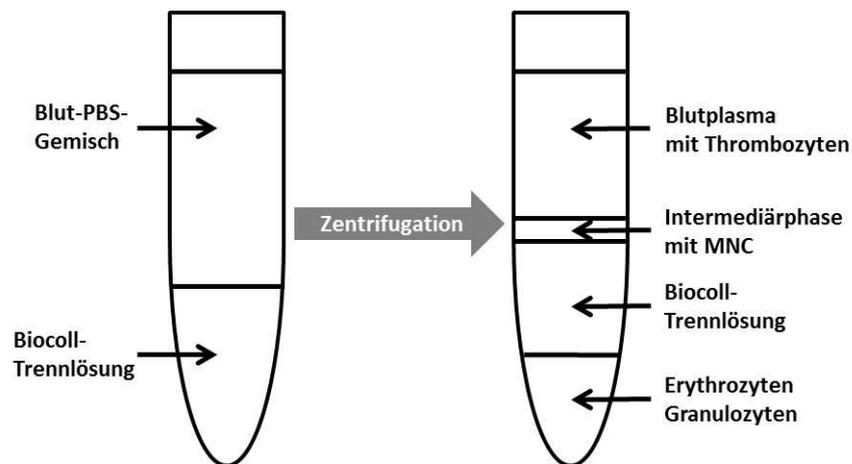


Abb. 6: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation. Auftrennung des peripheren Blutes in seine Bestandteile mittels einer Biocoll-Trennlösung der Dichte 1,077 g/ml.

Zur Fraktionierung des Blutes wurden 15 ml Biocoll-Trennlösung in einem 50 ml Reagenzgefäß vorgelegt und auf Raumtemperatur (RT) temperiert. Anschließend wurde in einem weiteren 50 ml-Reagenzgefäß entweder 15 ml Buffy Coat-Blut oder 20-25 ml Vollblut auf ein Volumen von 35 ml mit 1x PBS aufgefüllt und resuspendiert. Mit diesem Blut-PBS-Gemisch wurde die Biocoll-Trennlösung

überschichtet und der Ansatz mit minimaler Beschleunigung bei 600 x g und RT für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, um die Schärfe des Gradienten beizubehalten. Das Plasma wurde verworfen und die mit PBMC angereicherte Intermediärphase in ein frisches 50 ml-Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 50 ml 1x PBS gewaschen (430 x g, RT, 5 Minuten) und der Überstand jeweils dekantiert. Die PBMC wurden entweder eingefroren (Abschnitt 2.3.6) oder in Kulturmedium aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank gelagert.

2.3.3 Isolierung humaner leberinfiltrierender Lymphozyten aus Leberbiopsien

Zur Isolierung der LIL wurde den Probanden Leberbiopsien entnommen (Abschnitt 2.1.6), welche bis zur Probenaufarbeitung in 5 ml Biopsiemedium in einem 15 ml-Reagiergefäß bei RT bzw. im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Weiterführend wurde die Biopsie unter sterilen Bedingungen in mehrere Stücke zerteilt, um so die Emigrationsrate der Zellen in das Kulturmedium zu erhöhen. Die Zellisolierung erfolgte in einer Kavität einer 48-Loch-Flachbodenplatte. Hierfür wurde die Kavität mit 300 µl T-Zellkulturmedium und 100 U/ml IL-2 befüllt und die Gewebestücke in das Kulturmedium überführt. Das Biopsiemedium wurde bei 430 x g und RT für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellsedimente wurden anschließend in 200 µl T-Zellkulturmedium aufgenommen und den Gewebestücken in der Flachbodenplatte zugegeben, so dass sich abschließend 500 µl Kulturmedium in der Kavität befanden. Die Isolierung erfolgte über einen Zeitraum von vier bis sechs Tagen im Inkubator. Die Kultivierung der LIL ist in Abschnitt 2.3.5 beschrieben.

2.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mithilfe eines Hämozytometers und der Trypanblau-Ausschluss-Färbung ermittelt. Der Azofarbstoff Trypanblau bindet an zytosolische Proteine, d.h. bei Beschädigung einer Zelle dringt das Farbstoff-Anion in das Zytosol der Zelle ein und es kommt zu einer im Lichtmikroskop erkennbaren Blaufärbung. Vitale Zellen erscheinen dahingegen nicht blau und wurden für die Bestimmung der Lebendzellzahl ausgezählt. Die Zellsuspension wurde je nach Volumen der Zellsedimente in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:100 mit Trypanblau resuspendiert. Von dieser verdünnten Zellsuspension wurden 10 µl in das Hämozytometer überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 2 bzw. 4 Großquadrate ausgezählt und folgende Formel verwendet:

$$\frac{ZZ}{ml} = \frac{\text{Anzahl viabler Zellen in x Großquadraten}}{x \text{ Großquadrate}} * V * K$$

ZZ = Zellzahl; V = Verdünnungsfaktor (2, 5, 10, 50 bzw. 100); K = Kammerfaktor (10⁴/ml)

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Zellzahl pro ml mit dem Volumen an Medium multipliziert, in dem die Zellen aufgenommen waren.

2.3.5 Kultivierung humaner leberinfiltrierender Lymphozyten

2.3.5.1 Expansion humaner leberinfiltrierender Lymphozyten

Für die Expansion humaner LIL wurden die aus dem Lebergewebe emigrierten Zellen verwendet (Abschnitt 2.3.3). Hierfür wurde die Zellsuspension in ein Reagiergefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, die Gewebefragmente nicht mitzuführen. Zusätzlich wurde die Kavität mehrfach mit 1x PBS gespült und dieses ebenfalls zu den LIL gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 430 x g und RT für 5 Minuten zentrifugiert, die Sedimente in 500 µl T-Zellkulturmedium aufgenommen und gemäß Abschnitt 2.3.4 ausgezählt. Zur Stimulation der Expansion wurden $\sim 1 \cdot 10^4$ LIL/ml mit 100 U/ml IL-2, 1 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) und $1 \cdot 10^6$ bestrahlten Fütterzellen/ml in einem Volumen von 200 µl pro Kavität in einer 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät. Als Fütterzellen wurden allogene PBMC verwendet, die aus Buffy Coats isoliert wurden (Abschnitt 2.3.2). Diese Zellen wurden mit einer Dosis von 45 Gy bestrahlt, um deren Zellteilung zu unterbinden, wobei sie dennoch in der Lage sind für eine Dauer kürzer als 2 Wochen Überlebenssignale in Form von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu generieren. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mittels einer Gulmay-Röntgenröhre bei einem Röhrenstrom von 15 mA, einer Röhrenspannung von 200 kV und einem 0,5 mm Kupferfilter mit einer Dosisleistung von 1,2 Gy/min bei RT. Physiologisch werden T-Zellen durch die Bindung eines spezifischen Liganden an den TCR aktiviert. Bei PHA handelt es sich um ein Mitogen, das T-Zellen antigenunspezifisch aktivieren kann, indem es Oberflächenmoleküle, einschließlich des TCR, kreuzvernetzt. Dadurch kommt es zu einer polyklonalen Aktivierung und Agglutination der T-Zellen¹. IL-2 ist ein von aktivierten T-Zellen sezerniertes Zytokin, welches *per se* die T-Zellaktivierung und klonale Expansion unterstützt. Die Zellen wurden in einem Abstand von drei bis vier Tagen mit frischem Kulturmedium versorgt. Dabei wurden pro Kavität 100 µl Überstand abgenommen und mit 100 µl IL-2-supplementiertem T-Zellkulturmedium wieder aufgefüllt, wobei die IL-2-Endkonzentration pro Kavität 100 U/ml betrug. Die Ernte der Zellen erfolgte an Tag 13 bzw. 14 der Kultivierung. Die Zellen wurden dabei in ein entsprechendes Reagiergefäß überführt und gemäß Abschnitt 2.3.6 kryokonserviert.

2.3.5.2 T-Zellklonierung humaner leberinfiltrierender Lymphozyten

Zur Generierung von T-Zellklonen aus humanen LIL wurde die Methode des Grenzverdünnungsklonens (*Limiting Dilution Cloning*) gewählt. Das zugrundeliegende Prinzip ist die Verdünnung eines Zellgemisches, so dass statistisch eine Zelle in einer Kavität ausgesät ist und durch Expansion eine monoklonale Zellkultur generiert wird¹⁹⁹. Für die Klonierung wurden die aus dem

Lebergewebe emigrierten LIL verwendet und wie unter Abschnitt 2.3.5.1 beschrieben geerntet und gezählt. Für den Klonierungsansatz wurde die Zellsuspension mit T-Zellkulturmedium verdünnt, so dass statistisch 0,3 Zellen ausgesät wurden, d.h. eine Zelle in jeder dritten bis vierten Kavität. Um die Einzelzellen effektiv zu expandieren, enthielt der Klonierungsansatz, wie auch unter Abschnitt 2.3.5.1 beschrieben, 100 U/ml IL-2, 1 µg/ml PHA und $1 \cdot 10^6$ bestrahlte Fütterzellen/ml und wurde als 200 µl-Ansatz pro Kavität in eine 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert.

Bei den monoklonalen Zellkulturen wurden alle drei bis vier Tage 100 µl Überstand abgenommen und durch frisches IL-2-supplementiertes T-Zellkulturmedium ersetzt (Abschnitt 2.3.5.1). Zusätzlich wurde die Expansion durch eine repetitive Restimulierung mit IL-2, PHA und bestrahlten Fütterzellen in den oben genannten Endkonzentrationen alle 14 Tage vorangetrieben. Hierbei wurden ebenfalls 100 µl Überstand abgenommen und durch 100 µl-Restimulierungsansatz wieder ausgeglichen. Die Überprüfung der Zellkulturen erfolgte während der Kultivierung visuell mithilfe eines Lichtmikroskops. Dabei wurden Zellen in Kavitäten mit offensichtlicher Expansion als auch sog. Clusterbildung (Abb. 35) als potentiell klonal eingestuft. Die endgültige Klonalitätsüberprüfung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abschnitt 2.4.3). Um eine effektive Expansion der als potentiell klonal eingestuften Zellkulturen zu erreichen, wurden diese mehrmals geteilt.

Die Ernte der potentiellen T-Zellklone erfolgte ein bis zwei Tage vor dem folgenden Restimulierungsvorgang. Zusätzlich wurde auch ein Teil der Zellen als Rückstellprobe eingefroren, wobei die Ernte in der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte, d.h. zwei bis drei Tage nach Restimulierung. Bis zur endgültigen Klonalitätsbestimmung wurden die Zellen kryokonserviert (Abschnitt 2.3.6).

2.3.6 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Kryokonservierung von PBMC, LIL und T-Zellklonen wurden die Zellen bei 430 x g und RT für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Pro Kryoröhrchen wurde die Zellen in 1 ml gekühltem Einfriermedium aufgenommen und in das Kryoröhrchen überführt. Diese wurden sofort auf Eis gelagert und anschließend für mindestens 24 Stunden in einem Gefrierbehälter graduell auf -80 °C heruntergekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO dient der Verhinderung der Kristallbildung in den Zellen während des Einfrierens.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei RT angetaut. Um die zytotoxische Wirkung des DMSO zu minimieren, wurden der angetauten Zellsuspension tropfenweise gekühltes 1x PBS zugeführt und in ein größeres Volumen gekühltes 1x PBS überführt. Die Suspension wurde bei 430 x g und RT für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in T-Zellkulturmedium bzw. 1x PBS aufgenommen. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Hämozytometer verwendet und die

Überprüfung der Vitalität erfolgte mittels der Trypanblau-Ausschluss-Färbung (Abschnitt 2.3.4). Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Zytokinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA

2.4.1.1 *Stimulierung von Zellen für die Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand*

Zur Bestimmung der Zytokinsekretion durch T-Zellen mittels ELISA wurden PBMC verwendet. Dafür wurden die Zellen mit T-Zellkulturmedium auf eine Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und über Nacht im Inkubator gelagert. Zur Stimulierung der Zellen wurden unmarkierte α CD3 und α CD28 Antikörper (Abschnitt 2.2.6.1) verwendet, welche über eine Kreuzvernetzung der Oberflächenrezeptoren CD3 und CD28 spezifisch T-Zellen aktivieren können. Hierfür wurde 50 μ l der α CD3-Lösung in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in einer Konzentration von 1 μ g/ml für mindestens zwei Stunden durch Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ auf der Platte immobilisiert. Im folgenden Schritt wurde ungebundener α CD3 aus den Kavitäten der Zellkulturplatte durch Waschen mit 1x PBS entfernt und pro Kavität 100 μ l der Zellsuspension sowie 100 μ l T-Zellkulturmedium zugegeben, welches mit 1 μ g/ml α CD28 supplementiert war. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ für 96 Stunden. Pro Kavität wurde 160 μ l des Zellkulturüberstandes abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.4.1.2 *Serumproben*

Zur Untersuchung der Zytokinkonzentration im Blutserum mittels ELISA wurden Proben aus der Diagnostik der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet (Abschnitt 2.1.2).

2.4.1.3 *Zytokin-ELISA*

Zytokinkonzentrationen in Serum (Abschnitt 2.1.2) und Zellkulturüberständen (Abschnitt 2.4.1.1) wurden mithilfe des Sandwich-ELISA-Verfahrens bestimmt. Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein Nachweisverfahren bei dem zwei verschiedene Antikörper eingesetzt werden, welche unterschiedliche Epitope des gleichen Moleküls erkennen. Nachdem der Fängerantikörper an eine feste Phase gebunden ist, können die in Serum und Zellkulturüberstand enthaltenen Zytokine spezifisch an diesen Antikörper binden. Durch Zugabe und Bindung des Detektionsantikörpers kommt es zur bezeichnenden Sandwich-Struktur. Zusätzlich ist der Antikörper an eine chromogenes Detektionssystem zur Bestimmung der Zytokinkonzentration gekoppelt. Dafür wird an den biotinylierten Detektionsantikörper eine Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser katalysiert. Als Reduktionsmittels wird das

Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) eingesetzt, welches nach Oxidation zu einem löslichen grünen Farbstoff umgesetzt wird. Die Zytokinkonzentration ist proportional zum Farbumschlag von farblos nach grün und kann mittels einer mitgeführten Standardreihe bestimmt werden. Die Bestimmung der Intensität der Färbung erfolgt photometrisch über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Zytokinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA erfolgte gemäß Herstellerprotokoll mit 50 µl Probe- und Standardvolumen.

2.4.2 Durchflusszytometrie

Unter Durchflusszytometrie (FC; *Flow Cytometry*) versteht man ein Verfahren, mit welchem man Zellen in einer Suspension anhand ihrer Struktur, der Expression von Oberflächenmolekülen und der intrazellulären Zusammensetzung charakterisiert und unterscheidet. Ermöglicht wird dies durch ein Durchflusszytometer (FACS; *Fluorescence activated cell sorting*), womit physikalische Eigenschaften wie die Größe von Zellen mittels Vorwärtsstreulicht (FSC; *Forward Scatter*) oder deren Granularität mittels Seitwärtsstreulicht (SSC; *Side Scatter*) ermittelt werden. Gleichzeitig ist es möglich definierte Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine mittels spezifischer, fluorochromgekoppelter Antikörper (Ak) und Moleküle zu messen. Hierfür werden die Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeführt und mithilfe eines Detektionssystems die Streulicht- und Fluoreszenzemission jeder einzelnen Zelle bestimmt. In der Analyse wird die Summe aller Einzelmessungen verarbeitet.

2.4.2.1 Unspezifische Aktivierung von T-Zellen mit PMA und Ionomycin

T-Zellen können durch eine Kombination aus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin unspezifisch aktiviert werden, indem sie in die Signalkaskade der Zytokinproduktion eingreifen. PMA ist ein Molekül, welches im Zytoplasma der Zelle die Proteinkinase C direkt aktivieren kann und somit eine antigenspezifische Aktivierung über den TCR umgeht. Ionomycin induziert einen Einstrom von Ca^{2+} und verstärkt somit die Aktivität der calciumabhängigen Proteinkinase C. Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der intrazellulären Zytokinkonzentration wurde zusätzlich GolgiPlug™ (BD Biosciences) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Proteintransportinhibitor, der zu einer Akkumulation der Zytokine im Golgi-Apparat führt, somit die Zytokinsekretion verhindert und infolgedessen die Detektierbarkeit der zytokinproduzierenden Zellen im Durchflusszytometer nach Immunfluoreszenzfärbung erhöht.

Zur unspezifischen Stimulation wurden PBMC in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Z/ml in einer 96-Loch-Rundbodenplatte kultiviert. Nach 20 Stunden wurde das T-Zellkulturmedium mit 5 ng/ml PMA, 1 µg/ml Ionomycin und 1 µl/ml GolgiPlug™ supplementiert und die Zellen für weitere 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf Vitalität

(Abschnitt 2.4.2.2), Oberflächenmarker (Abschnitt 2.4.2.3) und intrazellulär produzierte Zytokine (Abschnitt 2.4.2.4) gefärbt und durchflusszytometrisch erfasst (Abschnitt 2.4.2.5).

2.4.2.2 Vitalfärbung

Zur durchflusszytometrischen Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde der Farbstoff Pacific Orange-NHS (PacO-NHS) verwendet. Aufgrund des Verlustes der Membranintegrität bei toten Zellen kann der Farbstoff in die Zelle eindringen und an freie Amine binden, welche überwiegend im Zellinneren vorliegen. Vitale Zellen bleiben ungefärbt, wodurch tote Zellen anhand einer erhöhten Fluoreszenzintensität von Lebenden unterschieden werden können. Für die Vitalfärbung wurden die Zellen in FC-Röhrchen überführt, mit 1x PBS bei 430 x g und RT für 5 Minuten gewaschen und der Überstand verworfen. Die Färbung erfolgte in 200 µl einer 1:1000-Verdünnung, wobei PacO-NHS mit 1x PBS verdünnt wurde. Nach einer Inkubation von 20 - 30 Minuten bei 4 °C im Dunklen wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und darauf die Oberflächenfärbung begonnen (Abschnitt 2.4.2.3).

2.4.2.3 Extrazelluläre Färbung

Die Färbung der Oberflächenantigene der Zellen erfolgte entsprechend der Ak-Konzentration mit je 0,5-20,0 µl Ak/Ansatz verdünnt in 1x PBS in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Während der Färbung wurden die Zellen für 20 Minuten bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Im folgenden Waschschrift mit 1 ml 1x PBS wurden ungebundene Antikörper entfernt.

Erfolgte anschließend keine intrazelluläre Färbung, wurden die Zellen zur Fixierung der an die Zelloberfläche gebundenen Antikörper in 500 µl 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 1 ml 1x PBS wurden die Zellsedimente in 300 µl 1x PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C dunkel gelagert.

Bei anschließender intrazellulärer Färbung wurden die Zellen zur Fixierung der oberflächengebundenen Antikörper in 250 µl Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) resuspendiert, welches 4 % PFA enthält, und für 20 Minuten bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Eine zusätzliche Eigenschaft von Cytofix/Cytoperm™ ist die Permeabilisierung der Zellmembran, ein notwendiger Schritt für die Färbung intrazellulärer Antigene (Abschnitt 2.4.2.4).

2.4.2.4 Intrazelluläre Färbung

Nach erfolgter Fixierung und Permeabilisierung (Abschnitt 2.4.2.3) wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml verdünntem Perm/Wash™-Waschpuffer (BD Biosciences) gewaschen. Dafür wurde das 10x Perm/Wash™-Konzentrat 1:10 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt. Zur Färbung der intrazellulären Antigene wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 50 µl gefärbt, wobei je nach Ak-Konzentration 0,5-20,0 µl Ak/Ansatz in 1x PBS verdünnt wurden. Die Ansätze wurden für 30 Minuten

bei 4 °C im Dunklen inkubiert und anschließend mit je 1 ml 1:10-verdünntem Waschpuffer gewaschen. Wie schon in Abschnitt 2.4.2.3 beschrieben, wurden abschließend die gebundenen Antikörper in 500 µl 4 %igem PFA für 15 Minuten bei 4 °C fixiert, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und bis zur Analyse in 300 µl 1x PBS bei 4 °C dunkel gelagert.

2.4.2.5 Durchflusszytometrische Messung

Bei der durchflusszytometrischen Messung werden die gefärbten Zellen einzeln in einer Messzelle an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Anhand des Streulichts und des Fluoreszenzlichts, welches durch die fluorochromgekoppelten Antikörper bedingt ist, erfolgt die Charakterisierung der Einzelzellen. Bei der Wanderung der Zelle durch den Laserstrahl wird am Detektor ein Signal in Form von Spannung gemessen und mittels der Bearbeitungssoftware in einen Messwert umgewandelt. Da verschiedene Fluorochrome unterschiedliche Emissionsspektren haben, werden die einzelnen Spektralbereiche den verschiedenen Detektoren über vorgeschaltete Filter zugewiesen. Da es auch zur spektralen Überlappung einzelner Fluorochrome kommen kann, ist eine sog. spektrale Kompensation zur Entfernung überschneidender Fluoreszenzen notwendig. Hierfür wurden zusätzlich Einzelfärbungen mit Polystyrolmikropartikeln (BD™ CompBeads) angesetzt, welche mit den jeweiligen im Versuch verwendeten Ak angefärbt wurden. Zusätzlich emittiert jede Zelle etwas Streulicht in jedem Wellenlängenbereich, so dass auf jedem Detektor ein Signal empfangen wird, obwohl keine Markierung mit einem entsprechenden Fluorochrom vorliegt. Um diese Autofluoreszenz auszuschließen, wurden zusätzlich ungefärbte Zellen gemessen, welche die gleiche Färbeprozedur wie die Proben durchliefen, jedoch ohne Markierung mit fluorochrommarkierten Antikörper oder Molekülen.

Zur Aufnahme, Kompensation und Analyse der Daten wurde das BD™ LRS II Durchflusszytometer in Kombination mit der Software BD FACSDiva verwendet. Als weitere Analysesoftware diente auch die FlowJo FACS analysis software. Es erfolgte eine Exklusion von Dubletten mittels FSC-Einstellungen und toter Zellen mithilfe von PacO-NHS (Abschnitt 2.4.2.2).

2.4.3 Klonalitätsbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Eine Option des Klonalitätsnachweises von T-Zellklonen basiert auf der durchflusszytometrischen Bestimmung von Vβ-Ketten. Zur Testung der Klonalität wurde das IOTest® Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (Beckman Coulter) verwendet. Dieses System umfasst verschiedene monoklonale, fluorochromkonjugierte Ak, welche 24 verschiedene TCR Vβ-Spezifitäten erkennen und somit ca. 70 % des normalen humanen TCR Vβ-Repertoires bei CD3⁺ Lymphozyten abdecken. Pro Färbeansatz ist es möglich drei verschiedene Spezifitäten gleichzeitig zu testen, da die Antikörper in einem Antikörpergemisch je nach Spezifität entweder FITC-, PE- oder FITC+PE-gekoppelt sind. Damit

ergeben sich bei 24 Spezifitäten insgesamt acht Färbeansätze mit den verschiedenen Antikörpermischungen (A-H) pro potentiellen T-Zellklon.

Die potentiellen T-Zellklone wurden aufgetaut (Abschnitt 2.3.6) und die Zellzahl bestimmt (Abschnitt 2.3.4). Pro potentiellen T-Zellklon wurde ein Färbeset mit neun Färbeansätzen angelegt, wofür in eine 96-Loch-Rundbodenplatte bis zu $2 \cdot 10^5$ Zellen/Kavität pro Färbeansatz in 200 μ l 1x PBS bzw. T-Zellkulturmedium gegeben und anschließend für 5 Minuten bei 430 x g und 4° C abzentrifugiert wurden. Alle neun Färbeansätze wurden auf ihre Vitalität mit PacO-NHS gefärbt (Abschnitt 2.4.2.2) und anschließend mit 0,5 μ l anti-CD3, 1,0 μ l anti-CD4 und 0,8 μ l anti-CD8 Antikörper pro Färbeansatz angefärbt. Zusätzlich wurden acht der Färbeansätze mit je 7,0 μ l Antikörpergemisch (A-H) behandelt und der neunte Ansatz mit 7,0 μ l 1x PBS zur Kontrolle. Die Färbung von CD3, CD4, CD8 und der verschiedenen TCR V β -Spezifitäten erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 μ l für 20 Minuten bei 4° C im Dunklen. Im folgenden Waschschrift wurde die Zellsuspension pro Kavität mit 1x PBS auf 200 μ l aufgefüllt und bei 430 x g und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Fixierung der gebundenen Antikörper wurden die Zellen in je 200 μ l 0,5 % PFA/1x PBS-Lösung pro Färbeansatz aufgenommen, in Matrix™ 1.4 ml Röhren transferiert und bei 4° C im Dunklen gelagert. Die Messung der Proben (Abschnitt 2.4.2.5) erfolgte innerhalb von 24 Stunden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Mittels der RNA ist es möglich die Zellaktivität zu einem definierten Zeitpunkt darzustellen und zwar bedingt durch die Tatsache, dass in diesem Moment nur die Gene als RNA in der Zelle vorliegen, die aktuell transkribiert sind. Für die RNA-Isolierung wurden kryokonservierte Zellen aufgetaut (Abschnitt 2.3.6) bzw. frische Zellen verwendet. Zur Aufreinigung der RNA aus PBMC und LIL wurde mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen gearbeitet und gemäß den Herstellerangaben verfahren. Die Eluierung der RNA erfolgte mit 40 μ l RNase/DNase-freiem Wasser. Im Anschluss wurde die Konzentration und Reinheit des Eluats bestimmt (Abschnitt 2.5.2) und die aufgereinigte RNA entweder direkt für die Reverse Transkription verwendet (Abschnitt 2.5.3) bzw. langfristig bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wie DNA oder RNA, wurde photometrisch über die OD bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Grund hierfür ist das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren in diesem Wellenlängenbereich, was vor allem auf die Absorption der heterozyklischen Ringe der

Basen zurückzuführen ist. Aus der Extinktion kann die Konzentration der Lösung allgemein durch folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * V * \text{Mf}$$

V = Verdünnungsfaktor; Mf = Multiplikationsfaktor: dsDNA=50, RNA=40, ssDNA= 33

$\text{OD}_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger (ds; *double-stranded*) DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA bzw. 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger (ss; *single-stranded*) DNA, wodurch der Multiplikationsfaktor Mf bei pH 7,0 für dsDNA 50, für RNA 40 bzw. für ssDNA 33 beträgt. Da es bei der Aufreinigung der Nukleinsäuren auch zu Kontaminationen kommen kann, wurde zusätzlich die Reinheit der Proben überprüft. Hierfür wurde unter anderem das Absorptionsmaximum von Proteinen bestimmt, welches auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm basiert. Hierbei gilt, dass $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ von $\approx 1,8$ einer reinen DNA- und von $\approx 2,0$ einer reinen RNA-Lösung entspricht. Ein zweites Maß der Reinheit von Nukleinsäuren ist der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$, welcher im Bereich 2,0 - 2,2 liegen sollte. Ist der Wert niedriger, zeigt dies Verunreinigungen durch Lösungsmittelrückstände an, die bei 230 nm absorbieren. Für die Messung wurden 2 μl der Nukleinsäurelösung auf die Messeinheit des Spektralphotometers NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) appliziert. Die Konzentrationen wurden durch das Gerät automatisch berechnet.

2.5.3 Reverse Transkription

Durch herkömmliche Polymerasen, wie sie die in Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*) verwendet werden, ist eine Amplifizierung von RNA nicht möglich. Deshalb nutzt man die Reverse Transkription, bei der es zu einer Umkehr der Transkription kommt. D.h. aus RNA wird die dazu komplementäre DNA (cDNA; *complementary DNA*) generiert, um diese dann in einer PCR zu amplifizieren. Im Gegensatz zur Verwendung von genomischer DNA als Matrize, ist es durch die Kombination dieser Methoden möglich, die Expression der Gene zu untersuchen, welche auch tatsächlich exprimiert sind. Die Reverse Transkription wird durch die Reverse Transkriptase katalysiert, ein in Retroviren entdecktes Protein.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems® verwendet. Alle Komponenten wurden auf Eis aufgetaut und pro Ansatz wurde bis zu 1 μg RNA eingesetzt. Die Reverse Transkription-Reaktionsansätze wurden gemäß den Angaben des Herstellers nach folgendem Schema pipettiert:

Reaktionskomponenten	Volumen pro Reaktion
10x RT-Puffer	2,0 µl
25x dNTP-Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random-Primer	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µl
RNase-Inhibitor	1,0 µl
Nuklease-freies Wasser	3,2 µl
RNA-Matrize / Nuklease-freies Wasser	10,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Nach Resuspension und Zentrifugation wurden die Proben unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Äquibrierungsphase	25 °C	10 min
Reverse Transkription	37 °C	120 min
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	85 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

Die Amplifikate wurden entweder direkt verwendet oder längerfristig bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA-Abschnitten *in vitro*. Dabei bedient man sich sog. Primer, also Oligonukleotiden, die als Startpunkt der DNA-Polymerase dienen. Aufgrund der definierten Primersequenzen, welche komplementär zur DNA-Matrize sind, ist die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes möglich. Bei der PCR werden in sich wiederholenden Zyklen jeweils die vorher synthetisierten DNA-Amplifikate als Matrizen verwendet, so dass es sich im Idealfall um eine exponentielle Amplifikation handelt. Ein PCR-Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen: Bei der Denaturierung wird die dsDNA so stark erhitzt, dass die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden und die Stränge sich trennen. In der Phase der Primerhybridisierung, dem sog. Annealing, kommt es zur spezifischen Anlagerung der Primer, wobei die Hybridisierungstemperatur durch Primerlänge und -sequenz bestimmt ist. In der Elongation setzt die DNA-Polymerase an das 3'-Ende des Primers an und füllt diesen mit freien Nukleotiden auf, während sie dem DNA-Strang folgt. Dabei entscheidet das Arbeitsoptimum der Polymerase über die Temperatur des Schrittes. Nach Beendigung des PCR-Prozesses werden die Reaktionsansätze bis zur weiteren Verarbeitung auf 4 °C abgekühlt.

2.5.4.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Eine Form der PCR, die Quantitative PCR (qPCR), ermöglicht die Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit. Dabei wird die Zunahme des Amplifikats über Fluoreszenzfarbstoffe in jedem Zyklus gemessen. Die Untersuchungen wurde mithilfe sequenzspezifischer TaqMan® Gene Expression Assays (Abschnitt 2.2.5.1) durchgeführt. Diese beinhalten zum einen ein unmarkiertes Primerpaar zur Amplifizierung der Matrize, zum anderen eine fluoreszenzmarkierte Sonde mit dem Reporter FAM (6-Carboxylfluorescein) und dem Quencher MGB (*minor groove binder*). Bei räumlicher Nähe von Reporter und Quencher wird die Fluoreszenz supprimiert. Während der PCR-Reaktion wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut und der Reporter vom Quencher getrennt, wodurch die Fluoreszenz des Reporters detektiert werden kann. Die Fluoreszenz ist proportional zur Amplifikatmenge.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der qPCR zur Analyse der Expression verschiedener Gene sowohl in PBMC als auch in LIL genutzt. Hierfür wurden die Reaktionsansätze in speziellen qPCR-Platten wie folgt zusammengegeben:

Reaktionskomponenten	Volumen pro Reaktion
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	5,0 µl
TaqMan® Gene Expression Assay	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	3,5 µl
cDNA-Matrize	1,0 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl

Anschließend wurden die Platten mit speziellen Abdeckfolien verschlossen und für 1 Minute bei 200 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Messungen erfolgten mithilfe des ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems unter Verwendung des folgenden Programmes:

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	20 sec	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	1 sec	} 40 Zyklen
Annealing/Elongation	60 °C	20 sec	

Die relative mRNA-Expression wurde mittels der ΔC_T -Methode (Abschnitt 2.5.4.2) ermittelt.

2.5.4.2 Relative Quantifizierung mittels ΔC_T -Methode

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mittels der C_T -Werte, die durch die Analysesoftware des ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems ermittelt wurden. Der C_T -Wert

(Schwellenwertzyklus; *Cycle threshold*) bezeichnet den Zyklus, in dem das gemessene Fluoreszenzsignal den definierten Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Hierbei gilt der Grundsatz: Je mehr Matrize vor der Amplifikation in der Lösung vorliegt, desto mehr Kopien entstehen während der Amplifikation, dementsprechend schneller treten Fluoreszenzsignale auf, die zu einer Überschreitung des Schwellenwertes führen. Zur relativen Quantifizierung ist eine interne Kontrolle notwendig, um Unterschiede in der Ausgangsmenge der eingesetzten Matrize der verschiedenen Proben auszugleichen. Dabei bedient man sich sog. Haushaltsgene, die konstitutiv in allen Zelltypen exprimiert und nicht reguliert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als endogene Kontrolle verwendet. Die untersuchten Proben wurden in Duplikatansätzen gemessen und aus den C_T -Werten der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte gemäß den folgenden Formeln:

$$(1) \Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Haushaltsgen})$$

$$(2) \text{relative Expression} = 2^{-\Delta C_T}$$

Bei der relativen Quantifizierung wird also das Expressionsniveau zweier verschiedener Zielsequenzen in der gleichen Probe verglichen, d.h. das des zu analysierenden Zielgens und als Referenz, das des Haushaltsgens. Das Ergebnis ist das Verhältnis dieser beiden Gene zueinander, wobei es sich um eine relative und dimensionslose Zahl handelt, die nur zum Vergleich mit anderen gleichartigen Proben geeignet ist.

Zur Auswertung der Änderung der relativen Expression aller Proben und Kontrollen wurde das mediane Expressionsniveau der Kontrollen gleich eins gesetzt und die übrigen Werte darauf normiert.

2.6 Statistische Auswertung

Zur graphischen und/oder statistischen Auswertung der ELISA-Daten, der durchflusszytometrischen Daten, der Genexpressionsstudien und der klinischen Parameter der Probanden wurde die Software GraphPad Prism 6 verwendet. Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders angegeben, als Median aufgeführt und graphisch dargestellt. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde die Signifikanz mit dem ungepaarten, nichtparametrischen Mann-Whitney-Test errechnet. Die ermittelten Signifikanzen sind als p-Werte angegeben. Dabei gelten p-Werte als tendenziell, wenn $p \leq 0,1$ ist und als statistisch signifikant, wenn $p \leq 0,05$ mit folgenden Abstufungen des Signifikanzniveaus: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Zytokinprofils im Serum von AIH-Patienten

Bei Patienten mit AIH Typ I aus Europa und Nordamerika ist eine enge Assoziation mit den MHC II-Molekülen HLA-DRB1*0301 und HLA-DRB1*0401 nachgewiesen worden²⁰⁰, was auf eine tragende Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der AIH-Pathogenese deutet. Zusätzlich wurde eine erhöhte Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Leber nachgewiesen^{110,148,201,202}. Proinflammatorische T_H1-Zellen scheinen hierbei die dominierende Population leberinfiltrierender CD4⁺ T-Zellen auszumachen, aber auch T_H17-Zellen konnten in der Leber von AIH-Patienten nachgewiesen werden^{163,181}. Daher wurde die Sekretion der T_H1- und T_H17-spezifischen Zytokine IFN γ , TNF α (Abschnitt 3.1.1) sowie IL-17A (Abschnitt 3.1.2) im Serum von AIH-Patienten analysiert.

3.1.1 T_H1-assoziierte Zytokine im Serum

Es wurden die Zytokinspiegel von IFN γ und TNF α als Signaturzytokine für T_H1-Zellen im Serum von AIH-Patienten mittels Zytokin-ELISA untersucht (Abb. 7). Die AIH-Kohorte bestand aus je vier Patienten mit AIH, die sich in kompletter bzw. partieller Remission befanden. Als Kontrollgruppe dienten Serumproben von Probanden, die bezüglich der Leber als gesund eingestuft waren.

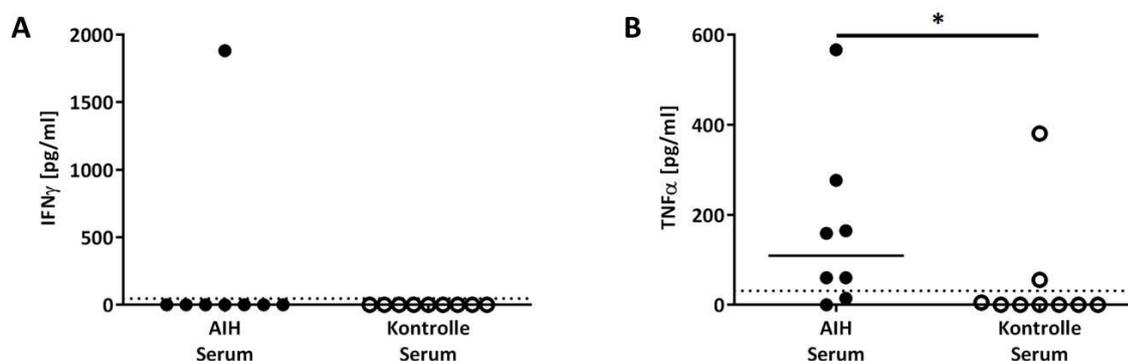


Abb. 7: IFN γ - und TNF α -Zytokinprofil der Serumproben von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. In den Serumproben wurde die Konzentration von (A) IFN γ und (B) TNF α mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Die gepunktete Linie repräsentiert die Detektionsgrenze des Tests. Statistisch signifikante Unterschiede in der Zytokinkonzentration im Serum von AIH-Patienten gegenüber Kontrollprobanden sind angegeben. (* $p \leq 0,05$)

Die mediane IFN γ -Konzentration lag in der Kontrollgruppe und der AIH-Gruppe unter der Detektionsgrenze von 47 pg/ml (Abb. 7A; $p > 0,05$). Die Konzentrationsbestimmung von TNF α (Abb. 7B) ergab in der Kontrollgruppe eine mediane Konzentration unter der Detektionsgrenze von ≈ 31 pg/ml. Die Gruppe der AIH-Patienten wies eine mediane TNF α -Konzentration von ≈ 109 pg/ml auf und zeigte eine signifikant erhöhte TNF α -Serumkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0225$).

3.1.2 T_H17-assoziiertes Zytokin im Serum

Als Signaturzytokin für T_H17-Zellen wurde die Konzentration von IL-17A mithilfe eines Zytokin-ELISAs im Serum gemessen. Dabei wurden je vier Patienten mit AIH in kompletter bzw. partieller Remission zu einer Gruppe zusammengefasst. Zur Kontrolle wurden Serumproben von Probanden verwendet, die in Bezug auf die Leber als gesund eingestuft wurden (Abb. 8).

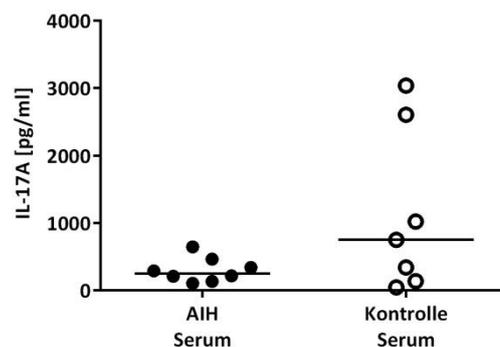


Abb. 8: IL-17A-Zytokinprofil der Serumproben von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. In den Serumproben wurde die Konzentration von IL-17A mittels Zytokin-ELISA bestimmt.

In der Kontrollgruppe wurde eine mediane IL-17A-Konzentration von 750 pg/ml detektiert. Die mediane Konzentration von IL-17A war in der AIH-Kohorte mit ≈ 253 pg/ml niedriger als in der Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

In der Summe zeigten die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von T-zellspezifischen Zytokinen im Serum von AIH-Patienten, dass das T_H1-assoziierte Zytokin IFN γ sowohl im Serum von AIH-Patienten als auch im Serum der Kontrollprobanden nicht nachgewiesen werden konnte. Jedoch war die Konzentration des T_H1-assoziierten Zytokins TNF α im Serum von AIH-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Des Weiteren wurde eine geringere Konzentration des T_H17-spezifischen IL-17A im Serum der AIH-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert.

3.2 Charakterisierung der T-Zellen von AIH-Patienten

Autoreaktive T-Zellen spielen in der Immunpathogenese der AIH eine tragende Rolle, da diese eine Zerstörung des hepatischen Parenchyms induzieren können. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen scheinen an der Immunpathogenese beteiligt zu sein¹⁰⁷. Um die T-Zellen von AIH-Patienten näher zu charakterisieren, wurde zunächst die Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut bestimmt (Abschnitt 3.2.1). Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Sekretion und Expression T_H1-, T_H17- und T_H2-assoziiierter Zytokine sowohl durch Zellen des PBMC-Kompartiments als auch durch LIL (Abschnitt 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Erweiternd wurde das Profil der PBMC und der LIL anhand der

Expression von Chemokinen untersucht (Abschnitt 3.2.5). Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Expression von Koloniestimulierenden Faktoren und zytotoxischen Effektorproteinen (Abschnitt 3.2.6).

3.2.1 Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im PBMC-Kompartiment

Da CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an der AIH-Immunpathogenese beteiligt zu sein scheinen, wurde zunächst die Frequenz dieser Zellen in der Peripherie von therapienaiven AIH-Patienten bestimmt. Hierfür wurden PBMC aus Vollblut isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten PBMC gesunder Probanden.

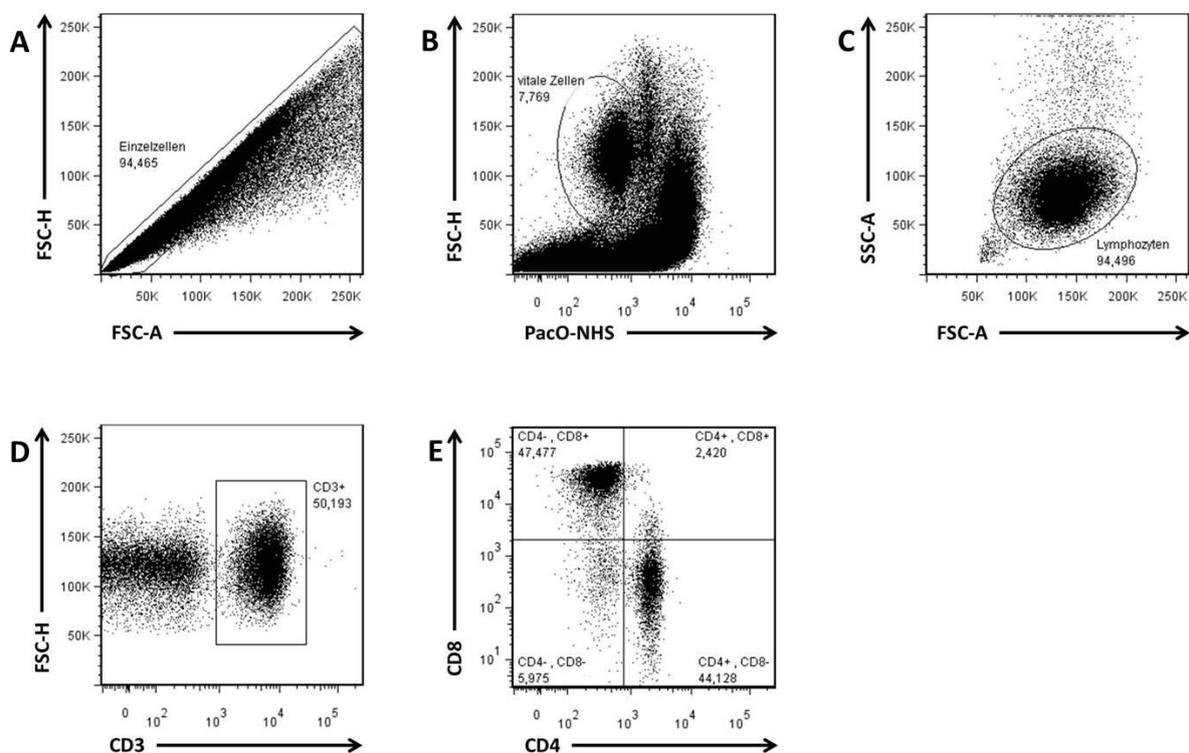


Abb. 9: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz von CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ Zellen in AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die repräsentativen Punkteplots zeigen das Gating auf (A) Einzelzellen durch die FSC-A/FSC-H-Einstellung, (B) vitale Zellen, (C) Lymphozyten durch die FSC-A/SSC-A-Einstellung, (D) CD3⁺ Zellen und (E) CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen.

Die Eingrenzung der Zielzellen erfolgte zunächst durch Dublettendiskriminierung, Lebend/Tot-Diskriminierung und morphologische Charakterisierung der Lymphozyten (Abb. 9A-C). Durch Anfärbung der Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD3⁺ Lymphozytenpopulation bestimmt (Abb. 9D, E).

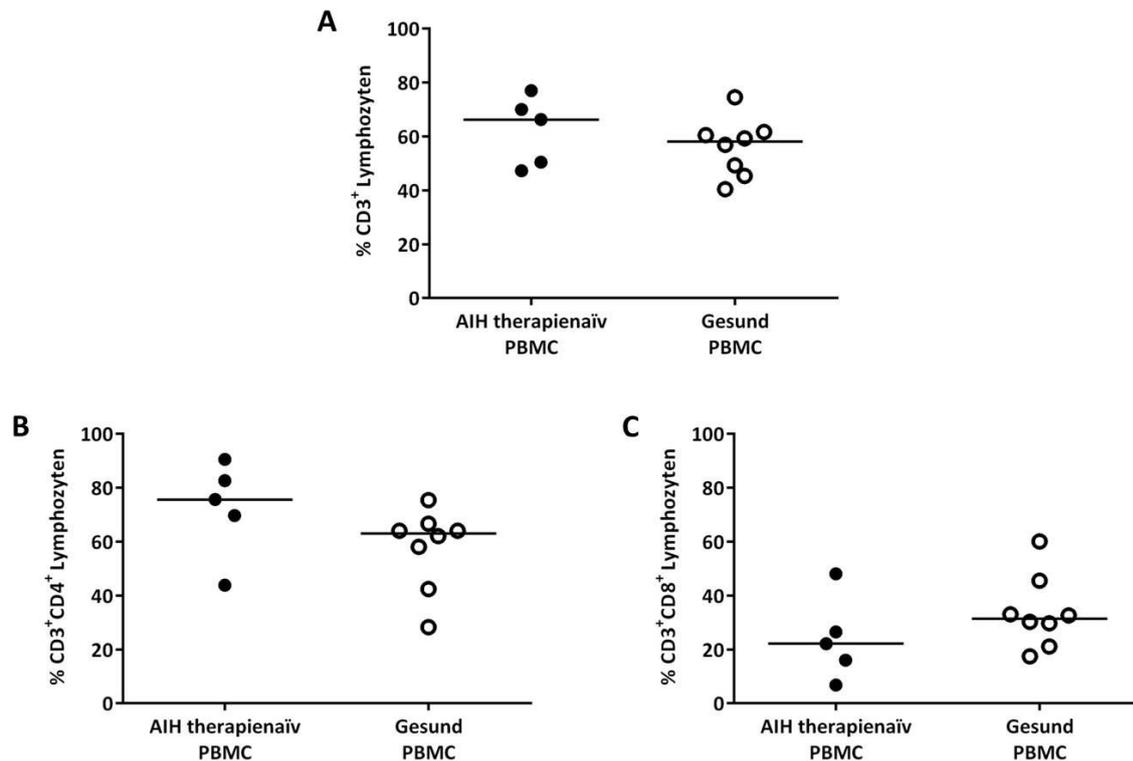


Abb. 10: Frequenz der CD3⁺, der CD3⁺CD4⁺ und der CD3⁺CD8⁺ PBMC von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Aus dem peripheren Vollblut isolierte PBMC wurden über 24 Stunden kultiviert. Der prozentuale Anteil von (A) CD3⁺ Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation und von (B) CD4⁺ Zellen bzw. (C) CD8⁺ Zellen innerhalb der CD3⁺ Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Innerhalb der Lymphozytenpopulation hatten die CD3⁺ T Zellen bei den therapienaiven AIH-Patienten einen medianen Anteil von 66,20 %, bei den gesunden Kontrollprobanden war der mediane Anteil mit 58,00 % geringer (Abb. 10A; $p > 0,05$). Der prozentuale mediane Anteil von 75,60 % der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen bei den therapienaiven AIH-Probanden war tendenziell höher als bei den gesunden Kontrollen (Abb. 10B; $p = 0,0598$). Diese wiesen im Vergleich einen prozentualen medianen Anteil von 63,00 % der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen auf. Dahingegen war der mediane Anteil der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen bei den AIH-Patienten mit 22,10 % im Vergleich zu den gesunden Probanden mit einem medianen Anteil von 31,40 % geringer (Abb. 10C; $p > 0,05$).

3.2.2 Untersuchung T_H1-assoziiertes Zytokine

Aktivierte T_H1-Zellen sind Bestandteil der zellvermittelten Immunabwehr und tragen wesentlich zur Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen bei, sind aber auch mit Autoimmunität assoziiert^{1,26,27}. Zu den charakteristischen Signaturzytokinen der T_H1-Antwort zählen vor allem die proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN γ ¹⁹. Auch TNF α kommt eine Bedeutung im Kontext von T_H1-Immunantworten zu²¹⁻²⁴. Hier wurden zum einen die PBMC von AIH-Patienten charakterisiert (Abschnitt 3.2.2.1), indem auf RNA-Ebene die Genexpression von *IL2*, *IFNG* und *TNF* untersucht wurde. Zusätzlich wurde die Produktion und Sekretion von IFN γ und TNF α mittels der ELISA-Methode

und durchflusszytometrisch ermittelt. Zum anderen wurden die LIL von AIH-Patienten charakterisiert (Abschnitt 3.2.2.2). Hierfür wurde das Expressionsniveau von *IL2*, *IFNG* und *TNF* sowie die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.2.1 Expression und Sekretion T_H1 -assoziierter Zytokine durch mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

Mittels der qPCR-Methode wurde der T_H1 -Status von Zellen des PBMC-Kompartiments therapienaiver AIH-Patienten auf RNA-Ebene untersucht. Dafür wurde die Expression von *IL2*, *IFNG* und *TNF* der PBMC dieser AIH-Patienten mit der von gesunden Kontrollprobanden verglichen und die relative Expression in Abb. 11 dargestellt. Zur internen Normalisierung wurde in allen Untersuchungen das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Zur Auswertung und Vergleichbarkeit der Daten wurde die Änderung der relativen Expression aller Proben und Kontrollen auf das mediane Expressionsniveau der Gesundkontrolle bezogen.

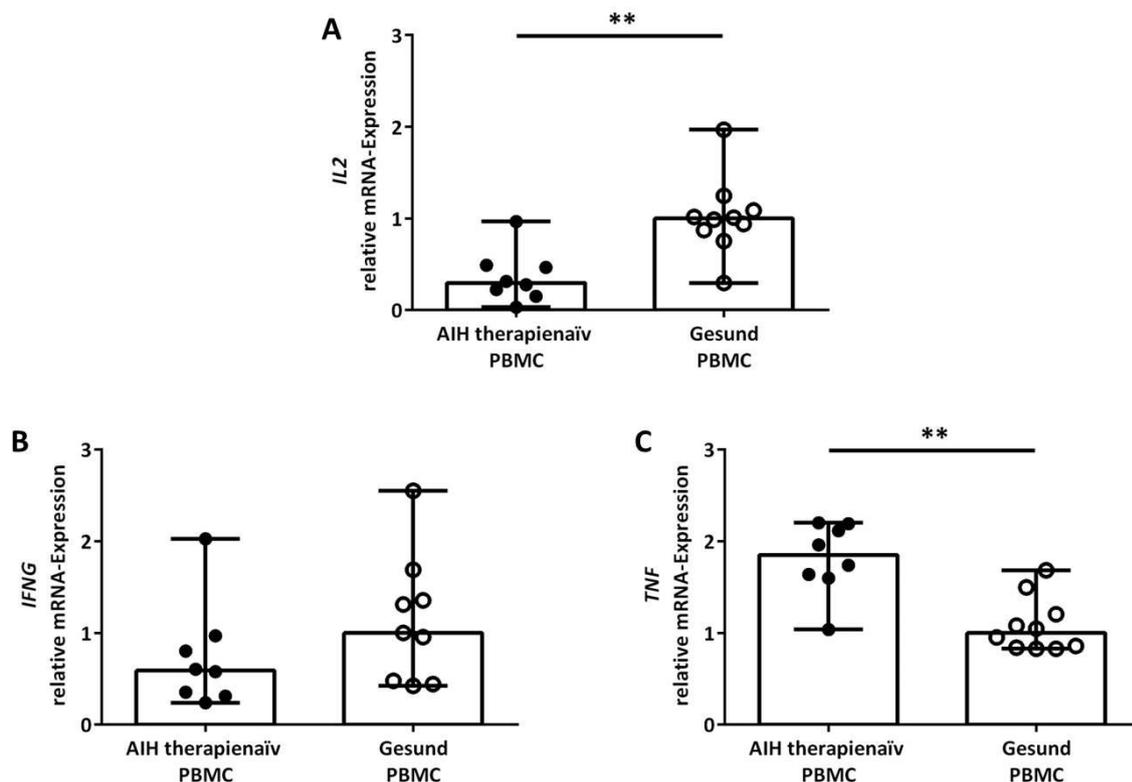


Abb. 11: Genexpressionsanalyse von *IL2*, *IFNG* und *TNF* in PBMC von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *IL2*, (B) *IFNG* und (C) *TNF* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der gesunden Kontrollprobanden. Statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression von AIH-Patienten gegenüber gesunden Probanden sind angegeben. (** $p < 0,01$)

Die Auswertungen der qPCR-Analysen ergaben, dass die *IL2*-Expression in den Proben der AIH-Kohorte im Vergleich zur gesunden Gruppe auf das $\approx 0,30$ -fache signifikant erniedrigt war (Abb. 11A; $p = 0,0021$). *IFNG* war in den PBMC der AIH-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden ebenfalls geringer exprimiert (Abb. 11B; $\approx 0,59$ -fach; $p > 0,05$). Bezüglich der *TNF*-Expression war eine signifikant höhere Expression in den PBMC der therapienaïven AIH-Gruppe ermittelt worden, welche um das $\approx 1,85$ -fache über dem Expressionsniveau der gesunden Kontrollgruppe lag (Abb. 11C; $p = 0,0021$).

Zur Bestimmung der Konzentration von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ im Zellkulturüberstand von PBMC wurden die Zellen *in vitro* T-zellspezifisch mit $\alpha CD3$ und $\alpha CD28$ stimuliert, die Zellkulturüberstände nach drei Tagen abgenommen und mittels der ELISA-Methode auf ihren Zytokingehalt untersucht. In Abb. 12 ist die Zytokinsekretion von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ durch PBMC therapienaïver AIH-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt. In den Zellkulturüberständen der AIH-Kohorte lag die mediane Konzentration an $IFN\gamma$ unter der Detektionsgrenze von 47 pg/ml (Abb. 12A). Die gesunde Kontrollgruppe wies im Vergleich dazu eine signifikant erhöhte mediane $IFN\gamma$ -Konzentration von 2173 pg/ml auf ($p = 0,0022$). Die Bestimmung von $TNF\alpha$ im Zellkulturüberstand ergab in der Gruppe der AIH-Patienten eine mediane Konzentration von ≈ 138 pg/ml (Abb. 12B). Bei den gesunden Probanden lag die mediane $TNF\alpha$ -Konzentration bei 1414 pg/ml und war signifikant höher als in der AIH-Gruppe ($p = 0,0043$).

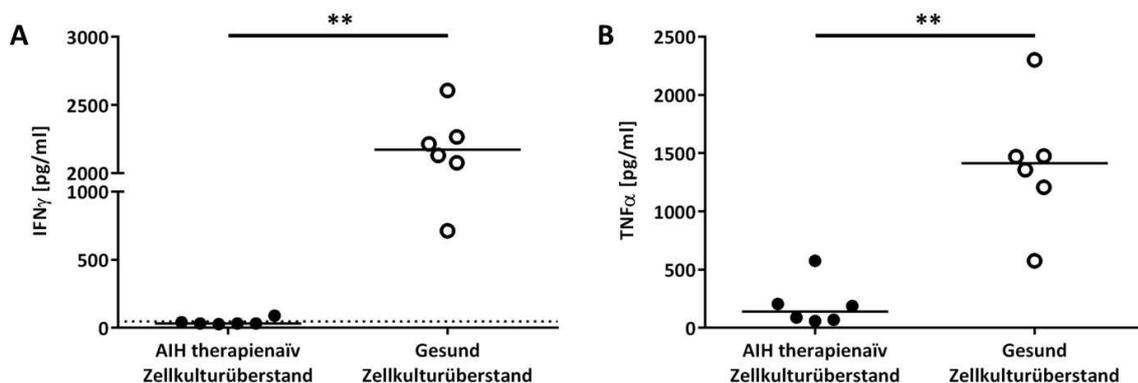


Abb. 12: $IFN\gamma$ - und $TNF\alpha$ -Sekretion der PBMC von therapienaïven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Aus dem peripheren Vollblut isolierte PBMC wurden drei Tage mit $\alpha CD3$ und $\alpha CD28$ stimuliert. Die Konzentration von (A) $IFN\gamma$ und (B) $TNF\alpha$ in den Zellkulturüberständen wurde mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Die gepunktete Linie repräsentiert die Detektionsgrenze des Tests. Statistisch signifikante Unterschiede in der Zytokinsekretion von AIH-Patienten gegenüber gesunden Probanden sind angegeben. (** $p < 0,01$)

Zur Untersuchung der Frequenz von $IFN\gamma^+TNF\alpha^-$, $IFN\gamma^+TNF\alpha^+$ und $IFN\gamma^-TNF\alpha^+$ Zellen innerhalb der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Population des PBMC-Kompartiments wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin unspezifisch stimuliert. Für die Auswertung wurden, wie in Abb. 9 gezeigt, die Zielzellen durch

Dubletten-, Lebend/Tot-Diskriminierung und morphologische Lymphozytencharakterisierung eingegrenzt. Die Festlegung der zu untersuchenden Populationen erfolgte durch Bestimmung der Oberflächenmarker CD3 und CD4 bzw. CD8. Mittels intrazellulärer Anfärbung der Zytokine IFN γ und TNF α konnte der prozentuale Anteil der Zielzellen anhand des Schemas in Abb. 13 ermittelt werden.

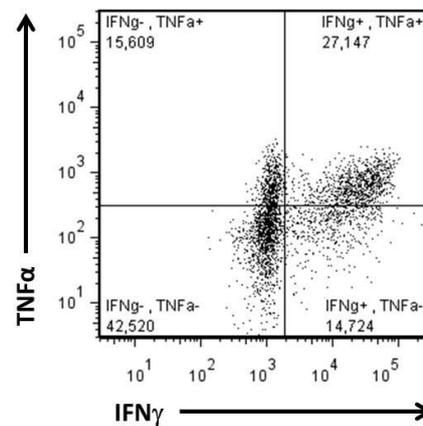


Abb. 13: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz von IFN γ ⁺, TNF α ⁺ und IFN γ ⁺TNF α ⁺ Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ Zellpopulation in AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Der repräsentative Punkteplot zeigt das Gating auf IFN γ ⁺, TNF α ⁺ und IFN γ ⁺TNF α ⁺ Zellen.

Bei der durchflusszytometrischen Frequenzanalyse zeigte sich ein medianer prozentualer Anteil der IFN γ ⁺TNF α ⁻ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation von 4,40 % bei den gesunden Kontrollprobanden (Abb. 14A). Im Vergleich dazu war der mediane prozentuale Anteil dieser Zellen mit 1,20 % bei den therapienaïven AIH-Patienten geringer ($p > 0,05$). Der mediane prozentuale Anteil der IFN γ ⁺TNF α ⁻ Zellen der CD8⁺ T-Zellpopulation lag bei den gesunden Kontrollen bei 17,80 %, in der AIH-Kohorte bei 15,05 % (Abb. 14B; $p > 0,05$). Insgesamt war die mediane Frequenz der IFN γ ⁺TNF α ⁻ CD8⁺ T-Zellen bei den gesunden Kontrollen und den AIH-Probanden höher als die der IFN γ ⁺TNF α ⁻ CD4⁺ T-Zellen beider Gruppen. Die Frequenzanalyse der IFN γ ⁻TNF α ⁺ Zellen ergab innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation einen medianen prozentualen Anteil bei den gesunden Probanden von 9,30 % und bei den AIH-Patienten von 9,15 % (Abb. 14C; $p > 0,05$). Die Frequenz der IFN γ ⁻TNF α ⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation lag bei den gesunden Kontrollen bei 1,95 % (Abb. 14D). Im Vergleich dazu war der mediane prozentuale Anteil dieser Zellen bei den AIH-Patienten mit 8,10 % signifikant erhöht ($p = 0,0127$). Die Analyse der Frequenz der IFN γ ⁺TNF α ⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation zeigte einen medianen prozentualen Anteil bei den gesunden Kontrollen von 4,35 % und in der AIH-Gruppe von 2,95 % (Abb. 14E; $p > 0,05$). Innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation lag die Frequenz der IFN γ ⁺TNF α ⁺ Zellen bei den gesunden Probanden bei 11,90 % und bei den AIH-Probanden bei 7,45 % (Abb. 14F; $p > 0,05$). Generell war der mediane

prozentuale Anteil der $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$ Zellen in der CD8^+ T-Zellpopulation beider Gruppen höher als der Anteil der $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$ Zellen innerhalb der CD4^+ T-Zellpopulation.

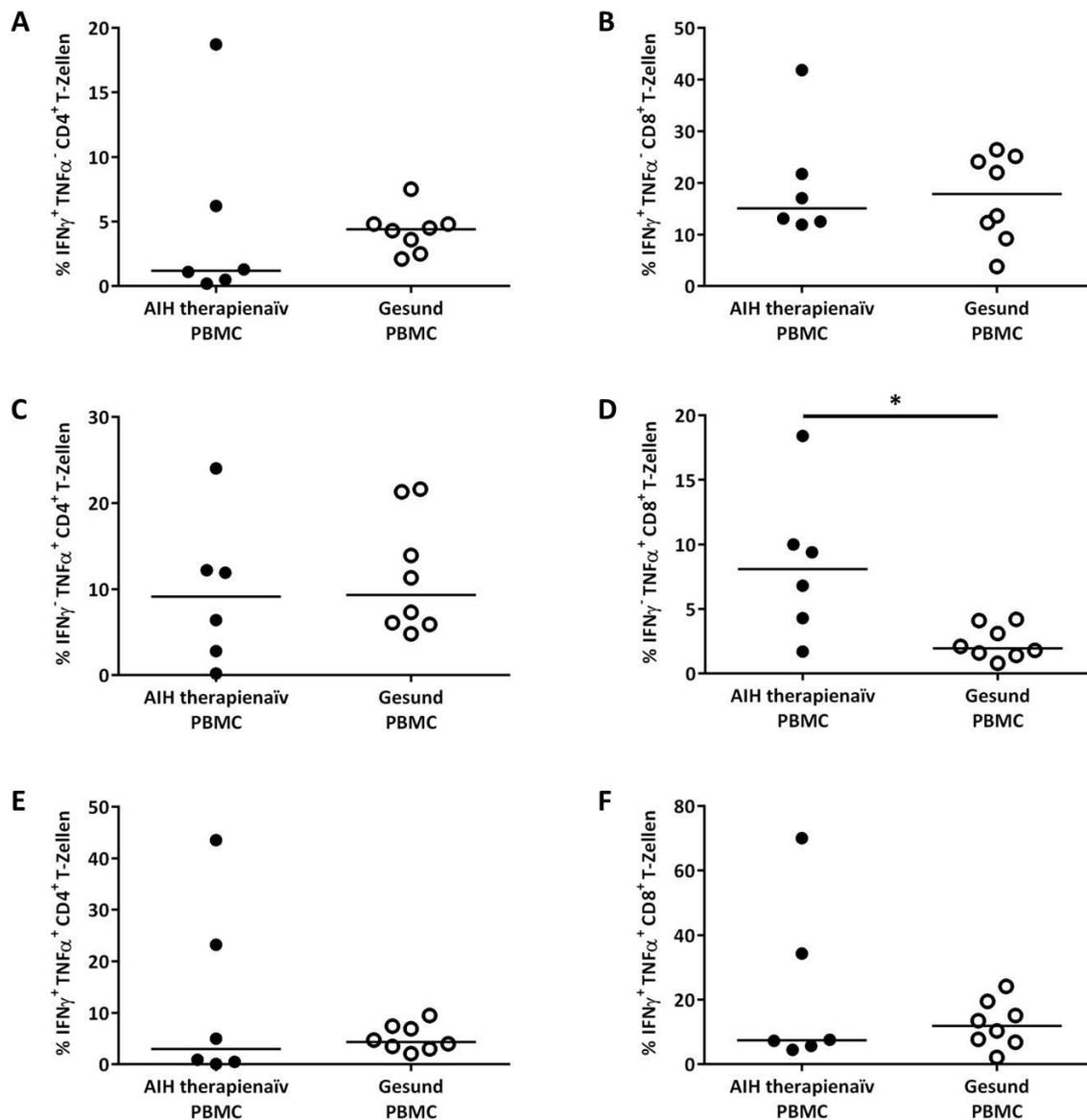


Abb. 14: Frequenz der $\text{IFN}\gamma$ - und $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden und $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -koproduzierenden CD4^+ und CD8^+ T-Zellen im PBMC-Kompartiment von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Aus dem peripheren Vollblut isolierte PBMC wurden 4 Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Frequenz von (A) $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden CD4^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^-$), (B) $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden CD8^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^-$), (C) $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden CD4^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^-\text{TNF}\alpha^+$), (D) $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden CD8^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^-\text{TNF}\alpha^+$), (E) $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -koproduzierenden CD4^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$) und (F) $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -koproduzierenden CD8^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$) wurde durchflusszytometrisch untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede in der Zellfrequenz bei AIH-Patienten gegenüber gesunden Probanden sind angegeben. (* $p \leq 0,05$)

Zusammengefasst wiesen die Zellen des gesamten PBMC-Kompartiments in AIH-Patienten eine verminderte Expression der $\text{T}_\text{H}1$ -spezifischen Zytokine *IL2* und *IFNG* auf, wohingegen *TNF* stärker

exprimiert wurde, verglichen mit den gesunden Kontrollen. Zusätzlich zeigte sich in den Zellkulturüberständen nach T-zellspezifischer Stimulation der gesamten PBMC von AIH-Patienten ebenfalls eine geringere $IFN\gamma$ -Sekretion, allerdings war auch die Sekretion von $TNF\alpha$ im Vergleich zur gesunden Kontrolle vermindert. Die Auswertung der $CD4^+$ Zellpopulationen innerhalb des PBMC-Kompartiments von AIH-Patienten ergab bei den $IFN\gamma^+ CD4^+$ T-Zellen als auch bei den $IFN\gamma^+ TNF\alpha^+ CD4^+$ T-Zellen eine geringere Frequenz im Vergleich zu den $TNF\alpha^+ CD4^+$ T-Zellen der AIH-Kohorte. Innerhalb der $CD8^+$ Zellpopulation konnte eine höhere Frequenz von $IFN\gamma^+ CD8^+$ T-Zellen und $IFN\gamma^+ TNF\alpha^+ CD8^+$ T-Zellen identifiziert werden, verglichen mit den $CD4^+$ T-Zellen der AIH-Patienten. Jedoch war die Frequenz dieser $IFN\gamma^+ CD8^+$ T-Zellen und $IFN\gamma^+ TNF\alpha^+ CD8^+$ T-Zellen vergleichbar mit der in den Kontrollprobanden. Einzig die Frequenz der $TNF\alpha^+ CD8^+$ T-Zellen war in der AIH-Kohorte höher als in der Kontrollgruppe, aber vergleichbar mit der Frequenz der $TNF\alpha^+ CD4^+$ T-Zellen in den AIH-Patienten.

3.2.2.2 Expression T_H1 -assoziierter Zytokine durch leberinfiltrierende Lymphozyten

Um zu ermitteln, ob LIL von AIH-Patienten T_H1 -Charakteristika aufweisen, wurde mittels der qPCR-Methode auf RNA-Ebene das Expressionsniveau von *IL2*, *IFNG* und *TNF* ermittelt. Als Kontrollgruppe dienten Patienten, die keine autoimmune Lebererkrankung aufwiesen. Dabei handelte es sich um jeweils zwei Patienten mit Adenom- bzw. NASH-Erkrankung. Die relative Expression von *IL2*, *IFNG* und *TNF* der LIL aus AIH-Patienten und Kontrollen wurde auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollgruppe normiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt. Bei allen Untersuchungen wurde das Haushaltsgen GAPDH zur internen Normalisierung genutzt.

Bei der Auswertung der Genexpression zeigte die AIH-Kohorte eine signifikant höhere mediane Expression von *IL2*, welche um das 16,36-fache über der medianen *IL2*-Expression der Kontrollgruppe lag (Abb. 15A; $p = 0,0336$). Die qPCR-Analysen zeigten weiterhin, dass die Expression von *IFNG* in LIL der AIH-Gruppe um das $\approx 9,06$ -fache signifikant höher exprimiert war im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 15B; $p = 0,0040$). Die *TNF*-Expression lag in der AIH-Gruppe um das $\approx 3,17$ -fache signifikant über dem medianen Expressionsniveau der Kontrollgruppe (Abb. 15C; $p = 0,0360$).

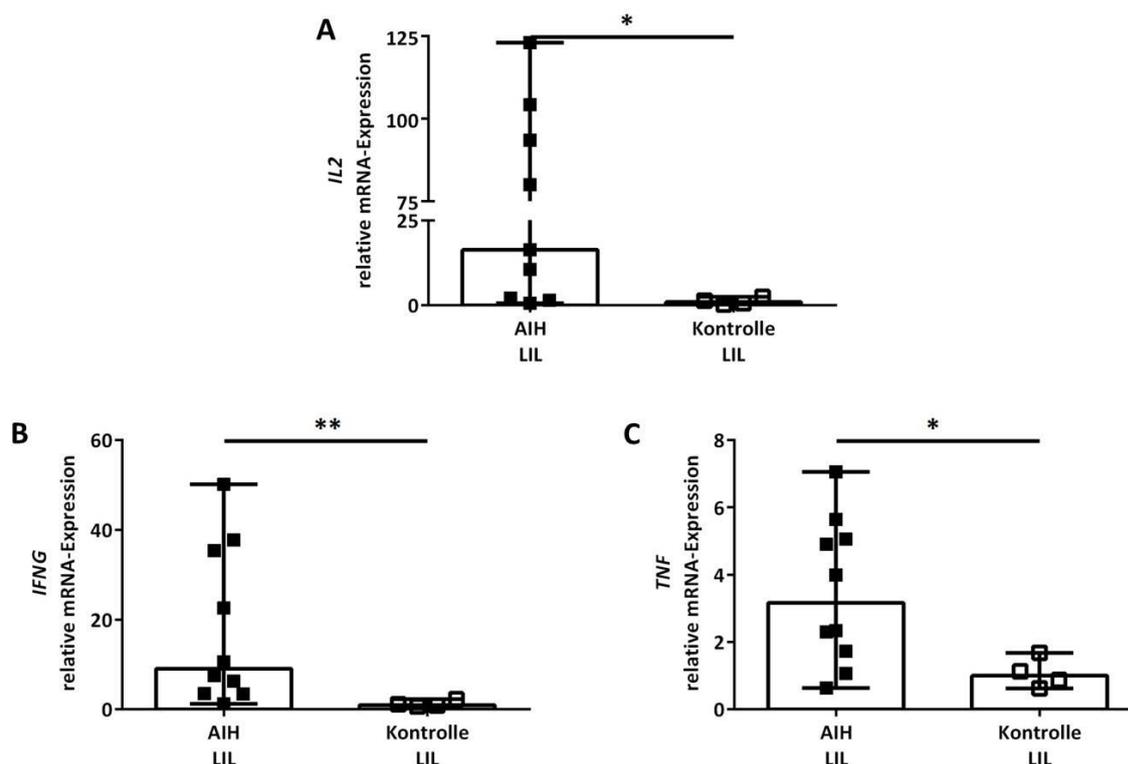


Abb. 15: Genexpressionsanalyse von *IL2*, *IFNG* und *TNF* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *IL2*, (B) *IFNG* und (C) *TNF* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden. Statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression von AIH-Patienten gegenüber Kontrollprobanden sind angegeben. (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$)

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils von $IFN\gamma^+TNF\alpha^-$, $IFN\gamma^-TNF\alpha^+$ und $IFN\gamma^+TNF\alpha^+$ Zellen innerhalb der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Population der LIL wurden diese mit PMA und Ionomycin unspezifisch stimuliert. Zur Ermittlung der $IFN\gamma^+TNF\alpha^-$, $IFN\gamma^-TNF\alpha^+$ und $IFN\gamma^+TNF\alpha^+$ Zellfrequenz wurden die Zielzellen, wie in Abb. 9 dargestellt, mittels Dubletten- und Lebend/Tot-Diskriminierung sowie morphologischer Lymphozytencharakterisierung eingegrenzt und mithilfe der Oberflächenmarker CD3 und CD4 bzw. CD8 näher charakterisiert. Durch intrazelluläre Anfärbung der Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ wurde die Frequenz der Zielzellen mithilfe des in Abb. 13 gezeigten Schemas bestimmt.

Die Frequenzanalyse der $IFN\gamma^+TNF\alpha^-$ Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellpopulation ergab für die Zellen in der Peripherie von AIH-Patienten einen prozentualen Anteil von 1,20 % (Abb. 16A). Im Vergleich dazu war der Anteil der $IFN\gamma^+TNF\alpha^-$ $CD4^+$ T-Zellen in der Leber mit 5,70 % erhöht ($p > 0,05$). Die mediane Frequenz der $IFN\gamma^+TNF\alpha^-$ $CD8^+$ T-Zellen lag innerhalb des PBMC-Kompartiments bei 15,05 %, in der Leber war der prozentuale Anteil mit 22,50 % höher (Abb. 16B; $p > 0,05$). Der mediane Anteil der $IFN\gamma^-TNF\alpha^+$ $CD4^+$ T-Zellen lag im Kompartiment der PBMC bei 9,15 % und war im Vergleich dazu mit 20,50 % im LIL-Kompartiment tendenziell erhöht (Abb. 16C; $p = 0,0952$). Bei den $IFN\gamma^-TNF\alpha^+$ Zellen innerhalb der $CD8^+$ T-Zellpopulation war die Frequenz mit 8,10 % in der Peripherie und mit 8,80 % in

der Leber vergleichbar (Abb. 16D; $p > 0,05$). Der mediane prozentuale Anteil der $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+\text{CD4}^+$ T-Zellen im PBMC-Kompartiment lag bei 2,95 % (Abb. 16E). Dagegen war die mediane Frequenz der $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$ leberinfiltrierenden CD4^+ T-Zellen mit 13,20 % erhöht ($p > 0,05$). Bei den CD8^+ T-Zellen war der mediane Anteil der $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$ Zellen bei den LIL mit 24,00 % höher im Vergleich zu den 7,45 % bei den PBMC (Abb. 16F; $p > 0,05$).

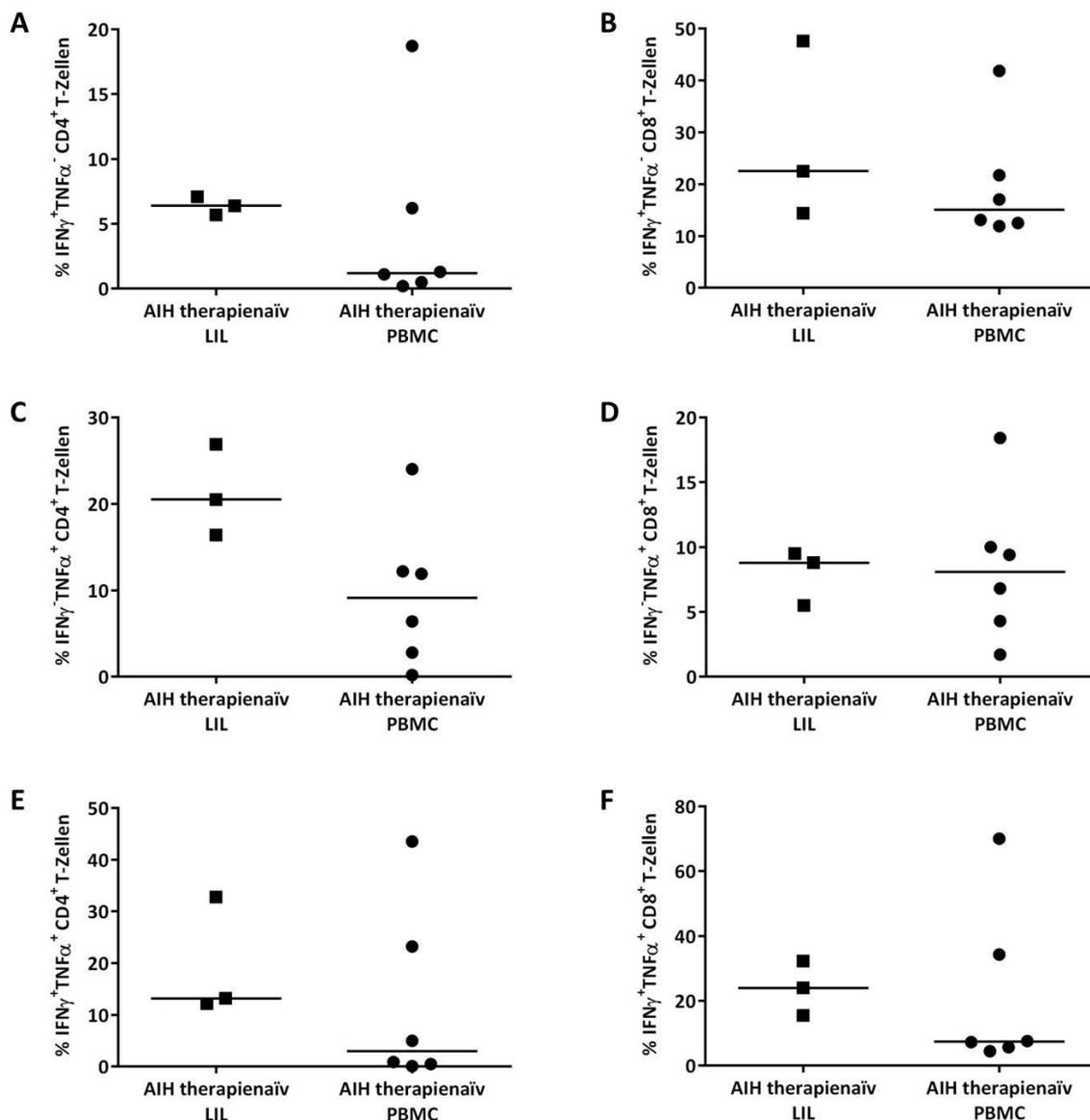


Abb. 16: Frequenz der $\text{IFN}\gamma^-$ und $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden und $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -koproduzierenden CD4^+ und CD8^+ T-Zellen im LIL- und PBMC-Kompartiment von therapienaiven AIH-Patienten. Aus Leberbiopsien isolierte LIL und aus dem peripheren Vollblut isolierte PBMC wurden 4 Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Frequenz von (A) $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden CD4^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^-$), (B) $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden CD8^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^-$), (C) $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden CD4^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^-\text{TNF}\alpha^+$), (D) $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden CD8^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^-\text{TNF}\alpha^+$), (E) $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -koproduzierenden CD4^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$) und (F) $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -koproduzierenden CD8^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$) wurde durchflusszytometrisch untersucht.

In der Summe zeigten die Ergebnisse der gesamten LIL von AIH-Patienten im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Expression der T_H1 -assoziierten Gene *IL2*, *IFNG* und *TNF*. Weiterführend wurde gezeigt, dass in AIH-Patienten die Frequenz der $IFN\gamma^+$, $TNF\alpha^+$ und $IFN\gamma^+TNF\alpha^+ CD4^+$ T-Zellen in der Leber höher war als in der Peripherie. Dabei war die Frequenz der $TNF\alpha^+ CD4^+$ T-Zellen am höchsten, gefolgt von $IFN\gamma^+TNF\alpha^+$ sezernierenden $CD4^+$ T-Zellen. Auch bei den intrahepatischen $CD8^+$ T-Zellen konnte eine höhere Frequenz von $IFN\gamma^+$ und $IFN\gamma^+TNF\alpha^+$ Zellen detektiert werden, verglichen mit der Peripherie. Die Frequenz der $TNF\alpha^+ CD8^+$ T-Zellen war bei den LIL und PBMC der AIH-Patienten vergleichbar, aber verglichen mit der Frequenz der intrahepatischen $TNF\alpha^+ CD4^+$ T-Zellen geringer.

3.2.3 Untersuchung T_H17 -assoziierter Zytokine

T_H17 -Zellen haben eine eminente Bedeutung bei der Beseitigung extrazellulärer Bakterien und Pilze¹, scheinen aber auch in chronisch-entzündlichen, organspezifische Autoimmunerkrankungen involviert zu sein³⁰. Charakteristische T_H17 -spezifische Signaturproteine sind unter anderem die Zytokine IL-17A und IL-22, wohingegen die Zytokine TGF β und IL-6 die T_H17 -Zelldifferenzierung fördern^{28,32,35,36,41}. Es erfolgte eine Charakterisierung der PBMC von AIH-Patienten (Abschnitt 3.2.3.1) durch Genexpressionsanalysen von *IL17A* und *IL22*, aber auch *TGFB1* und *IL6*. Zusätzlich wurde die IL-17A-Produktion mittels der ELISA-Methode und im Durchflusszytometer bestimmt. Des Weiteren wurden die LIL von AIH-Patienten in Bezug auf die Genexpression von *IL17A*, *IL22*, *TGFB1* und *IL6* analysiert sowie die IL-17A-Produktion durch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abschnitt 3.2.3.2).

3.2.3.1 Expression und Sekretion T_H17 -assoziierter Zytokine durch mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

Zur Untersuchung des T_H17 -Status der PBMC von therapienaiven AIH-Patienten wurde mittels der qPCR-Methode auf RNA-Ebene das relative Genexpressionsniveau der T_H17 -Signaturzytokine IL-17A und IL-22 ermittelt. Das Haushaltsgen GAPDH wurde zur internen Normalisierung verwendet. Die Expression der Gene *IL17A* und *IL22* in den Zellen des PBMC-Kompartiments der AIH-Patienten wurde mit der von gesunden Probanden verglichen. Für die Auswertung wurde die relative Expression aller Proben und Kontrollen auf das mediane Expressionsniveau der gesunden Kontrollen normiert und in Abb. 17 graphisch aufgetragen.

Die Auswertung der Genexpression von *IL17A* zeigte in der Kohorte der AIH-Patienten eine tendenziell niedrigere Expression auf das $\approx 0,06$ -fache im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 17A; $p = 0,0542$). Bei sieben der acht AIH-Patienten lag die *IL17A*-Expression unterhalb der Detektionsgrenze des Tests, bei den gesunden Probanden konnte bei zwei Personen keine Expression von *IL17A* detektiert werden. In Bezug auf die Expression von *IL22* zeigte die AIH-Gruppe eine

Zellkulturüberständen lag sowohl in der AIH-Kohorte als auch in der gesunden Kontrollgruppe bei $\approx 57 \text{ pg/ml}$ ($p > 0,05$).

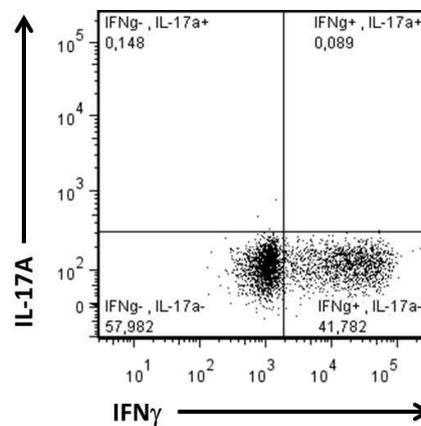


Abb. 19: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz von IL-17A⁺IFNγ⁻ Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ Zellpopulation in AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Der repräsentative Punkteplot zeigt das Gating auf IFNγ⁺, IL-17A⁺ und IFNγ⁺IL-17A⁺ Zellen.

Für die durchflusszytometrische Frequenzanalyse der IFNγ⁺IL-17A⁺ Zellen in der CD4⁺- und CD8⁺-Population des PBMC-Kompartiments wurden die PBMC mit PMA und Ionomycin unspezifisch stimuliert. Um die Zielzellen einzugrenzen, wurden die Lymphozyten gemäß dem Schema in Abb. 9 nach Dubletten- und Lebend/Tot-Diskriminierung morphologisch charakterisiert und die zu untersuchenden T-Zellpopulationen anhand der Oberflächenmarker CD3 und CD4 bzw. CD8 festgelegt. Durch intrazellulärer Färbung der Zytokine IFNγ und IL-17A wurde die Frequenz der Zielzellen anhand des in Abb. 19 dargestellten Schemas ermittelt.

CD4⁺T-Zellen, die gleichzeitig IFNγ und IL-17A produzieren, werden als T_H1/T_H17-Zellen bezeichnet^{26,203,204}. Es konnten in den untersuchten Proben der AIH-Kohorte und der gesunden Kontrollprobanden keine T-Zellen detektiert werden, die sowohl IFNγ⁺ als auch IL-17A⁺ waren, weshalb keine graphische Auswertung dieser Zellpopulation vorgenommen wurde.

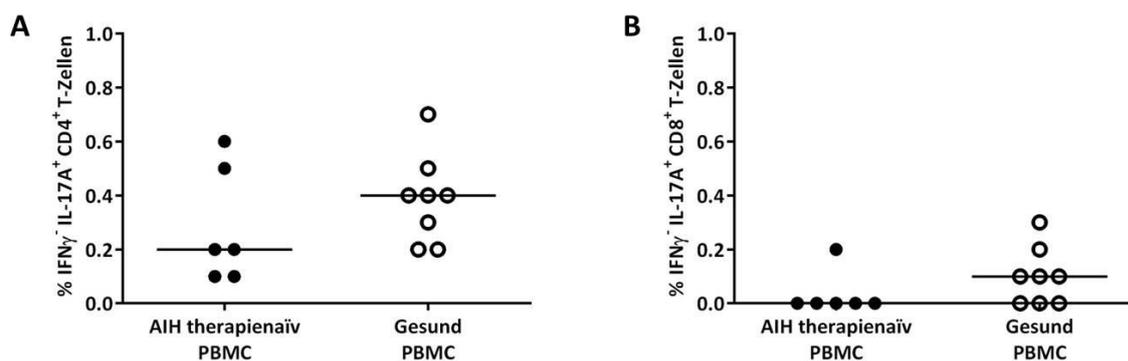


Abb. 20: Frequenz der IL-17A-produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im PBMC-Kompartiment von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Aus dem peripheren Vollblut isolierte PBMC wurden 4 Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Frequenz von (A) IL-17A-produzierenden CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁻IL-17A⁺) und (B) IL-17A-produzierenden CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺CD8⁺IFN γ ⁻IL-17A⁺) wurde durchflusszytometrisch untersucht.

Die Analyse der Frequenz von IFN γ ⁻IL-17A⁺ CD4⁺ T-Zellen im PBMC-Kompartiment der gesunden Probanden lag bei einem medianen prozentualen Anteil von 0,40 %, während die der AIH-Patienten mit 0,20 % niedriger war (Abb. 20A; $p > 0,05$). In der CD8⁺ Population lag die mediane IFN γ ⁻IL-17A⁺-Zellfrequenz der gesunden Kontrollen bei 0,10 % und in den AIH-Probanden konnten im Median keine IFN γ ⁻IL-17A⁺ CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie nachgewiesen werden (Abb. 20B; $p > 0,05$).

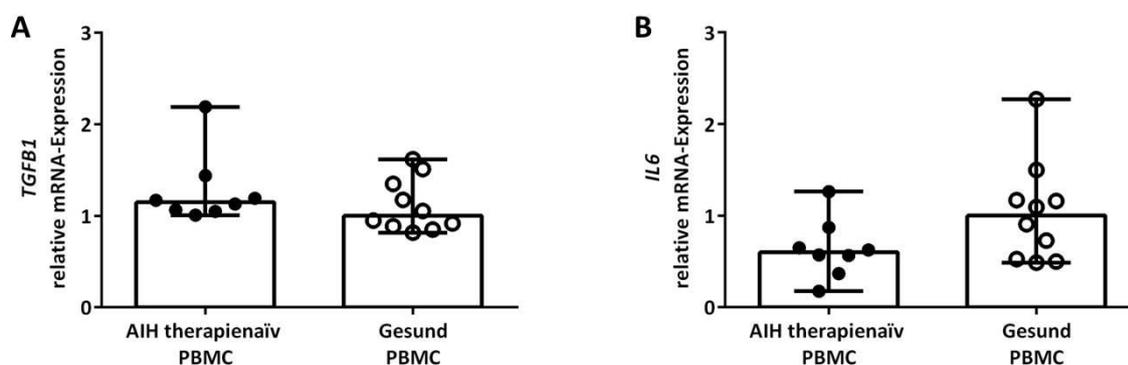


Abb. 21: Genexpressionsanalyse von *TGFBI* und *IL6* in PBMC von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *TGFBI* und (B) *IL6* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der gesunden Kontrollprobanden.

Um zu überprüfen, ob Zellen innerhalb der PBMC-Population Zytokine produzieren, die die Differenzierung zu T_H17-Zellen fördern, wurde die Expression der Zytokine TGF β und IL-6 auf RNA-Ebene mittels qPCR untersucht und auf das mediane Expressionsniveau der Gesundkontrolle normiert. *TGFBI* zeigte sich bei den AIH-Patienten um das 1,15-fache höher exprimiert als in

Gesundkontrollen (Abb. 21A; $p > 0,05$). Die *IL6*-Expression war auf das 0,60-fache erniedrigt im Vergleich zu den gesunden Probanden (Abb. 21B; $p > 0,05$).

Zusammengefasst zeigten die Untersuchungen der gesamten PBMC von AIH-Patienten in Bezug auf T_H17 -spezifische Zytokine eine geringe bis keine Expression der Gene *IL17A* und *IL22* verglichen mit den gesunden Kontrollen. Im Zellkulturüberstand der PBMC konnte nach T-zellspezifischer Stimulation eine vergleichbare, aber geringe Sekretion von IL-17A in AIH-Patienten und Kontrollen detektiert werden. Die Untersuchung der $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellpopulationen innerhalb des PBMC-Kompartiments zeigte eine verminderte Frequenz von $IFN\gamma^+IL-17A^+$ T-Zellen, wobei diese in AIH-Patienten und Kontrollprobanden *per se* gering war. $IFN\gamma^+IL-17A^+$ T-Zellen konnten nicht detektiert werden. Die Genexpressionsstudien von T_H17 -differenzierungsfördernden Faktoren zeigten in den AIH-Patienten keine erhöhte Expression von *TGFB1* und *IL6*.

3.2.3.2 Expression T_H17 -assoziierter Zytokine durch leberinfiltrierende Lymphozyten

Mithilfe der qPCR-Methode wurde auf RNA-Ebene der T_H17 -Status der LIL von AIH-Patienten anhand der relativen Genexpression der T_H17 -assozierten Gene *IL17A* und *IL22* evaluiert. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen *GAPDH* verwendet. Als Kontrolle dienten jeweils zwei Patienten mit Adenom- bzw. NASH-Erkrankung. Die relative Expression der Proben und Kontrollen wurde auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollgruppe normiert, die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

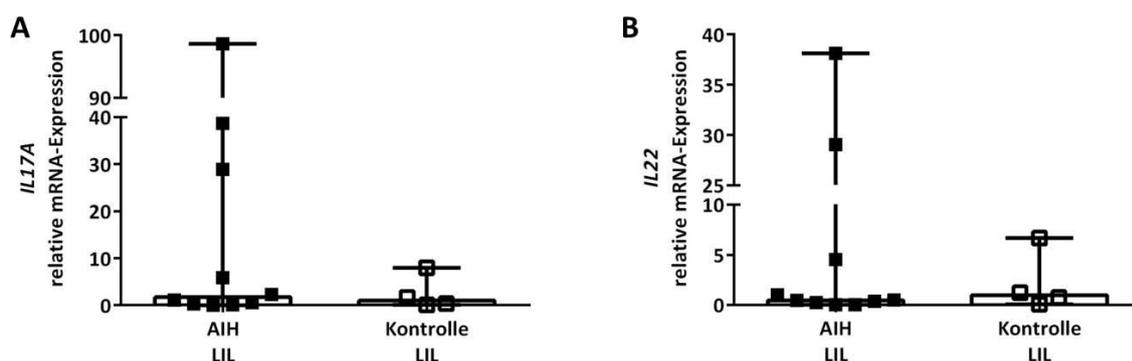


Abb. 22: Genexpressionsanalyse von *IL17A* und *IL22* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *IL17A* und (B) *IL22* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen *GAPDH* verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass *IL17A* bei den Patienten mit AIH $\approx 1,72$ -fach höher exprimiert wurde im Vergleich zu den Patienten ohne autoimmune Lebererkrankung (Abb. 22A; $p > 0,05$).

Bezüglich der medianen *IL22*-Expression zeigte die AIH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine $\approx 0,49$ -fache und damit niedrigere Expression (Abb. 22B; $p > 0,05$). Beim Vergleich der einzelnen Patientendaten fielen drei AIH-Patienten auf, die eine vielfach erhöhte Expression sowohl von *IL17A* ($\approx 98,61$ -fach, $\approx 38,69$ -fach und $\approx 28,90$ -fach) als auch *IL22* ($\approx 38,13$ -fach, $\approx 29,04$ -fach und $\approx 4,55$ -fach) im Vergleich zur Kontrolle und innerhalb der AIH-Kohorte aufwiesen.

Zur Untersuchung der Frequenz von $\text{IFN}\gamma/\text{IL-17A}^+ \text{CD4}^+$ bzw. CD8^+ LIL wurden diese mit PMA und Ionomycin unspezifisch stimuliert und gemäß dem Schema in Abb. 9 nach Dubletten- und Lebend/Tot-Diskriminierung morphologisch als Lymphozyten charakterisiert sowie mittels der Oberflächenmarker CD3 und CD4 bzw. CD8 die zu untersuchenden Populationen festgelegt. Nach intrazellulärer Färbung der Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und *IL-17A* konnte anhand des in Abb. 19 gezeigten Schemas der prozentuale Anteil der Zielzellen ermittelt werden.

$\text{IFN}\gamma/\text{IL-17A}$ -koproduzierende CD4^+ T-Zellen, also $\text{T}_{\text{H}1}/\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen^{26,203,204}, konnten in den untersuchten Proben der AIH-Kohorte und Kontrollprobanden nicht detektiert werden, weshalb keine graphische Auswertung dieser Zellpopulation vorgenommen wurde.

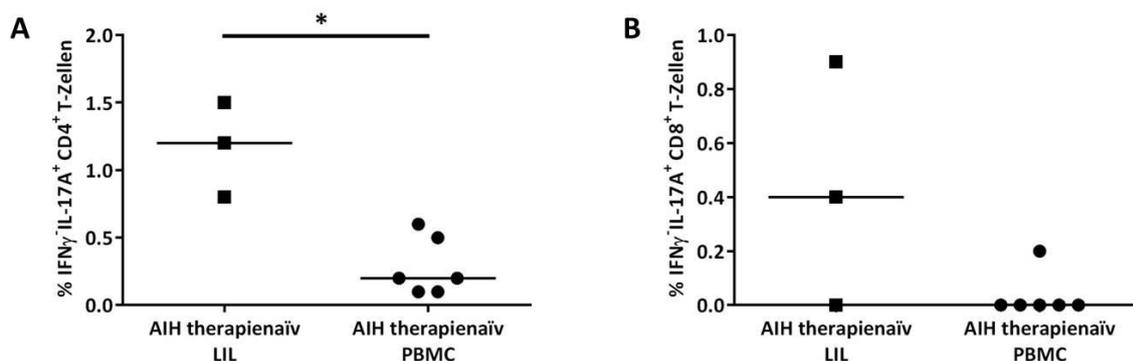


Abb. 23: Frequenz der IL-17A-produzierenden CD4^+ und CD8^+ T-Zellen im LIL- und PBMC-Kompartiment von therapienaiven AIH-Patienten. Aus Leberbiopsien isolierte LIL und aus dem peripheren Vollblut isolierte PBMC wurden 4 Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Frequenz von (A) IL-17A-produzierenden CD4^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{IFN}\gamma/\text{IL-17A}^+$) und (B) IL-17A-produzierenden CD8^+ T-Zellen ($\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{IFN}\gamma/\text{IL-17A}^+$) wurde durchflusszytometrisch untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede in der Zellfrequenz von LIL gegenüber PBMC bei AIH-Patienten sind angegeben. (* $p \leq 0,05$)

Die mediane Frequenz der $\text{IFN}\gamma/\text{IL-17A}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen von therapienaiven AIH-Patienten lag bei 0,20 % im PBMC-Kompartiment, innerhalb des Kompartiments der LIL war die mediane Frequenz mit 1,20 % signifikant erhöht (Abb. 23A; $p = 0,0119$). Innerhalb der CD8^+ Population lag die mediane Frequenz der $\text{IFN}\gamma/\text{IL-17A}^+$ Zellen in der Leber von AIH-Patienten bei 0,40 % und somit tendenziell höher als in der Peripherie, wo im Median keine $\text{IFN}\gamma/\text{IL-17A}^+ \text{CD8}^+$ T-Zellen detektiert werden konnten (Abb. 23B; $p = 0,0833$).

Die Untersuchung der Expression von TGF β und IL-6, also den Faktoren, die die T_H17-Differenzierung unterstützen, wurde auf RNA-Ebene mittels qPCR analysiert. Zur Auswertung wurde die relative Änderung der Genexpression von *TGFB1* bzw. *IL6* auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollgruppe bezogen. Die mediane *TGFB1*-Expression in der AIH-Kohorte und der Kontrollgruppe war mit $\approx 0,97$ vergleichbar hoch (Abb. 24A; $p > 0,05$). Dagegen war die mediane Expression von *IL6* bei den AIH-Patienten um das $\approx 3,23$ -fache höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 24B; $p > 0,05$).

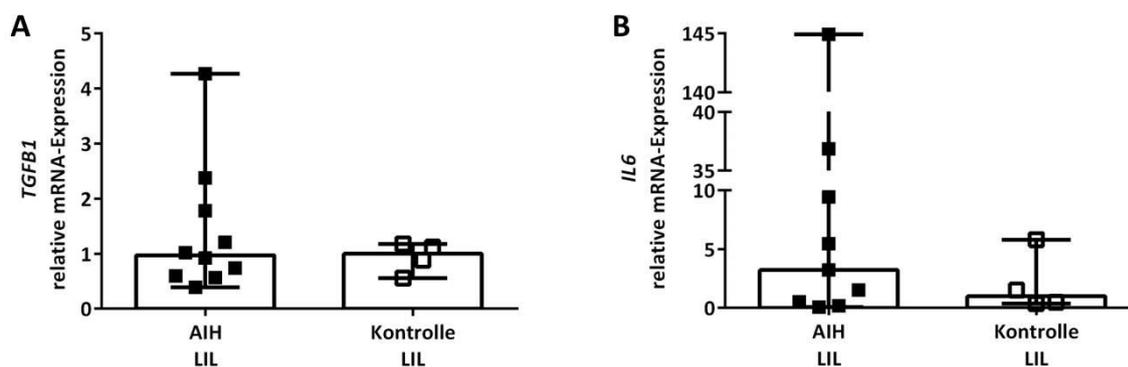


Abb. 24: Genexpressionsanalyse von *TGFB1* und *IL6* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *TGFB1* und (B) *IL6* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden.

Zusammengefasst zeigten die Genexpressionsanalysen der T_H17-assoziierten Gene in den LIL der AIH-Patienten im Vergleich zur Kontrolle eine marginal erhöhte Expression von *IL17A*, aber eine verminderte Expression von *IL22*. Die Untersuchung der IL-17A-produzierenden Zellen innerhalb des LIL-Kompartiments zeigte eine erhöhte Frequenz von IFN γ ⁻IL-17A⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Peripherie von AIH-Patienten, dennoch war der prozentuale Anteil innerhalb der intrahepatischen CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen *per se* gering. Die Analysen der T_H17-differenzierungsfördernden Zytokine TGF β und IL-6 ergaben eine vergleichbare *TGFB1*-Expression in AIH-Patienten und Kontrollen, aber eine erhöhte Expression von *IL6* in den LIL der AIH-Patienten.

3.2.4 Untersuchung T_H2-assoziiierter Zytokine

Eine Funktion von T_H2-Zellen, als Bestandteil der humoralen Immunantwort, ist die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen zu induzieren²⁰⁵. Dementsprechend stehen T_H2-assoziierte Zytokine in Verbindung mit einer starken Antikörperproduktion²². Die Titer verschiedener Autoantikörper korrelieren mit der Schwere der AIH-Erkrankung^{111,137}, was auf eine verstärkte T_H2-Antwort hindeuten könnte. Charakteristische T_H2-Zytokine sind IL-4, IL-10 und IL-13²⁹, deren Genexpression

auf RNA-Ebene sowohl in den extrahepatischen PBMC von AIH-Patienten (Abschnitt 3.2.4.1) als auch in den intrahepatischen LIL (Abschnitt 3.2.4.2) untersucht wurde.

3.2.4.1 Expression T_H2 -assoziierter Zytokine durch mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

Der T_H2 -Status der Zellen des PBMC-Kompartiments von therapienaiven AIH-Patienten wurde auf RNA-Ebene mithilfe der qPCR-Methode ermittelt. Hierfür wurde das Expressionsniveau der T_H2 -assoziierter Zytokine *IL4*, *IL10* und *IL13* bestimmt, wobei das Haushaltsgen GAPDH zur internen Normalisierung verwendet wurde. Für die Auswertung wurde die relative Expression der Proben von AIH-Patienten und gesunden Kontrollen ins Verhältnis mit dem medianen Expressionsniveau der Kontrollgruppe gesetzt. Die relative Änderung der Genexpression ist in Abb. 25 graphisch aufgetragen.

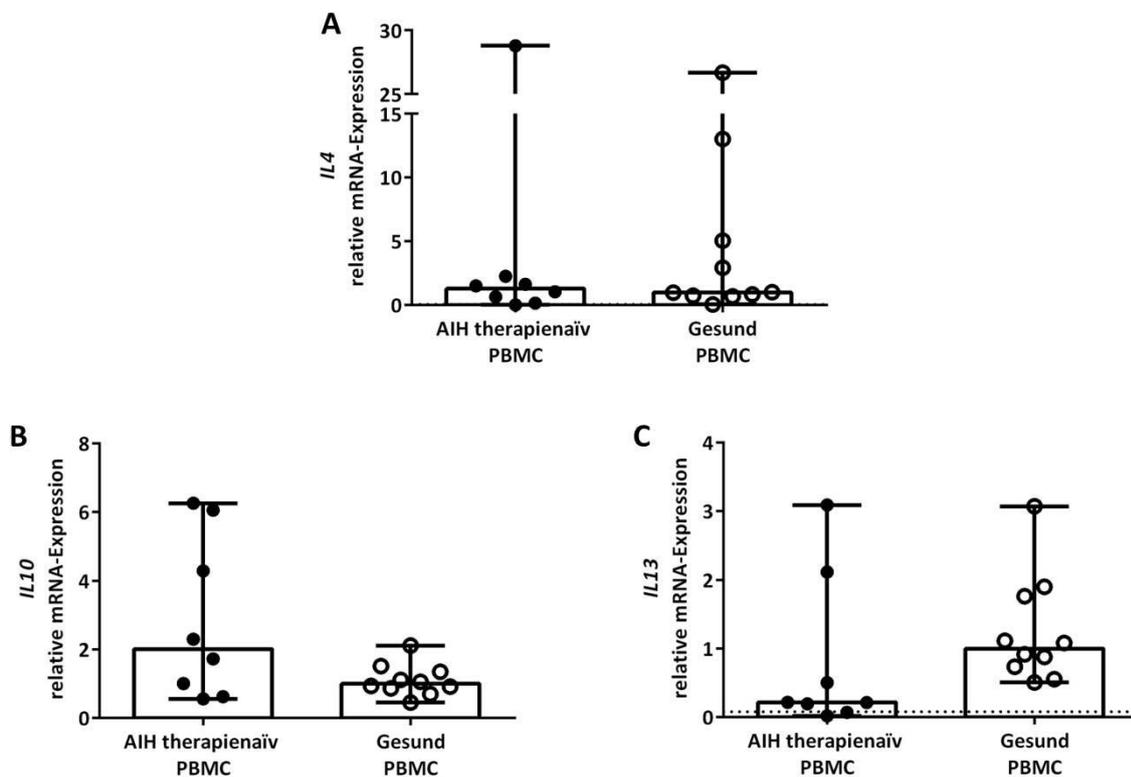


Abb. 25: Genexpressionsanalyse von *IL4*, *IL10* und *IL13* in PBMC von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *IL4*, (B) *IL10* und (C) *IL13* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der gesunden Kontrollprobanden. Die gepunktete Linie repräsentiert die Detektionsgrenze des Tests.

Die *IL4*-Expression zeigte sich in den PBMC der AIH-Patienten auf das $\approx 1,29$ -fach erhöht im Vergleich zu der medianen Expression der gesunden Kontrollen (Abb. 25A; $p > 0,05$). Die Genexpression von *IL10* war, verglichen mit den Kontrollprobanden, bei den AIH-Patienten um das $\approx 2,01$ -fache erhöht

(Abb. 25B; $p > 0,05$). Des Weiteren zeigte sich eine tendenziell erniedrigte Expression von *IL13* bei den AIH-Patienten auf das $\approx 0,22$ -fache im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Abb. 25C; $p = 0,0671$). Bei zwei der acht untersuchten therapienaïven AIH-Patienten lag die *IL13*-Expression unterhalb der Detektionsgrenze des Tests.

3.2.4.2 Expression T_H2 -assoziierter Zytokine durch leberinfiltrierende Lymphozyten

Zur Untersuchung des T_H2 -Status der LIL von AIH-Patienten wurde die Genexpression von *IL4*, *IL10* und *IL13* analysiert und auf das mediane Expressionsniveau der LIL der Kontrollgruppe normiert, die aus je zwei Adenom- und NASH-Patienten bestand. Die Änderung der relativen Expression der Proben und Kontrollen ist in Abb. 26 graphisch wiedergegeben. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet.

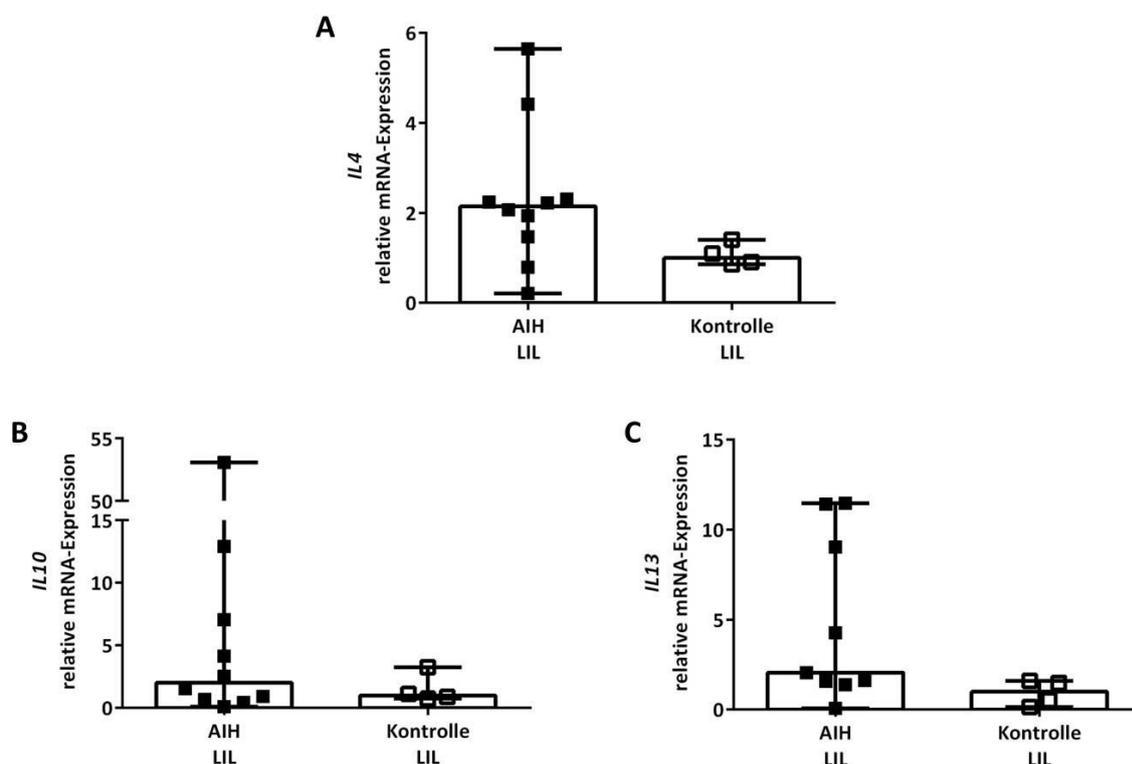


Abb. 26: Genexpressionsanalyse von *IL4*, *IL10* und *IL13* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *IL4* (B) *IL10* und (C) *IL13* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden.

Die Genexpressionsanalyse der LIL von AIH-Patienten zeigte eine $\approx 2,14$ -fach tendenziell erhöhte *IL4*-Expression (Abb. 26A; $p = 0,0999$). Die mediane Expression von *IL10* bei den AIH-Patienten war um das $\approx 2,02$ -fache ebenfalls erhöht (Abb. 26B; $p > 0,05$). Des Weiteren war auch die *IL13*-Expression um das $\approx 2,06$ -fache erhöht (Abb. 26C; $p = 0,1007$).

3.2.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chronisch-entzündliche Erkrankungen sind durch die Gegenwart von zellulären Infiltraten charakterisiert, wobei Chemokine an diesem Phänomen beteiligt zu sein scheinen²⁰⁶. Bei Chemokinen handelt sich um eine Familie von niedermolekularen, chemotaktisch wirkenden Zytokinen, die unter anderem die Aktivierung und Migration von Immunzellen wie Phagozyten und Lymphozyten aus dem Blutsystem und im Gewebe stimulieren und regulieren^{1,8}. Chemokine werden wirksam durch Bindung an ihre Rezeptoren, die sich auf der Zellmembran der Zielzellen befinden. Chemokinrezeptoren sind nützlich bei der Identifizierung der verschiedenen T-Zellsubpopulation. Den Chemokinrezeptor CXCR3 findet man auf diversen Zellen des Immunsystems, insbesondere auf aktivierten T-Zellen²⁰⁷. Die Liganden von CXCR3 sind CXCL9, CXCL10 und CXCL11²⁰⁸, deren Expression durch die T_H1-spezifischen Zytokine IFN γ und TNF α induziert wird²⁴. Zusammen mit CXCR3 ist der Chemokinrezeptor CCR5 charakteristisch für T_H1-Zellen^{188,189}, während die CXCR3/CCR6-Rezeptorkombination typisch für T_H17-Zellen ist^{41,195,203}. Ein Ligand von CCR5 ist CCL5, welcher profibrotische Eigenschaften hat¹⁹¹. Die Genexpression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR5 und CCR6 sowie der Chemokinliganden CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CCL5 wurden sowohl in den PBMC (Abschnitt 3.2.5.1) als auch in den LIL (Abschnitt 3.2.5.2) von AIH-Patienten untersucht.

3.2.5.1 Expression von Chemokinen durch mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

Auf RNA-Ebene wurde mittels qPCR die Expression von ausgewählten Chemokinrezeptoren und deren Liganden bei therapie-naïven AIH-Patienten im PBMC-Kompartiment untersucht. Dafür wurde die relative Änderung der Genexpression von *CXCR3*, *CCR5* und *CCR6* (Abb. 27), *CXCL9*, *CXCL10* und *CXCL11* (Abb. 28) sowie *CCL5* (Abb. 29) bestimmt, indem die relative Expression der Proben und Kontrollen auf das mediane Expressionsniveau der gesunden Kontrollprobanden normiert wurde. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet.

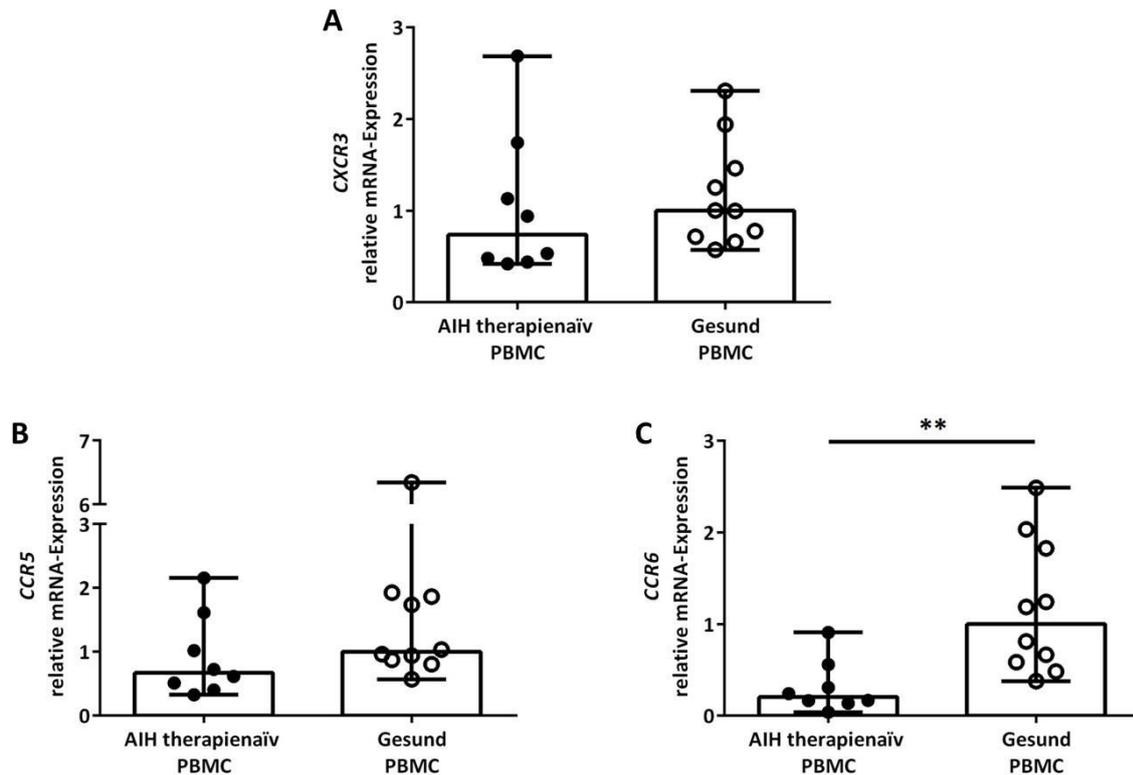


Abb. 27: Genexpressionsanalyse von *CXCR3*, *CCR5* und *CCR6* in PBMC von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *CXCR3*, (B) *CCR5* und (B) *CCR6* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der gesunden Kontrollprobanden. Statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression von AIH-Patienten gegenüber gesunden Probanden sind angegeben. (** $p < 0,01$)

Im Vergleich zur medianen Expression der Kontrollprobanden konnte eine niedrigere *CXCR3*-Expression in der AIH-Kohorte auf das $\approx 0,74$ -fache nachgewiesen werden (Abb. 27A; $p > 0,05$). Bezüglich *CCR5* zeigte sich ebenfalls eine geringere Expression auf das $\approx 0,67$ -fache im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 27B; $p > 0,05$). *CCR6* wurde in den PBMC von AIH-Patienten im Vergleich zur Kontrolle auf das $\approx 0,20$ -fache signifikant schwächer exprimiert (Abb. 27C; $p = 0,0021$).

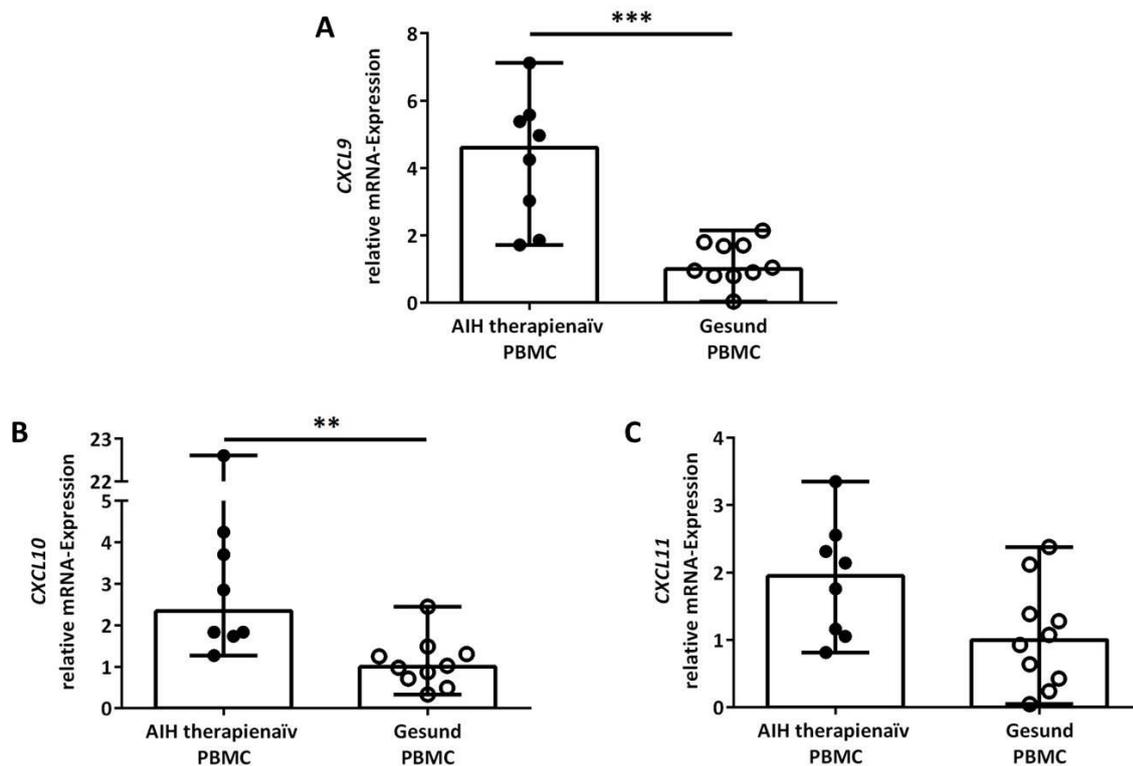


Abb. 28: Genexpressionsanalyse von *CXCL9*, *CXCL10* und *CXCL11* in PBMC von therapienaiven AIH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *CXCL9*, (B) *CXCL10* und (B) *CXCL11* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der gesunden Kontrollprobanden. Statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression von AIH-Patienten gegenüber gesunden Probanden sind angegeben. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Bei *CXCL9* zeigte sich in der AIH-Kohorte eine $\approx 4,61$ -fach signifikant höhere Expression als in der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden (Abb. 28A; $p = 0,0003$). Des Weiteren wurde *CXCL10* in den PBMC der AIH-Gruppe um das $\approx 2,34$ -fache signifikant stärker exprimiert als bei den gesunden Kontrollen (Abb. 28B; $p = 0,0013$). Bezüglich *CXCL11* zeigte sich eine auf das $\approx 1,95$ -fache tendenziell erhöhte Expression in der AIH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollkohorte (Abb. 28C; $p = 0,0675$).

Die Auswertung der qPCR-Analyse ergab, dass *CXCR3* in der AIH-Kohorte ($\approx 0,94$ -fach) und Kontrollgruppe gleich stark exprimiert wurde (Abb. 30A; $p > 0,05$). *CCR5* wurde in den LIL der AIH-Patienten mit einer $\approx 0,59$ -fachen Expression schwächer exprimiert, verglichen mit den Kontrollprobanden (Abb. 30B; $p > 0,05$). Beim Vergleich der medianen *CCR6*-Expression war diese in den LIL der AIH-Patienten auf das $\approx 0,20$ -fache schwächer exprimiert als in den Kontrollen (Abb. 30C; $p > 0,05$).

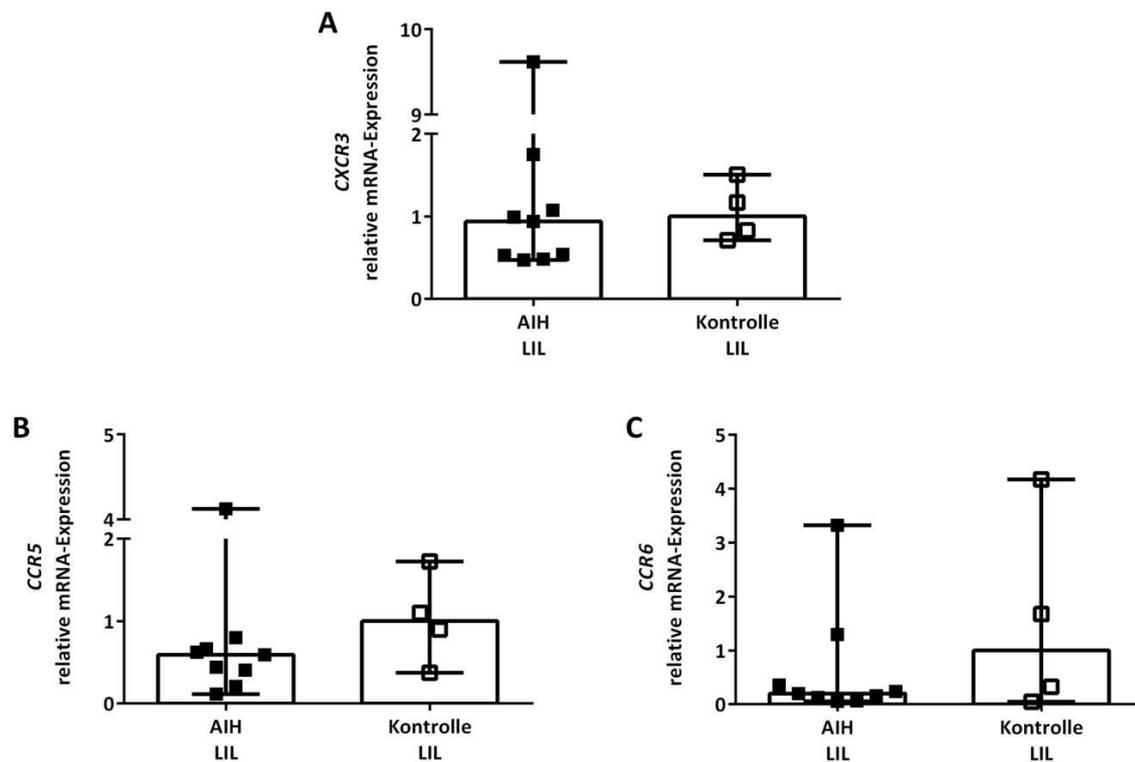


Abb. 30: Genexpressionsanalyse von *CXCR3*, *CCR5* und *CCR6* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *CXCR3*, (B) *CCR5* und (C) *CCR6* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Für die interne Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden.

Die Genexpressionsanalyse der intrahepatischen Lymphozyten von AIH-Patienten zeigte eine tendenziell erhöhte *CXCL9*-Expression auf das $\approx 6,47$ -fache verglichen mit den Kontrollen, die keine autoimmune Lebererkrankung aufwiesen (Abb. 31A; $p = 0,0727$). Darüber hinaus war die mediane Expression von *CXCL10* in der AIH-Kohorte um das $\approx 13,50$ -fache höher exprimiert als in der Kontrollkohorte (Abb. 31B; $p > 0,05$). Die *CXCL11*-Expression zeigte eine mediane $\approx 3,54$ -fache Erhöhung bei den LIL der AIH-Patienten im Vergleich zu den LIL der Kontrollen (Abb. 31C; $p > 0,05$).

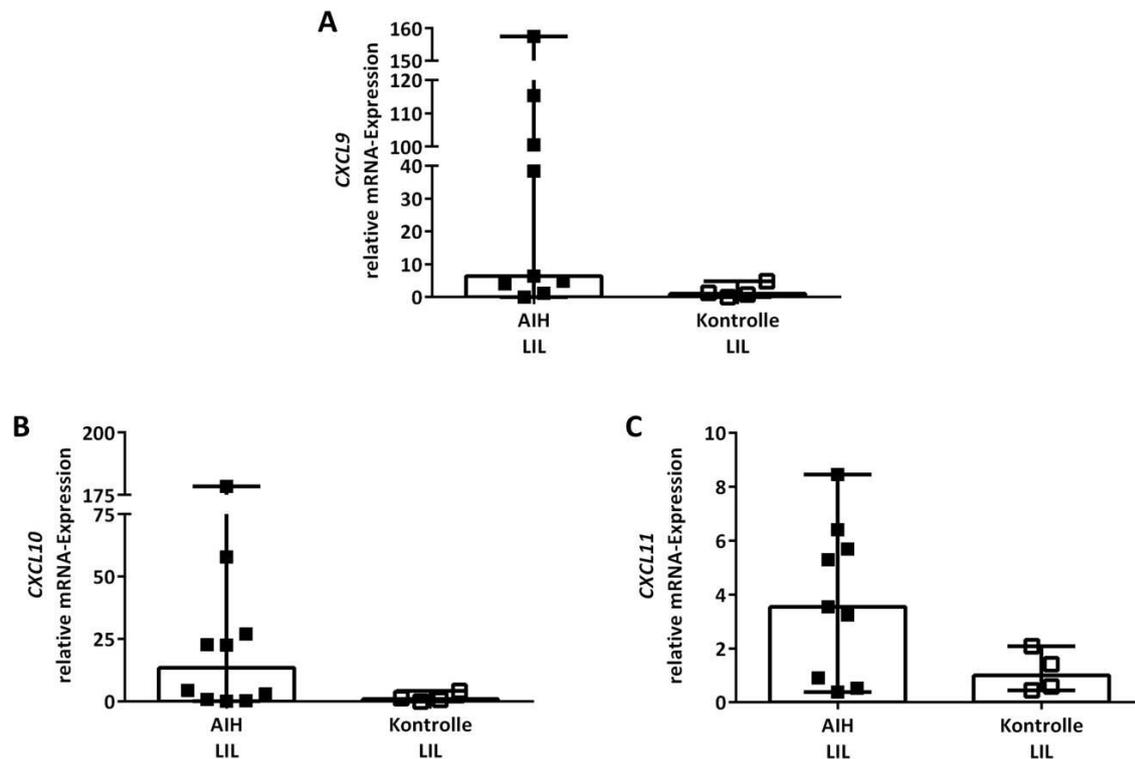


Abb. 31: Genexpressionsanalyse von *CXCL9*, *CXCL10* und *CXCL11* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *CXCL9*, (B) *CXCL10* und (C) *CXCL11* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden.

Die Untersuchung von *CCL5* in den LIL der AIH-Kohorte zeigte eine schwächere Expression (Abb. 32; $\approx 0,70$ -fach; $p > 0,05$) als in denen der Kontrollpatienten.

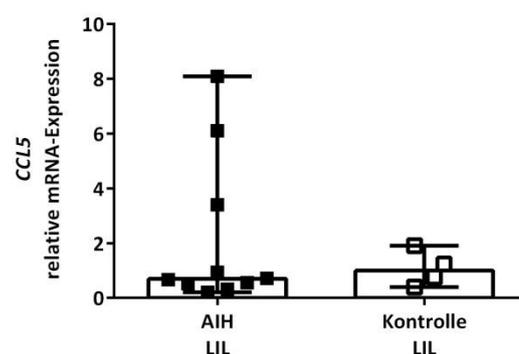


Abb. 32: Genexpressionsanalyse von *CCL5* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von *CCL5* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen der Genexpression von Chemokinrezeptoren in den LIL der AIH-Patienten keine veränderte Expressionsrate von *CXCR3* im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen die Expression von *CCR5* und *CCR6* vermindert war. Allerdings wies der T_H1 -assoziierte Rezeptor *CCR5* in der AIH-Kohorte ein höheres Expressionsniveau auf als der T_H17 -assoziierte Rezeptor *CCR6*. Die *CXCR3*-Liganden *CXCL9*, *CXCL10* und *CXCL11* wurden in den LIL der AIH-Patienten stärker exprimiert im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu wurde bei dem *CCR5*-Liganden *CCL5* eine verminderte Expression detektiert.

3.2.6 Koloniestimulierende Faktoren und zytotoxische Effektorproteine

Die Koloniestimulierenden Faktoren (CSF; *colony stimulating factors*) M-CSF (Makrophagen-CSF; *CSF1*) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-CSF; *CSF2*) wurden zuerst definiert durch ihre Fähigkeit *in vitro* die Differenzierung und Proliferation von Knochenmark-Vorläuferzellen anzuregen und myeloide Zellen zu stimulieren²⁰⁹. Im Falle von M-CSF handelt es sich um die Generierung von Makrophagenkolonien und bei GM-CSF um Bildung von Kolonien aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Mittlerweile ist bekannt, dass erhöhte Expressionen von GM-CSF und M-CSF im Kontext von Entzündung und Autoimmunität von Bedeutung sind²¹⁰. Des Weiteren scheint GM-CSF als proinflammatorisches T-Zellzytokin von eminenter Bedeutung zu sein²¹¹.

Bei Autoimmunerkrankungen kommt es im Wesentlichen zu Gewebeschädigungen durch autoreaktive T-Zellen. Deswegen wurde untersucht, ob die LIL der AIH-Patienten ein zytotoxisches Potential aufweisen. Zytolytische Effektorproteine sind Granulysin (*GNLY*), Granzym B (*GZMB*) und Perforin (*PRF1*).

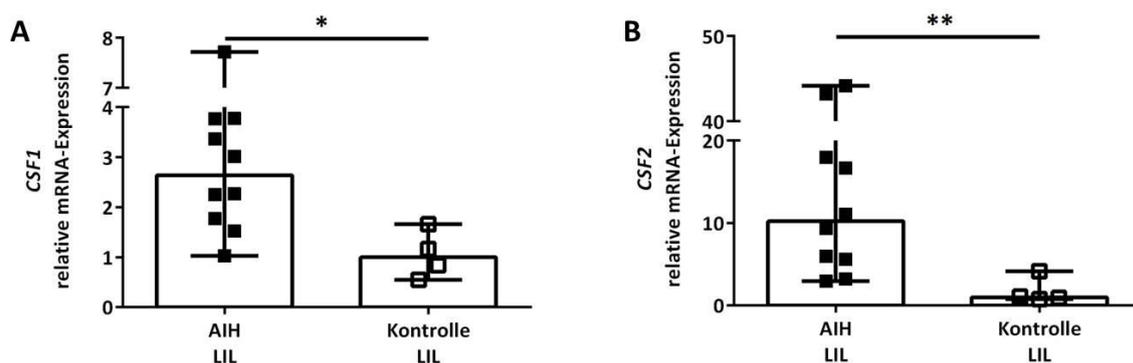


Abb. 33: Genexpressionsanalyse von *CSF1* und *CSF2* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *CSF1* und (B) *CSF2* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen *GAPDH* verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden. Statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression von AIH-Patienten gegenüber Kontrollprobanden sind angegeben. (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$)

Mithilfe der qPCR-Methode wurde auf RNA-Ebene die relative Expression von ausgewählten CSF und Proteinen mit zytotoxischen Eigenschaften der LIL von AIH-Patienten detektiert. Die Evaluierung der relativen Änderung der Genexpression von *CSF1* und *CSF2* (Abb. 33) sowie *GNLY*, *GZMB* und *PRF1* (Abb. 34) erfolgte durch Normierung auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollgruppe aus Patienten ohne autoimmune Lebererkrankung. Das Haushaltsgen GAPDH wurde zur internen Normalisierung verwendet.

Die Auswertung der Genexpressionsanalyse der LIL zeigte eine um das $\approx 2,64$ -fach signifikant höhere Expression von *CSF1* in der AIH-Kohorte verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 33A; $p = 0,0140$). Weiterhin war die *CSF2*-Expression in den AIH-Patienten um das $\approx 10,22$ -fache signifikant stärker als in den Kontrollprobanden (Abb. 33B; $p = 0,0080$).

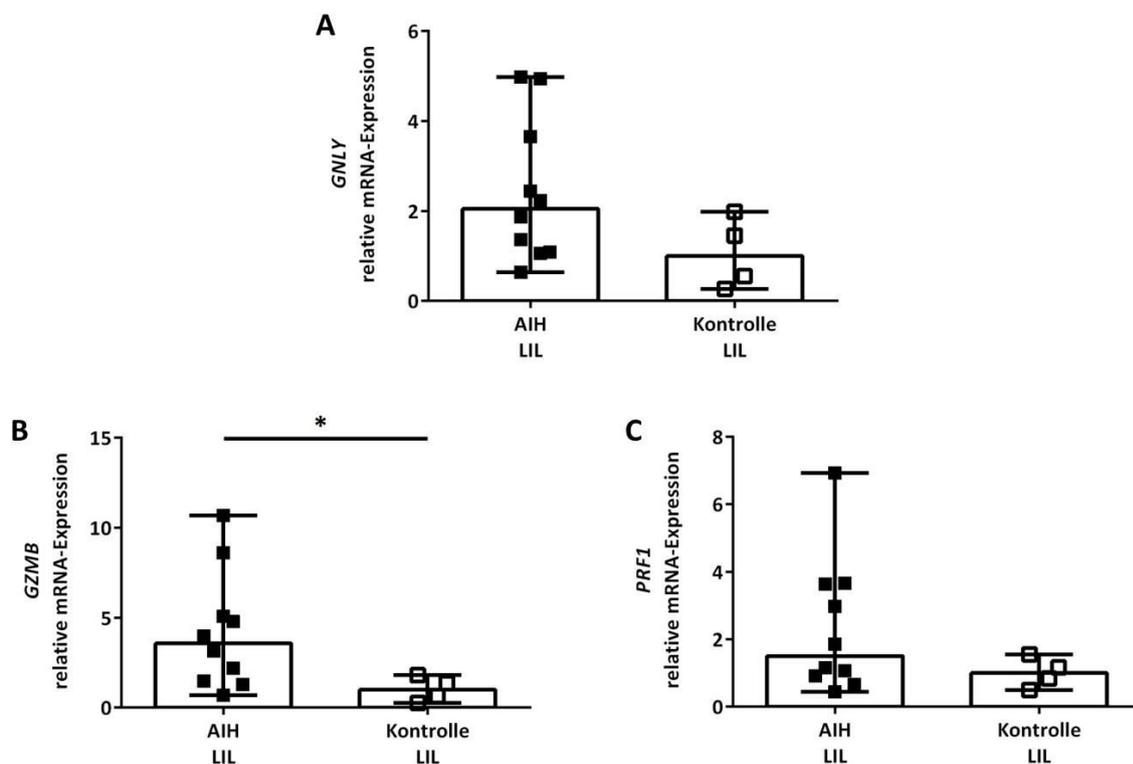


Abb. 34: Genexpressionsanalyse von *GNLY*, *GZMB* und *PRF1* in LIL von AIH-Patienten und Kontrollprobanden. Die relative Expression von (A) *GNLY*, (B) *GZMB* und (C) *PRF1* wurde mittels der qPCR-Methode in Duplikaten ermittelt und mit der ΔC_T -Methode berechnet. Zur internen Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression in Bezug auf das mediane Expressionsniveau der Kontrollprobanden. Statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression von AIH-Patienten gegenüber Kontrollprobanden sind angegeben. (* $p \leq 0,05$)

Die mediane Expression des zytotoxischen Effektorproteins *GNLY* war in den LIL der AIH-Probanden um das $\approx 2,05$ -fache höher exprimiert, verglichen mit dem medianen Expressionsniveau der Kontrollen (Abb. 34A; $p > 0,05$). Außerdem zeigte sich in der AIH-Kohorte eine um das $\approx 3,57$ -fache signifikant höhere Expression von *GZMB* im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 34B; $p = 0,0360$). Auch die

Expression von *PRF1* war in den AIH-Patienten um das $\approx 1,50$ -fache stärker als in den Patienten ohne autoimmune Lebererkrankung (Abb. 34C; $p > 0,05$).

3.3 Untersuchung des T-Zellrezeptors von leberinfiltrierenden Lymphozyten aus AIH-Patienten

Obwohl die Pathogenese der AIH weitestgehend unbekannt ist, wird angenommen, dass die Erkrankung durch eine inadäquate Immunantwort gegen Selbstantigene ausgelöst wird. Für den hepatozellulären Schaden scheinen T-Zellen hauptverantwortlich zu sein, da unter anderem ein dichtes mononukleäres Zellinfiltrat in der Leber von AIH-Patienten detektierbar ist¹⁰⁹ und die Intensität der antigenspezifischen T-Zellantwort mit der Schwere der Erkrankung korreliert^{212,213}. Soweit wurden CYP2D6 in $\approx 10\%$ der Patienten^{138,149,214} und SepSecS in $\approx 20\%$ der Patienten^{145,152,215} als Autoantigene der AIH identifiziert. Dennoch sind nach derzeitigem Stand der Forschung bei ca. 70 % der AIH-Patienten mutmaßliche Autoantigene nicht bekannt. Zur Erkennung von Antigenen dient der TCR, welcher auf der Oberfläche von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten verankert ist¹. Hierbei handelt es sich um ein Heterodimer, das meist aus einer α - und einer β -Kette zusammengesetzt ist. T-Zellen besitzen Antigenrezeptoren einer Spezifität und differenzieren nach Aktivierung zu einer Effektorzelle. Durch klonale Expansion entsteht eine Vielzahl an Nachkommen dieser Zelle, deren TCR die gleiche Spezifität aufweisen. Bei T-Zellen unterschiedlicher Spezifität, also bei polyklonaler Expansion, ist dagegen ein breitgefächertes TCR-Repertoire zu finden. Die Untersuchung des Repertoires erfolgt über die Identifizierung der β -Untereinheit des TCR. Im Gegensatz dazu weist eine oligo- bzw. monoklonale Expansion von wenigen oder einer T-Zelle ein eingeschränktes TCR-Repertoire mit entsprechend wenigen bzw. einer $V\beta$ -Kette auf. Um zu überprüfen, ob die LIL der hier untersuchten AIH-Patienten einer multi- oder oligoklonalen Expansion unterlagen, erfolgte die Charakterisierung der TCR $V\beta$ -Kette der intrahepatischen T-Zellen. Dafür wurden T-Zellen in Suspension auf Einzelzellniveau kloniert und expandiert (Abschnitt 3.3.1). Die TCR $V\beta$ -Ketten dieser potentiellen T-Zellklone wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abschnitt 3.3.2)

3.3.1 Klonierung und Expansion von leberinfiltrierenden Lymphozyten

Die Analyse des spezifischen TCR von LIL kann Erkenntnisse bezüglich der AIH-Pathogenese liefern. Zur Untersuchung des TCR einer individuellen T-Zelle benötigt man eine Vielzahl von Klonen dieser Einzelzelle. Durch Arenz *et al.* wurde gezeigt, dass eine antigenunabhängige Expansion von T-Zellen *in vitro* keinen Einfluss auf das TCR $V\beta$ -Repertoire hat²¹⁶. Es wurden LIL aus Biopsien von AIH-Patienten isoliert und in Suspension mittels der Methode des Grenzverdünnungsklonens vereinzelt. Zum Anlegen einer monoklonalen T-Zellkultur wurden die Zellen durch eine unspezifische T-Zellaktivierung mittels PHA expandiert. Nach repetitiver Restimulierung mit PHA sowie IL-2 als T-Zellwachstumsfaktor und bestrahlten, nichtproliferierenden Fütterzellen als Quelle von zusätzlichen Wachstumsfaktoren²¹⁷, war eine lichtmikroskopische Visualisierung von potentiellen T-Zellklonen möglich (Abb. 35).

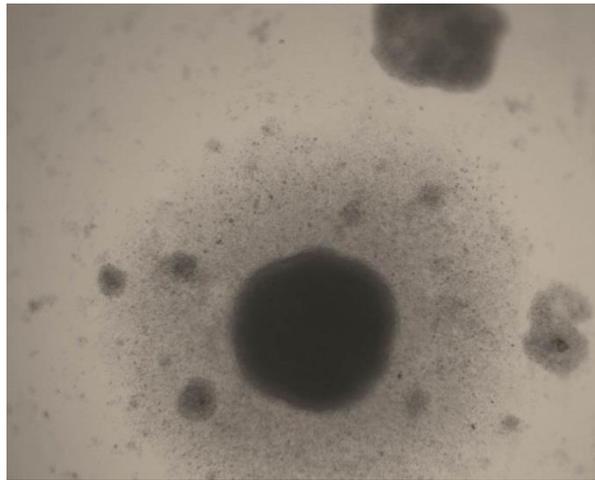


Abb. 35: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme einer potentiell monoklonalen T-Zellkultur. Aus Leberbiopsien isolierte LIL wurden mittels Grenzverdünnungsklonens vereinzelt. Zur Förderung der Expansion wurden die Einzelzellen mit dem T-Zellmitogen PHA unspezifisch stimuliert sowie mit IL-2 und bestrahlten Fütterzellen kultiviert. Die Aufnahme zeigt die typische Zellaggregation einer potentiell monoklonalen T-Zellkultur nach repetitiver Restimulierung in 50-facher Vergrößerung.

Die Anzahl der potentiellen T-Zellklone, die aus den LIL von vier verschiedenen AIH-Patienten generiert wurden, ist in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Anzahl potentieller T-Zellklone isoliert aus den Leberbiopsien von vier AIH-Patienten nach visueller Beurteilung der Zellaggregation.

Patient	Anzahl potentiell monoklonaler T-Zellkulturen
11	12
12	51
23	16
26	52
Σ	131

Die 131 potentiellen T-Zellklone wurden durchflusszytometrisch auf ihre Klonalität untersucht und bei positiver Klonalität hinsichtlich der Expression ihrer spezifischen V β -Kette analysiert.

3.3.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der TCR V β -Ketten

Da eine T-Zelle in der Regel einen TCR exprimiert, ist es möglich über Bestimmung der TCR-Konstellation auf die Klonalität der Zellpopulation zu schließen. Eine individuelle T-Zelle trägt in der Regel zwischen $1 \cdot 10^4$ und $3 \cdot 10^4$ identische Kopien eines einzelnen TCR auf ihrer Oberfläche⁶⁴. Es wurde gezeigt, dass bis zu 30 % der $\alpha\beta$ -T-Zellen zwei verschiedene V α -Ketten exprimieren⁶⁷. Dahingegen exprimieren nur bis zu 1 % der T-Zellen mit $\alpha\beta$ -TCR zwei verschiedene V β -Ketten^{68,69}. Dies und die höhere Variabilität der TCR β -Untereinheit im Vergleich zur TCR α -Untereinheit, prädestiniert die V β -Kette für Klonalitäts- und TCR-Analysen.

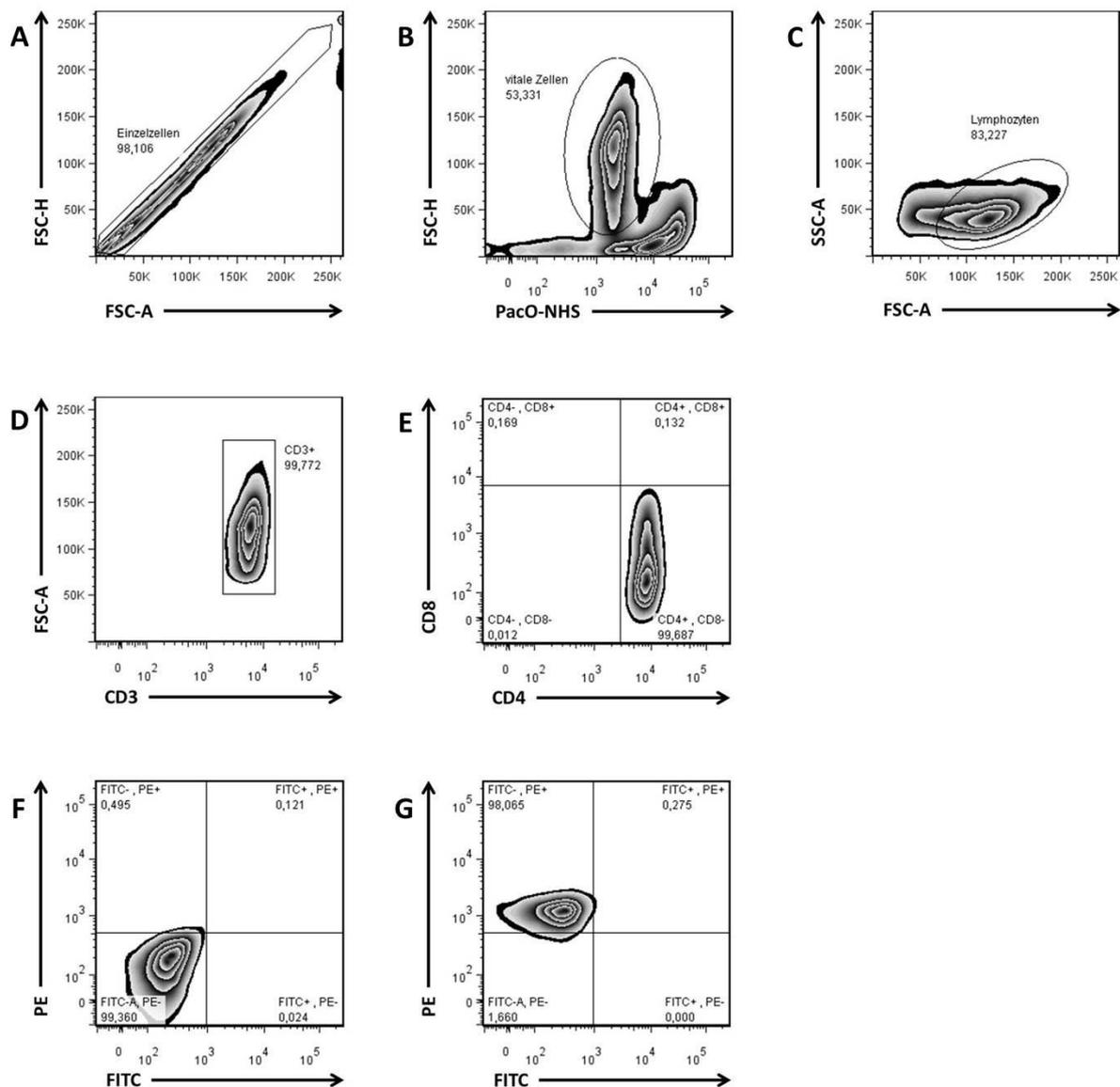


Abb. 36: Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Messung von TCR V β -Ketten anhand einer Beispielfärbung. Die Identifizierung der TCR V β -Ketten erfolgte durch das IOTest[®] Beta Mark TCR V β Repertoire Kit. Die repräsentativen DichtepLOTS zeigen das Gating auf (A) Einzelzellen durch die FSC-A/FSC-H-Einstellung, (B) vitale Zellen, (C) Lymphozyten durch die FSC-A/SSC-A-Einstellung, (D) CD3⁺ Zellen und (E) CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen. Durch acht verschiedene Gemische mit jeweils FITC-, PE- und FITC+PE-gekoppelten Antikörpern unterschiedlicher Spezifität konnte das TCR V β -Repertoire der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen bestimmt werden. Die CD4⁺ Zellen aus dieser repräsentativen Färbung konnten (G) positiv auf eine TCR V β -Kette und (F) negativ auf alle weiteren TCR V β -Ketten getestet werden.

Zur Untersuchung des TCR V β -Repertoires diente das durchflusszytometrisch-basierte Fertigsystem IOTest[®] Beta Mark TCR V β Repertoire Kit (Fa. Beckman Coulter). Mit diesem System war es möglich, 24 verschiedene TCR V β -Spezifitäten nachzuweisen, welche ca. 70 % des normalen humanen TCR V β -Repertoires der CD3⁺ Lymphozyten abdecken. Zur Untersuchung der V β -Kette der T-Zellen wurden die Zielzellen zunächst mittels Dublettendiskriminierung, Lebend/Tot-Diskriminierung und morphologischer Lymphozytencharakterisierung eingegrenzt (Abb. 36A-C). Nach Abgrenzung der

Zielzellen mithilfe der Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 (Abb. 36D, E), konnten diese hinsichtlich der Expression ihrer V β -Ketten untersucht werden. Pro Färbeansatz wurden drei verschiedene Spezifitäten gleichzeitig getestet, wobei die in dem Färbegemisch enthaltenen drei Antikörper, welche gegen verschiedene TCR V β -Epitope gerichtet sind, entweder FITC-, PE- oder FITC+PE-gekoppelt waren (Abb. 36F, G). Bei 24 Spezifitäten ergaben sich so insgesamt acht Färbeansätze pro potentiellen T-Zellklon.

Nicht klonale T-Zellpopulationen wurden unter anderem dadurch identifiziert, dass es gemischte Populationen aus sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen waren. Des Weiteren wurden auch T-Zellkulturen als nicht klonal bewertet, bei denen mehrere V β -Ketten durchflusszytometrisch nachgewiesen wurden. Dahingegen wurden die T-Zellkulturen weiterhin als potentiell monoklonal eingestuft, die bezüglich der Oberflächenmarker entweder nur CD3⁺CD4⁺ oder CD3⁺CD8⁺ exprimierten und bezüglich der V β -Kettenfärbung auf nur eine Kette positiv (V β -Ak⁺) bzw. negativ auf alle Ketten (V β -Ak⁻) getestet wurden. In Abb. 37 sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Oberflächenmarker- und TCR V β -Färbung dargestellt. Von 131 als potentiell klonal eingestuften T-Zellkulturen (Tab. 8) waren 45 eindeutig nicht klonal aufgrund des gleichzeitigen Nachweises von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten und/oder mehrerer V β -Ketten (Abb. 37A). Diese Kulturen wurden somit aus den nachfolgenden Auswertungen ausgeschlossen. Die verbleibenden 86 T-Zellkulturen wurden weiterhin als potentiell klonal bewertet, wobei 41 CD4⁺ und 45 CD8⁺ T-Zellpopulationen waren (Abb. 37A). Bei 26 T-Zellklonen der CD4⁺ T-Zellpopulationen konnte eine (V β -Ak⁺) und bei 15 keine (V β -Ak⁻) der getesteten V β -Ketten nachgewiesen werden, bei den CD8⁺ T-Zellkulturen wurden bei 20 T-Zellklonen eine (V β -Ak⁺) und bei 25 keine (V β -Ak⁻) V β -Kette durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 37B).

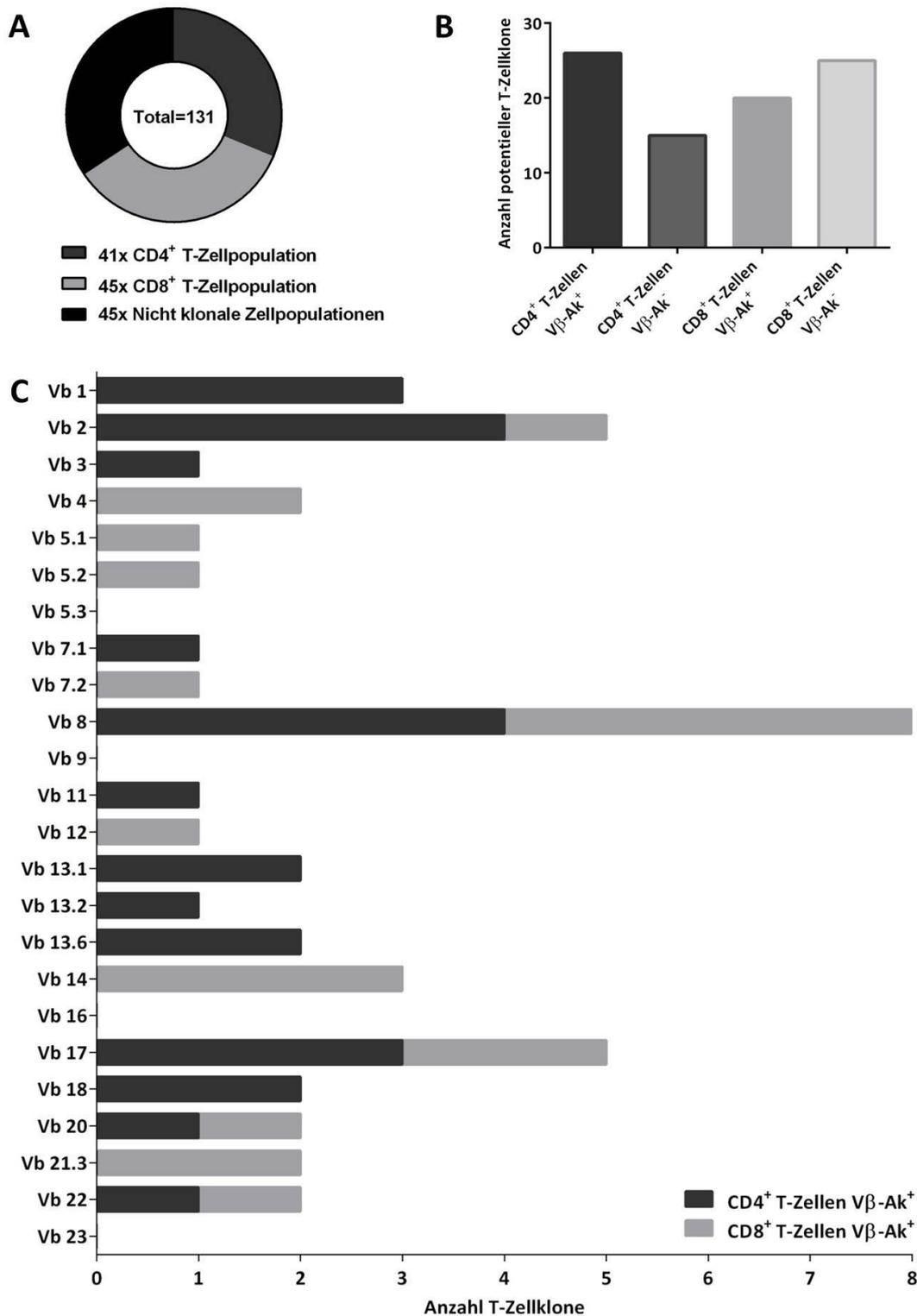


Abb. 37: Bestimmung der Klonalität und der TCR Vβ-Ketten potentiell monoklonaler T-Zellkulturen generiert aus LIL von AIH-Patienten. Die Identifizierung potentieller T-Zellklone erfolgte durchflusszytometrisch über (A) die Bestimmung der Oberflächenmarker CD4 bzw. CD8 und (B) über die spezifische Anfärbung der TCR Vβ-Ketten. Als nicht klonal eingestuft wurden CD3⁺ Zellpopulationen, in denen parallel CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und/oder in denen mehrere TCR Vβ-Ketten nachgewiesen wurden. Als potentiell klonal galten CD3⁺ T-Zellkulturen, die entweder nur CD4⁺ oder CD8⁺ waren und positiv auf eine TCR Vβ-Kette (Vβ-Ak⁺) bzw. negativ auf alle TCR Vβ-Ketten (Vβ-Ak⁻) getestet wurden. (C) zeigt die Verteilung der einzelnen TCR Vβ-Ketten in Vβ-Ak⁺ CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen.

Die als V β -Ak⁺ eingestuften T-Zellen wurden im Folgenden auf die spezifische Expression ihrer V β -Ketten hin evaluiert. Es gibt 65 verschiedene V β -Segmente, welche in 25 Unterfamilien eingeteilt werden und von denen 22 funktionell sind. Dabei weist jedes Mitglied einer Familie auf DNA-Ebene eine $\geq 75\%$ ige Sequenzhomologie mit mindestens einem weiteren Familienmitglied auf²¹⁸. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der V β -Segmente entspricht der von Wei *et al.*²¹⁹. Die TCR V β -Kettenanalyse der V β -Ak⁺ T-Zellkulturen zeigte, dass die V β -Familie Vb 8 am häufigsten vertreten war und sowohl durch vier CD4⁺ als auch vier CD8⁺ T-Zellkulturen exprimiert wurde (Abb. 37C). Am zweithäufigsten vertreten waren Vb 2, exprimiert durch vier CD4⁺ T-Zellklone und einem CD8⁺ T-Zellklon, und Vb 17, exprimiert durch drei CD4⁺ T-Zellklone und zwei CD8⁺ T-Zellklone. Jeweils dreimal vertreten waren Vb 1, ausschließlich nachgewiesen in CD4⁺ T-Zellkulturen, und Vb 14, ausschließlich nachgewiesen in CD8⁺ T-Zellkulturen. Die V β -Familien Vb 4 und Vb 21.3, alleinig durch CD4⁺ T-Zellklone exprimiert, sowie Vb 13.1, Vb 13.6 und Vb 18, ausnahmslos durch CD8⁺ T-Zellkulturen exprimiert, wurden jeweils zweimal nachgewiesen. Ebenfalls zweimal zu finden, aber in je einer CD4⁺ und CD8⁺-Zellkultur, waren Vb 20 und Vb 22. Durch je einen CD4⁺ T-Zellklon wurde Vb 3, Vb 7.1, Vb 11 und Vb 13.2 exprimiert und durch je einen CD8⁺ T-Zellklon Vb 5.1, Vb 5.2, Vb 7.2 und Vb 12. Die V β -Familien Vb 5.3, Vb 9, Vb 16 und Vb 23 konnten durchflusszytometrisch in keiner potentiell monoklonalen T-Zellkultur nachgewiesen werden.

Zusammengefasst konnten aus den LIL von AIH-Patienten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklone generiert werden. Dabei zeigte sich nach durchflusszytometrischer Analyse der TCR V β -Ketten eine gehäufte Expression von Vb 8, Vb 2 und Vb 17 sowohl durch CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellklone.

4 Diskussion

Die AIH ist eine entzündliche Lebererkrankung autoimmuner Genese mit bisher unvollständig verstandenem Pathomechanismus. T-Zellen scheinen eine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der AIH zu spielen, wobei deren Phänotyp und Funktion unzureichend beschrieben sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der extra- und intrahepatischen T-Zellen von AIH-Patienten anhand der Expression und Sekretion T-zellspezifischer Zytokine, Chemokine und zytotoxischer Moleküle. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Analyse des TCR-Repertoires leberinfiltrierender T-Zellen zur Klärung der Frage, ob es zu einer antigengetriebenen oligo- oder monoklonalen Expansion von T-Zellen in der Leber kommt.

4.1 Das extra- und intrahepatische T-Zellprofil von AIH-Patienten

4.1.1 Das lymphozytäre Verhältnis in der Peripherie von AIH-Patienten

Das vermehrte Vorkommen von Lymphozyten in der Leber wird im Allgemeinen mit der Pathogenese einer Hepatitis in Verbindung gebracht, wobei Lymphozyteninfiltrationen bei entzündlichen Erkrankungen wie autoimmunen und viralen Lebererkrankungen detektiert werden können und unter diesen Bedingungen als leberinfiltrierende Lymphozyten bezeichnet werden^{220,221}. Aber auch im physiologischen Zustand konnte die Anwesenheit von Lymphozyten in der Leber nachgewiesen werden, wobei eine durchschnittliche humane Leber ca. $1 \cdot 10^{10}$ Lymphozyten aufweist^{220,222}. Innerhalb des Lymphozytenkompartiments einer gesunden Leber bilden $\alpha\beta$ -T-Zellen die dominierende Population intrahepatischer Lymphozyten^{79,220}. Durch Norris *et al.* wurde gezeigt, dass in der gesunden Leber das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen bei 1:3,5 liegt, während im peripheren Blut die CD4/CD8-Ratio mit 2:1 invers ist⁸³. Auch im peripheren Blut bilden $\alpha\beta$ -T-Zellen die Mehrheit innerhalb der Gesamtlmphozyten²²⁰. Bei akuten oder chronischen Erkrankungen der Leber kommt es unter anderem zur Änderung der Lymphozytenzusammensetzung⁷³. Das inflammatorische mononukleäre Zellinfiltrat in der Leber von AIH-Patienten setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen, wobei auch hier $\alpha\beta$ -T-Zellen vorherrschend sind. Dabei sind, ungleich der lymphozytären Zusammensetzung einer gesunden Leber, hier $CD4^+$ T-Zellen die dominierende Gruppe¹⁵⁰. Aber auch $CD8^+$ T-Zellen bilden einen beträchtlichen Anteil innerhalb des lymphozytären Infiltrats von AIH-Patienten^{108-110,223}. Sowohl autoreaktiven $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen wird eine tragende Rolle in der Pathogenese der AIH zugeschrieben^{107,110,111,148,158,201,202}, wobei $CD4^+$ T-Zellen, im speziellen T_H1 -Zellen, zu Beginn der Erkrankung dominieren²²⁴. Diese rekrutieren zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen, was zu einer intrahepatischen Erhöhung der $CD8^+$ T-Zellfrequenz führt, gefolgt von einer möglichen aggressiven Schädigung der Hepatozyten im Verlauf der Erkrankung²²⁵.

Die CD4/CD8-Ratio von AIH-Patienten in der Peripherie ist bisher kaum beschrieben. T-Zellen exprimieren typischerweise den CD3-Korezeptor, so dass man durch Ermittlung der Frequenz von CD3⁺ Lymphozyten annähernd auf die Intensität der Entzündung schließen kann²²⁶. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in der Peripherie von therapienaiven AIH-Patienten die mediane Frequenz der CD3⁺ Lymphozyten höher lag als in der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 10A), was auf die Entzündungsreaktion zurückgeführt werden könnte. Innerhalb der CD3⁺ T-Zellpopulation lag der mediane prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Zellen in der AIH-Kohorte tendenziell höher als in den gesunden Kontrollen (Abb. 10B). Somit zeigt sich im zirkulierenden Blut von therapienaiven AIH-Patienten eine CD4⁺ T-Zelldominanz innerhalb der CD3⁺ Zellpopulation, wie sie auch für die lymphozytären Infiltrate der Leber von AIH-Patienten gezeigt wurden^{110,223,225} und durch Löhr *et al.* für PBMC beschrieben wurde²²⁷. Im Gegensatz zur erhöhten Frequenz von CD4⁺ T-Zellen, konnte in der vorliegenden Arbeit eine entsprechend reduzierte CD8⁺ T-Zellfrequenz in der AIH-Kohorte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 10C). Die Berechnungen der CD4/CD8-Ratio bei AIH-Patienten ergeben in der Peripherie ein Verhältnis von 3,4:1 und bei der Gesundheitskontrolle von 2:1.

Zusammenfassend ergibt sich somit eine numerische Verschiebung zugunsten der CD4⁺ T-Zellen bei den AIH-Patienten, was ein Hinweis für die tragende Rolle dieser Zellen in der AIH-Pathogenese sein könnte. Weitere Hinweise auf eine tragende Funktion von CD4⁺ T-Zellen in AIH-Patienten sind die genetische Prädisposition bezüglich der MHCII-Moleküle HLA-DR3 und DR4^{109,115,135}, der Nachweis von CD4⁺ T-Zellen in den lymphozytären Infiltraten der Leber^{109,111,148} sowie die Identifikation autoantigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen¹⁴⁹⁻¹⁵².

4.1.2 Expression und Sekretion T_H1-spezifischer Signaturzytokine

In Bezug auf die Untersuchung T_H1-spezifischer Zytokine konnte mittels Zytokin-ELISA-Untersuchungen des Serums in der therapierten AIH-Kohorte kein IFN γ nachgewiesen werden, wohingegen die TNF α -Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war (Abb. 7). Ein Symptom von Patienten mit akuter AIH ist häufig ein recht ausgeprägtes allgemeines Krankheitsgefühl, zu welchem häufig eine gesteigerte TNF α -Konzentration im Blut führen kann^{228,229}. Interessant ist, dass offenbar auch therapierte Patienten eine erhöhte TNF α -Konzentration im Blut aufweisen.

Durch qPCR-Untersuchungen der Genexpression T_H1-assoziierter Zytokine konnte auf RNA-Ebene in PBMC gezeigt werden, dass bei therapienaiven AIH-Patienten *IL2* und *IFNG* schwächer exprimiert waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Abb. 11A, B). Im Gegensatz dazu war *TNF* in den PBMC der AIH-Patienten signifikant stärker exprimiert als in den gesunden Kontrollen (Abb. 11C). Dies deckt sich bezüglich IFN γ und TNF α mit dem Ergebnis der Serumuntersuchung, bei der

therapierte AIH-Probanden beurteilt wurden. Allerdings zeigte die Messung von TNF α mittels ELISA im Zellkulturüberstand, nach T-zellspezifischer Stimulation der PBMC von therapienaiven AIH-Patienten, eine signifikant geringere Konzentration im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Abb. 12B), was ein Hinweis auf TNF α in membrangebundener Form sein könnte und in Abschnitt 4.1.5 näher erörtert wird. Des Weiteren war auch IFN γ im Zellkulturüberstand signifikant geringer konzentriert im Vergleich zur Gesundkontrolle (Abb. 12A), was mit den bisherigen IFN γ -Messergebnissen korreliert. Sowohl die verminderte Expression der T_H1-spezifischen Zytokine *IFNG* und *IL2*, als auch die fehlende IFN γ -Produktion durch PBMC deuten darauf hin, dass die Immunantwort in der Peripherie von AIH-Patienten nicht T_H1-dominiert zu sein scheint. Auch Kawashima *et al.* konnten in einer Kohorte von 25 pädiatrischen AIH-Patienten im Serum kein IFN γ detektieren²³⁰. Jedoch wiesen Kawashima *et al.* eine erhöhte IFN γ / β -Aktin-Ratio auf RNA-Ebene nach, weshalb die Autoren bei der AIH von einer T_H1-dominierten Erkrankung ausgehen²³⁰.

Die bisher vorgestellten Daten bezüglich der T_H-charakteristischen Zytokine bezogen sich auf das PBMC-Kompartiment. Weiterführend wurde deshalb die Expression von IFN γ und TNF α durch CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch überprüft. Im Einklang mit den bisherigen T_H1-spezifischen Daten wiesen in der Peripherie IFN γ ⁺ und IFN γ ⁺TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 14A, E) eine vergleichsweise geringe Frequenz zu TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 14C) auf. Allerdings war die Frequenz der TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen in den AIH-Patienten und Gesundkontrollen vergleichbar hoch. Durch Longhi *et al.* konnte ebenfalls eine geringere Frequenz von IFN γ -produzierenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in AIH-Patienten gemessen werden als in gesunden Kontrollen¹⁶⁶. Parallel zur Untersuchung der CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch die Sekretion der charakteristischen Zytokine IFN γ und TNF α durch CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Dabei werden CD8⁺ T-Zellen, analog den CD4⁺ T-Zellen, in entsprechende Subpopulationen wie T_C1- und T_C17-Zellen untergliedert^{48,49}. Die Auswertung der Daten der CD8⁺ Zellpopulation in den AIH-Patienten zeigte eine höhere Frequenz an IFN γ ⁺ und IFN γ ⁺TNF α ⁺ CD8⁺ T-Zellen verglichen mit der CD4⁺ T-Zellpopulation dieser Patienten (Abb. 14A, B, E, F), jedoch war die Frequenz dieser Zellen vergleichbar hoch mit der der Kontrollprobanden. Einzig die Frequenz der TNF α ⁺ CD8⁺ T-Zellen in der AIH-Kohorte war signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 14D). Auch durch Longhi *et al.* konnte eine erhöhte Frequenz und IFN γ -Produktion von CD8⁺ T-Zellen bei therapienaiven AIH Typ II-Patienten nach antigenspezifischer Stimulation festgestellt werden, was eine Beteiligung der CD8⁺ T-Zellantwort in der AIH-Pathogenese impliziert²¹³. Zusammengefasst zeichneten sich die CD8⁺ T-Zellen der AIH-Patienten durch eine höhere Frequenz IFN γ -sezernierender Zellen aus als die CD4⁺ T-Zellen. Dahingegen war die Frequenz TNF α -sezernierender Zellen innerhalb der CD4⁺- und CD8⁺-Population vergleichbar hoch, aber nur im Falle der CD8⁺ T-Zellen signifikant höher als bei der Gesundkontrolle.

Eine mögliche Funktion von TNF α in der AIH-Pathogenese wird in Abschnitt 4.1.5 eingehender erörtert.

Die qPCR-Untersuchung der T_H1-assoziierten Zytokine bei den intrahepatischen Lymphozyten der AIH-Patienten ergab sowohl bei *IL2*, *IFNG* als auch bei *TNF* eine signifikant höhere Expression als bei den Kontrollen (Abb. 15), was auf einen T_H1-Status dieser Zellen deutet. Weiterführend wurde durchflusszytometrisch die Sekretion von T_H1-spezifischen Zytokinen durch intrahepatische CD4⁺ T-Zellen von AIH-Patienten untersucht und mit der von extrahepatischen CD4⁺ T-Zellen verglichen. Die Daten weisen auf eine Anreicherung zytokinsezernierender CD4⁺ T-Zellen in der Leber hin (Abb. 16A, C, E). Dabei waren die meisten Zellen TNF α ⁺, gefolgt von IFN γ ⁺TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen. Auch IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen scheinen aufgrund des höheren prozentualen Anteils in der Leber eher eine Rolle zu spielen als in der Peripherie. Durch Robinson *et al.* wurde im Mausmodell einer fulminanten AIH gezeigt, dass diese durch die Produktion von IFN γ durch CD4⁺ T-Zellen angetrieben ist²³¹. Des Weiteren wurde auch die intrahepatische CD8⁺ T-Zellpopulation von AIH-Patienten auf die Sekretion von T_C1-spezifischen Zytokine durchflusszytometrisch untersucht und mit den CD8⁺ T-Zellen der Peripherie verglichen. Hier zeigte sich eine Anreicherung von IFN γ ⁺ und IFN γ ⁺TNF α ⁺ CD8⁺ T-Zellen in der Leber, wobei die Frequenz auch gegenüber den intrahepatischen CD4⁺ T-Zellen höher war (Abb. 16A, B, E, F). Dahingegen blieb die Frequenz der TNF α ⁺ CD8⁺ T-Zellen bei den LIL und PBMC der AIH-Patienten gleich, war jedoch im Vergleich zur Frequenz intrahepatischer TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen vermindert (Abb. 16C, D). Im Wesentlichen verweisen die Frequenzanalysen der LIL auf eine mögliche Relevanz von IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen und IFN γ ⁺TNF α ⁺ CD8⁺ T-Zellen, aber auch TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen scheinen eine wesentliche Rolle zu spielen. Es ist bekannt, dass die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen zu einer erhöhten IL-2- und IFN γ -Produktion führt und damit verbunden zu einer Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, die wiederum IFN γ und TNF α sezernieren¹¹¹. Es wird angenommen, dass IFN γ in der Leber zur Hochregulation von MHCI, sowie einer aberranten MHCII-Expression auf Hepatozyten führt; dadurch kommt es zu einer Aktivierung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen, was einen Leberschaden zu Folge haben kann^{111,161,162}. Somit scheinen besonders IFN γ - und TNF α -sezernierenden CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in die AIH-Pathogenese involviert zu sein. In AIH-Patienten korreliert die IFN γ -Expression stark mit der Aktivität der Erkrankung²¹³. Tatsächlich wiesen die hier untersuchten Patienten zur Zeit der Probennahme stark erhöhte ALAT- und ASAT-Werte auf (Tab. 6). Die Rolle von TNF α in der intrahepatischen AIH-Pathogenese wird in Abschnitt 4.1.5 näher erörtert.

4.1.3 Expression und Sekretion T_H17-spezifischer Signaturzytokine

T_H17-Zellen sind stark in die Pathogenese von vielen Autoimmunerkrankungen eingebunden, die vor Entdeckung dieser Subpopulation traditionell als ausschließlich T_H1-vermittelt galten²³². Auch für die

AIH-Pathogenese werden Zellen des T_H17 -Phänotyps als Effektorpopulation diskutiert^{111,163,181,233}. Durch die Bestimmung des T_H17 -assoziierten Zytokins IL-17A im Serum mittels Zytokin-ELISA wurde bei den AIH-Patienten überraschenderweise eine geringere Konzentration nachgewiesen als bei der Kontrollgruppe (Abb. 8). Durch Zhao *et al.* wurde gegensätzlich dazu eine signifikant erhöhte IL-17-Serumkonzentration bei AIH-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gemessen¹⁶³. Dies wurde jedoch nicht durch weitere Studien bestätigt. Auch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in den PBMC der therapie-naïven AIH-Patienten auf RNA-Ebene, dass die Expression von *IL17A* tendenziell niedriger war als in den gesunden Kontrollen (Abb. 17A) und bei sieben der untersuchten AIH-Probanden sogar unter der Detektionsgrenze der qPCR-Messung lag. Ebenso war die Expression von *IL22*, einem weiteren T_H17 -Zytokin, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen vermindert (Abb. 17B). Im Zellkulturüberstand konnte mittels der ELISA-Methode zwar keine geringere IL-17A-Konzentration nach T-zellspezifischer Stimulation der PBMC therapie-naïver AIH-Patienten im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, allerdings waren hier die Konzentrationen beider Gruppen vergleichbar (Abb. 18). Weiterführend konnte in dieser Arbeit auf RNA-Ebene keine signifikant erhöhte Expression der Zytokine *TGFB1* und *IL6* im PBMC-Kompartiment der AIH-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 21). Naïve $CD4^+$ T-Zellen differenzieren in der Gegenwart von IL-6 in Kombination mit TGF β zu T_H17 -Zellen³⁶.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von IL-17A durch extrahepatische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Anzahl der $IL-17A^+ CD4^+$ T-Zellen aus dem PBMC-Kompartiment war in den therapie-naïven AIH-Patienten- und Kontrollproben, verglichen mit der Literatur¹⁶³, gering (Abb. 20A). Somit scheinen, in Korrelation mit den bisherigen T_H17 -spezifischen Ergebnissen, Zellen des T_H17 -Phänotyps im extrahepatischen Raum nicht in die AIH-Immunpathogenese involviert zu sein. Des Weiteren konnten sowohl in der AIH- als auch in der Kontrollgruppe keine $IFN\gamma^+ IL-17A^+ CD4^+$ T-Zellen, also Zellen des T_H1/T_H17 -Phänotyps, durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). $IL-17A^+ CD8^+$ T-Zellen konnten in der Peripherie ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 20B), wodurch eine Beteiligung von T_C17 -Zellen an der AIH-Pathogenese in der Peripherie ausgeschlossen werden kann. Zusammengefasst legen die vorliegenden Daten nahe, dass Zellen des T_H17 - bzw. T_C17 -Phänotyps im peripheren Blut keine entscheidende Rolle haben.

Die qPCR-Untersuchungen T_H17 -assoziiierter Zytokine bei den intrahepatischen Lymphozyten zeigte, dass die mediane Expression von *IL17A* marginal erhöht, *IL22* hingegen schwächer exprimiert war als in den Kontrollen (Abb. 22). Es ist beschrieben, dass aktivierte T_H17 -Zellen unter anderem die Zytokine IL-17 und IL-22 produzieren^{28,32-34}. Durch Liang *et al.* wurde gezeigt, dass IL-22 durch T_H17 -Zellen in größeren Mengen ausgeschüttet wird als durch T_H1 - oder T_H2 -Zellen³². Aus der fehlenden dominanten Expression der T_H17 -assoziierten Zytokine IL-17 und IL-22 könnte man schließen, dass

intrahepatische T_H17 -Zellen keine tragende Rolle in der AIH-Pathogenese einnehmen. Jedoch fallen beim Vergleich der einzelnen AIH-Patientendaten drei Probanden auf, deren LIL sich, im Vergleich zu den anderen sieben Patienten der Kohorte, durch eine stark erhöhte *IL17A*- und *IL22*-Expression auszeichneten (Abb. 22). Dabei handelte es sich um zwei therapienaïve und einen therapierten Patienten, die bezüglich der klinischen Parameter ASAT, ALAT und IgG mediane bis niedrige Werte aufwiesen. Da die LIL dieser Patienten auch eine erhöhte *IL2*-, *IFNG*- und *TNF*-Expression aufwiesen, könnte man hier auf ein kombiniertes T_H1/T_H17 -Effektorprofil schließen. Welche Faktoren die Gegenwart von T_H1 - oder T_H1/T_H17 - bzw. T_H17 -Zellen in den einzelnen AIH-Patienten begünstigen, bleibt ungeklärt. Bezüglich der Expression von *TGFB1* und *IL6*, also der Zytokine, die in Kombination die T_H17 -Differenzierung fördern, waren die drei Patienten unauffällig. Grundsätzlich wurde *TGFB1* in den LIL der AIH-Patienten im gleichen Ausmaß exprimiert wie in den Kontrollen (Abb. 24A), genau wie es auch schon bei den PBMC beobachtet wurde (Abb. 21A). Jedoch zeigte *IL6* median eine höhere Expression, die jedoch nicht signifikant war (Abb. 24B). Durch Zhao *et al.* konnte bei AIH-Probanden mittels qPCR neben einer erhöhten *IL-17/GAPDH*- ebenfalls eine gesteigerte *IL-6/GAPDH*-Ratio im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden¹⁶³. Jedoch wurden diese Analysen im Gesamtlebergewebe durchgeführt und nicht in LIL.

Zusätzlich wurde die Sekretion des T_H17 -spezifischen Zytokins IL-17A durch intrahepatische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen von AIH-Patienten durchflusszytometrisch untersucht und mit der von extrahepatischen $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen verglichen. Die Daten weisen auf eine Anreicherung zytokinsezernierender T-Zellen in der Leber hin (Abb. 23). So konnte bezüglich der $CD4^+$ T-Zellen eine signifikant höhere IL-17A-Sekretion durch LIL als durch PBMC detektiert werden (Abb. 23A), jedoch war der prozentuale Anteil der IL-17A-sezernierenden $CD4^+$ LIL wesentlich geringer im Vergleich zu den $IFN\gamma$ - und $TNF\alpha$ -sezernierenden $CD4^+$ LIL (Abb. 16A, C, D). Oo *et al.* zeigten ebenfalls eine erhöhte Frequenz leberinfiltrierender T_H17 -Zellen in AIH-Patienten, hier im Vergleich zur gesunden Leber¹⁸¹, dennoch war die T_H17 -Frequenz mit ca. 2 % auch hier relativ gering. Darüber hinaus konnten in der AIH- und Kontrollgruppe keine $IFN\gamma/IL-17A$ -koproduzierenden $CD4^+$ T-Zellen des T_H1/T_H17 -Phänotyps durchflusszytometrisch detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit weist die Mehrheit der LIL in AIH-Patienten eher ein T_H1 - als T_H17 -Profil auf. Des Weiteren konnten in der Leber von AIH-Patienten kaum $IL-17A^+ CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23B). Auch Oo *et al.* zeigten, dass in der Leber von AIH-Patienten weniger T_C17 - als T_H17 -Zellen zu finden sind¹⁸¹. Somit scheinen IL-17A-sezernierenden Zellen in der Leber, zumindest numerisch, nicht oder lediglich zu einem geringen Teil an der AIH-Pathogenese beteiligt zu sein.

4.1.4 Expression und Sekretion T_H2-spezifischer Signaturzytokine

T_H2-Zellen induzieren die Antikörperproduktion durch B-Zellen¹. Da die AIH unter anderem durch Gegenwart von Autoantikörpern gekennzeichnet ist, wurde auf RNA-Ebene die Expression T_H2-assoziiierter Zytokine in der Peripherie untersucht. Sowohl *IL4* als auch *IL13* wurden durch die PBMC der therapienaiven AIH-Patienten nicht stärker exprimiert als in den gesunden Kontrollen, einzig *IL10* zeigte eine höhere Expression (Abb. 25). IL-10 ist ein pleiotropes, immunregulatorisches Zytokin, das zum Schutz des Organismus vor infektionsassoziierten Immunpathologien, Allergien und Autoimmunerkrankungen beiträgt²³⁴. Es wurde ursprünglich als T_H2-spezifisch beschrieben²² und deswegen in der vorliegenden Arbeit den T_H2-charakterisierenden Zytokinen zugeordnet. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass die IL-10-Produktion ebenso mit der Antwort von regulatorischen T-Zellen assoziiert ist²³⁵⁻²³⁷. So sezernieren Tr1-Zellen viel IL-10, moderate Mengen an TGFβ, wenig IL-5 und IFNγ, sowie kein IL-2 oder IL-4^{238,239}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine stark erhöhte *IL10*-Expression (Abb. 25B), marginal erhöhte *TGFB1*-Expression (Abb. 21A), sowie reduzierte *IL2*- und *IFNG*-Expression (Abb. 11A, B) in den PBMC der AIH-Probanden verglichen mit den Gesundkontrollen und könnten so einen Hinweis auf das Vorhandensein von Tr1-Zellen im PBMC-Kompartiment der Patienten geben. Es erscheint widersprüchlich, dass eine suppressiv wirkende regulatorische T-Zellpopulation bei Patienten mit autoimmunen Erkrankungen detektierbar ist. Tatsächlich postulierten diverse Studien ein Versagen der Immunregulation aufgrund einer numerischen und funktionellen Beeinträchtigung von CD4⁺CD25⁺T_{reg}¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Im Gegensatz dazu wurde durch Peiseler *et al.* gezeigt, dass zirkulierende T_{reg} weder in Funktion noch Frequenz beeinträchtigt sind¹⁶⁹. Dennoch bleibt eine Beteiligung von Tr1-Zellen an der AIH-Pathogenese aufgrund der hier vorgestellten Daten spekulativ und sollte in nachfolgenden Studien näher untersucht werden. Mittlerweile ist bekannt, dass fast alle Zellen des innate und adaptiven Immunsystems IL-10 produzieren, also auch CD8⁺ T-Zellen, T_H1- und T_H17-Zellen^{234,236,240-242}. Aufgrund dessen sollte in weiteren Studien geklärt werden, welche Zellen des PBMC-Kompartiments von AIH-Patienten im speziellen die IL-10-Produzenten sind. Zusammengefasst legen die Expressionsprofile der T_H2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 bei therapienaiven AIH-Patienten nahe, dass T_H2-Zellen keine tragende Funktion in der AIH-Immunpathogenese in der Peripherie zu haben scheinen.

Dagegen konnte durch die qPCR-Untersuchungen der T_H2-assoziierten Zytokine in den LIL von AIH-Patienten, neben einer erhöhten *IL10*-Expression, auch eine stärkere Expression von *IL4* und *IL13* nachgewiesen werden als in den Kontrollen (Abb. 26). Auch in einer Studie von Schlaak *et al.* wurde auf ein erhöhtes Vorkommen von IL-4-produzierenden T-Zellen in der Leber von AIH-Patienten verwiesen¹⁵⁰. Die Daten der vorliegenden Arbeit bezüglich der Genexpressionsanalysen T_H2-assoziiierter Zytokine in den LIL von AIH-Patienten unterstützen somit die Hypothese, dass T_H2-Zellen

in der Leber die B-Zellmaturierung unterstützen, sowie die daraus folgenden Autoantikörperproduktion (Abb. 4)^{111,148}.

4.1.5 Der Tumornekrosefaktor α in der Autoimmunen Hepatitis

TNF α ein ist Zytokin mit pleiotropen Funktionen in der Immunantwort, das durch Makrophagen und T-Zellen sezerniert wird⁸. Lokal führt die TNF α -Freisetzung zur Eindämmung von Infektionen durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität und daraus resultierender Förderung der Migration von Entzündungszellen^{243,244}; systemisch wirkt es fieberauslösend²⁴⁵ und ist im Rahmen einer Sepsis an der Schockreaktion beteiligt²⁴⁶⁻²⁴⁸. In der Leber führt TNF α zur Bildung von Akute-Phase-Proteinen, die im frühen Stadium einer Infektion an der Abwehr beteiligt sind^{1,8,249}, scheint aber auch am regenerativen Prozess beteiligt zu sein^{250,251}. *TNF* ist eines der ersten Gene, das nach T-Zellaktivierung transkribiert wird²⁵². Primär führt die Produktion von TNF α durch T_H1-Zellen und CTL am Ort der Entzündung zur Aktivierung von Makrophagen und im Falle der CTL zur Induktion von Apoptose^{8,253,254}. TNF α als Entzündungsfaktor wird auch mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, die eine chronisch-entzündliche Komponente ausweisen. So ist eine TNF α -Überexpression bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Rheumatoider Arthritis (RA) und Vaskulitis detektiert worden^{8,255}. Erhöhte TNF α -Konzentrationen korrelieren auch mit der Schwere der hepatischen Inflammation und Fibrose²⁵⁶⁻²⁵⁸. So wurde eine Assoziierung zwischen der AIH Typ I und dem TNFA*2-Allel beschrieben²⁵⁹⁻²⁶¹, welches mit einem hohen induzierbaren und konstitutiven TNF α -Spiegel in Verbindung steht²⁶².

Von den T_H1-assoziierten Zytokinen fiel innerhalb des PBMC-Kompartiments einzig TNF α durch eine erhöhte Konzentration im Blutserum auf (Abb. 7B). Dies bestätigt das Ergebnis vorheriger Studien in Serum und Plasma^{263,264}. Hierbei wurde aber auch darauf verwiesen, dass, je nach zirrhotischem Zustand der Leber, der erhöhte Zytokinspiegel eine Folge der hepatischen Dysfunktion und nicht der entzündlichen Erkrankung sein kann. Dennoch zeigten auch die PBMC der AIH-Probanden in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte *TNF*-Expression (Abb. 11C), sezernierten aber nach unspezifischer Stimulation weniger TNF α in den Zellkulturüberstand als die gesunden Kontrollen (Abb. 12B). Dies könnte darauf hindeuten, dass TNF α in membrangebundener Form (mTNF α) vorliegt. Durch Horiuchi *et al.* konnte auch beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) eine erhöhte Expression von mTNF α auf aktivierten peripheren CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden²⁶⁵. Des Weiteren kann die Expression von mTNF α auf aktivierten CD4⁺ T-Zellklonen über kostimulatorische Signale die Antikörperproduktion durch B-Zellen unterstützen²⁶⁶. Bei der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn wurde mTNF α als potentieller Marker für anti-TNF-Therapieresponder beschrieben, da mTNF α vor allem durch Makrophagen in der *Lamina propria* des

Darms und CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, welche eine tragende Rolle in der Pathogenese haben²⁶⁷. Ob und inwieweit mTNF α eine Rolle in der AIH spielt, bedarf weiterer Analysen.

Weiterhin zeigten die Untersuchungen der PBMC von AIH-Patienten, dass von den T_H1-assoziierten Zytokinen einzig die Genexpression von *TNF* im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht war (Abb. 11C). Zusätzlich zeigte sich, dass die Frequenz TNF α -sezernierender CD8⁺ T-Zellen in AIH-Patienten signifikant höher war (Abb. 14D). Auch die TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen wiesen den gleichen prozentualen Anteil auf, waren aber mit dem der Gesundkontrollen vergleichbar (Abb. 14C). In der Leber zeigte sich, wie in der Peripherie, eine signifikant erhöhte *TNF*-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15C). Des Weiteren war die Frequenz der intrahepatischen TNF α ⁺ CD8⁺ T-Zellen vergleichbar mit der der extrahepatischen Zellen in den AIH-Patienten (Abb. 16D), jedoch zeigte sich bei den intrahepatischen TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen eine tendenzielle Erhöhung in der Frequenz im Vergleich zur Peripherie (Abb. 16C). Im Wesentlichen fielen in den AIH-Patienten also vor allem TNF α ⁺ CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie und TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Leber durch eine erhöhte Frequenz auf. Im Normalzustand spielt TNF α in der Leber eine dichotome Rolle und induziert auf der einen Seite die Apoptose von Hepatozyten und vermittelt die Produktion von Entzündungsmediatoren, fördert aber auf der anderen Seite auch die Hepatozytenproliferation und Leberregeneration²⁶⁸. Auch ist TNF α in die Pathophysiologie verschiedener immunologisch medierter hepatischer Erkrankungen involviert. Zum derzeitigen Punkt ist jedoch noch unklar, ob TNF α eine kritische Rolle in der AIH-Entwicklung einnimmt²⁶⁹. Die Daten dieser Arbeit deuten aber auf eine tragende Rolle von TNF α in der AIH-Pathogenese von therapienaïven AIH-Patienten in Peripherie und Leber hin. Durch Iwamoto *et al.* wurde im Mausmodell einer fatalen AIH gezeigt, dass TNF α unverzichtbar für die Entwicklung einer AIH ist²⁶⁹. Außerdem unterstützen die vorliegenden Daten, den von Liberal *et al.* vorgeschlagenen mutmaßlichen Pathomechanismus in Bezug auf die TNF α -Sekretion von intrahepatischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4)^{111,148}. Auch T_H17-Zellen können Autoimmunität durch die Produktion von TNF α unterstützen^{111,163}, jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf eine erhöhte Frequenz von IL-17- und IL-22-sezernierenden Zellen in Peripherie und Leber gefunden (Abschnitt 4.1.3). T_H17-Zellen werden mit verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Jedoch sind sie im Vergleich zu T_H1-Zellen selten in den Entzündungsstellen zu finden und ein möglicher Grund hierfür ist, dass TNF α die Konversion von T_H17-Zellen zu nichtklassischen T_H1-Zellen begünstigt²⁷⁰.

Die Standardtherapie von AIH-Patienten erfolgt in der Regel mit Glukokortikoiden. Diese können die Produktion verschiedener Zytokine inhibieren, unter anderem von IFN γ und TNF α ²⁷¹. Jedoch kommt es bei längerfristiger systemischer Anwendung zu starken Nebenwirkungen, wie einem Cushing-Syndrom, Schwächung der Immunabwehr, aber auch Entstehung bzw. Verstärkung von Diabetes mellitus und anderen^{128,132,133}. Zusätzlich sprechen 20 % der AIH-Patienten nicht auf eine Therapie mit

Glukokortikoiden an¹³³, so dass die Identifizierung neuer Therapiemöglichkeiten erstrebenswert ist. Mittlerweile gibt es klinische Erfahrungen mit anti-Zytokin-Therapien, vor allem mit anti-TNF α bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und RA¹⁰⁷. Durch Weiler-Normann *et al.* konnte auch eine erfolgreiche *Off-Label*-Therapie mit anti-TNF α bei einem schwer zu behandelndem AIH-Fall durchgeführt werden²⁷² und wird deswegen als neue Therapiemöglichkeit diskutiert²⁷³. Auch die hier vorgestellten Daten bezüglich der erhöhten Expression und Sekretion von TNF α bei therapienaiven AIH-Patienten deuten auf eine Relevanz dieser Therapievariante.

4.1.6 Expression von Chemokinrezeptoren und Chemokinen

Die Genexpression der Chemokinrezeptoren und Chemokine durch PBMC von therapienaiven AIH-Patienten wurde mittels qPCR untersucht. Bezüglich CXCR3 zeigte sich bei den Patienten median eine geringere Expression als bei den gesunden Kontrollen (Abb. 27A). Dies scheint widersprüchlich, da CXCR3 hauptsächlich durch aktivierte T-Zellen exprimiert wird^{207,274}. Somit könnte die verminderte CXCR3-Expression ein Hinweis darauf sein, dass die T-Zellen in der Peripherie von AIH-Patienten nicht verstärkt aktiviert sind. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass die PBMC auch weniger *IL2* exprimierten (Abb. 11A), ein Zytokin, das ebenfalls von aktivierten T-Zellen produziert wird und autokrin deren Proliferation und Differenzierung fördert^{8,275}. Des Weiteren wurde durch Erhardt *et al.* gezeigt, dass CXCR3-defiziente Mäuse nach Concanavalin A (ConA)-induzierter Hepatitis einen schwereren Leberschaden entwickelten als die CXCR3-exprimierenden Wildtypkontrollen²⁷⁶. Die Injektion des Lektins ConA induziert in Mäusen eine durch aktivierte T-Zellen vermittelte Leberschädigung, die als Modell einer humanen Leberentzündung gilt und der AIH ähnelt²⁷⁷⁻²⁷⁹. Erhardt *et al.* zeigten, dass CXCR3 ebenso eine protektive Funktion in einem akuten immunvermittelten Leberschaden haben kann, da auch regulatorische T-Zellen CXCR3 exprimieren, welche in die Leber rekrutiert werden, um einer Leberschädigung entgegenzuwirken²⁷⁶. Eine weitere Erklärung für die verminderte CXCR3-Expression in den AIH-Patienten mit akuter Leberschädigung könnte sein, dass die Anzahl CXCR3-exprimierender regulatorischer T-Zellen vermindert ist. CXCR3 wird in Kombination mit CCR5 durch T_H1- sowie T_C1-Zellen^{24,188-190,280} und mit CCR6 durch T_H17- bzw. T_C17-Zellen exprimiert^{24,181}. In Korrelation mit der geringeren CXCR3-Expression, war auch die Expression von CCR5 und CCR6 in der AIH-Kohorte vermindert, im Falle von CCR6 signifikant (Abb. 27). Ergänzend dazu wurden qPCR-Untersuchungen in LIL durchgeführt. Im Wesentlichen deckten sich die Ergebnisse der LIL mit denen der PBMC, außer dass in den LIL eine vergleichbare CXCR3-Expression bei AIH-Patienten und Kontrollen gemessen wurde (Abb. 30). Betrachtet man im Speziellen die einzelnen Expressionsniveaus der beiden Rezeptoren CCR5 und CCR6 in den PBMC und LIL der AIH-Patienten, konnte insgesamt eine deutlich höhere Expression des T_H1-assozierten CCR5 gemessen werden als des T_H17-assozierten CCR6, wodurch man eher auf einen T_H1- bzw. T_C1- als

T_H17- bzw. T_C17-Status der Zellen schließen könnte. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass aktivierte Effektor-T-Zellen, die die chronisch entzündete Leber von Hepatitis C-Patienten infiltrieren, unter anderem CXCR3 und CCR5 exprimieren¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Jedoch konnte auch im Mausmodell der ConA-induzierten Hepatitis gezeigt werden, dass bei CCR5-Defizienz alternativ CCR1⁺ Lymphozyten für eine Hepatitisentwicklung verantwortlich sein können^{277,281}. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse aufgrund der höheren Expression von CCR5 im Vergleich zu CCR6 vermuten, dass die extra- und intrahepatischen Zellen eher einen T_H1- bzw. T_C1-Status haben. Dies würde die bisherigen Daten des extra- und intrahepatischen T-Zellprofils von AIH-Patienten unterstützen. Jedoch zeigen die Ergebnisse auch, dass es einer erweiterten Untersuchung des Chemokinrezeptorprofils bedarf.

Weiterführend wurde gezeigt, dass in den AIH-Patienten die Expression der proinflammatorischen CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 im Vergleich zur Kontrolle um ein Vielfaches erhöht war, im Falle der beiden erstgenannten Liganden sogar signifikant (Abb. 28). Ebenso wiesen auch die intrahepatischen Zellen verglichen mit der Kontrolle eine erhöhte CXCL9-, CXCL10- und CXCL11-Expression auf (Abb. 31). Diese Chemokine werden nicht konstitutiv exprimiert, sondern in Gegenwart eines proinflammatorischen Zytokinmilieus aufreguliert und sind für die Rekrutierung von T-Zellen zum Ort der Entzündung verantwortlich²⁸². Durch Curbishley *et al.* konnte gezeigt werden, dass die CXCR3-Liganden sowohl für die Adhäsion als auch Transmigration von Effektor-T-Zellen durch das hepatische Endothel aus dem Blutstrom wichtig sind¹⁷⁶. Die Liganden werden unter anderem von innate Immunzellen produziert¹⁷³ und sind durch die T_H1-Zytokine IFN γ und TNF α induzierbar^{24,178,179}. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die Serumspiegel von CXCL9 und CXCL10 in AIH-Patienten signifikant erhöht sind und nach erfolgreicher Therapie auf das Niveau gesunder Kontrollen sinken^{283,284}. Im speziellen CXCL10 kann durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sezerniert werden und wird funktionell als T_H1-Chemokin kategorisiert^{182,285}. In der vorliegenden Arbeit zeichnete sich vornehmlich CXCL10 in LIL durch eine stark erhöhte Expression aus (Abb. 31B). Aufgrund der zentralen Rolle von CXCL10 in verschiedenen inflammatorischen Lebererkrankungen, gilt es als mögliches Ziel moderner Therapien^{182,285}. Ob CXCL11 in der AIH-Pathogenese eine Rolle spielt, ist soweit nicht beschrieben, jedoch lassen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse der erhöhten extra- und intrahepatischen Expression dies vermuten.

CCL5 ist ein Chemokinligand, der von verschiedenen Zelltypen wie T-Zellen, Makrophagen oder Endothelzellen produziert wird^{8,286}. Die Expression des CCR5-Liganden CCL5 war in den PBMC der AIH-Kohorte signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Abb. 29). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass in der Peripherie der AIH-Patienten weniger T_H1- bzw. T_C1-rekrutierende Zellen zu finden sind. Eine weitere Vermutung ist, dass CCL5 in der AIH nicht durch Zellen der Peripherie exprimiert wird. CCL5 wird aber auch von T-Zellen im aktivierten Zustand ausgeschüttet, wohingegen naive

T-Zellen keine CCL5-RNA gespeichert haben^{287,288}. Somit könnte die fehlende CCL5-Expression auch ein Hinweis darauf sein, dass die T-Zellen in der Peripherie nicht aktiviert waren und korreliert mit der verminderten Expression von CXCR3 (Abb. 27A), welcher ebenso auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird^{207,274}. Allerdings zeigte CCL5 auch intrahepatisch eine schwächere Expression als in der Kontrollgruppe (Abb. 32). CCL5 gilt auch als proinflammatorisches Chemokin mit profibrotischen Eigenschaften, das die Infiltration von Immunzellen in die Leber erhöht¹⁹¹⁻¹⁹³. Deshalb scheint eine geringe Expression vor allem in der Leber verwunderlich, korreliert jedoch auch mit der geringeren CCR5-Expression in AIH-Patienten verglichen mit den Kontrollen. Allerdings ist das Chemokinsystem durch Redundanz der Chemokinexpression und Promiskuität der Ligand/Rezeptor-Bindung gekennzeichnet, d.h. die meisten Rezeptoren binden mehr als einen Liganden und viele Liganden wirken auf verschiedenen Rezeptoren^{174,206}. So sind CCL3 und CCL4 ebenfalls Liganden von CCR5, aber auch von CCR1^{24,206,289,290} deren differenzielle Expression in weiteren Studien evaluiert werden sollte.

4.1.7 Expression von Kolonierstimulierenden Faktoren und zytotoxischen Molekülen

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren unterstützen die Entwicklung und Proliferation von Knochenmark-Vorläuferzellen und myeloiden Zellen^{64,209}. So induziert M-CSF die Differenzierung zu Monozyten und Makrophagen. Es wird konstitutiv im Knochenmark, durch Endothelzellen, Fibroblasten und mononukleäre Phagozyten produziert, wirkt lokal und ist deshalb nicht in der Zirkulation zu finden^{64,210}. Durch GM-CSF differenzieren die Zellen zu neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Dieser CSF wird primär durch aktivierte T-Zellen, Stromazellen und Makrophagen sezerniert und seine Wirkung beschränkt sich auf die unmittelbare Umgebung, so dass er ebenso wie M-CSF nicht im Blut zirkuliert⁶⁴. Ursprünglich wurden CSF durch ihre entwicklungs- und wachstumsfördernden Eigenschaften definiert. Mittlerweile ist bekannt, dass sie vermehrt bei Entzündungen und autoimmunen Erkrankungen zu finden sind, wie in Patienten mit RA²¹⁰. Auch konnte GM-CSF als T-Zellzytokin identifiziert werden, das entscheidend an der Pathogenese der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis beteiligt ist²⁹¹⁻²⁹³. Auf RNA-Ebene wurde mittels qPCR die Genexpression von CSF1 (M-CSF) und CSF2 (GM-CSF) in den LIL von AIH-Patienten untersucht. Dabei zeigten CSF1 und vor allem CSF2 eine signifikant stark erhöhte Expression (Abb. 33). Diese Daten lassen eine mögliche, vielleicht pathogene Rolle der beiden CSF im intrahepatischen Milieu der AIH vermuten. Campell *et al.* zeigten in einem Mausmodell der RA, dass M-CSF proinflammatorische Eigenschaften aufweist und notwendig für die Krankheitsentwicklung ist²⁹⁴. Durch Noster *et al.* konnte in der Multiplen Sklerose (MS) eine pathologische Rolle von GM-CSF im entzündeten Gehirngewebe gezeigt werden und eine Verbindung der GM-CSF-Produktion mit T_H1-Zellen²¹¹. In der vorliegenden Arbeit wurde, aufgrund der Expression und Sekretion charakteristischer

Zytokine, den intrahepatischen Zellen der AIH-Patienten eher ein T_H1 - als T_H17 -Profil zugewiesen (Abschnitt 4.1.2, Abschnitt 4.1.3). Auch das Ergebnis der erhöhten *CSF2*-Genexpression deutet weiterhin auf einen dominierenden T_H1 -Phänotyp der LIL in den AIH-Probanden hin. Inwieweit welche CSF auf Proteinebene durch welche T-Zellpopulationen synthetisiert werden, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Sowohl bei der RA als auch Asthma konnte ein therapeutischer Nutzen durch Depletion von GM-CSF festgestellt werden, was dessen pathogene Rolle unterstreicht^{211,295,296}. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Inhibierung von GM-CSF eine therapeutische Strategie für viele Autoimmun- und Entzündungserkrankungen darstellt^{297,298}.

Die AIH ist gekennzeichnet durch lymphozytäre Zellinfiltrationen und damit einhergehender Zerstörung des Leberparenchyms^{109,112,148,299}. Zur Evaluierung des zytotoxischen Potentials der intrahepatischen Lymphozyten von AIH-Patienten wurde die Genexpression der zytolytischen Proteine *GNLY* (Granulysin), *GZMB* (Granzym B) und *PRF1* (Perforin) mittels qPCR untersucht. Vor allem *GZMB* zeichnete sich durch eine signifikant erhöhte Expression in den LIL der AIH-Patienten im Vergleich zur Kontrolle aus, aber auch *GNLY* und *PRF1* wurden stärker exprimiert (Abb. 34). Zytotoxische Aktivitäten werden in der adaptiven Immunantwort vor allem $CD8^+$ und selten $CD4^+$ T-Zellen zugeschrieben⁸. Nichtsdestotrotz konnten zytotoxische $CD4^+$ T-Zellen im PBMC-Kompartiment von Patienten mit chronischen viralen Infektionen identifiziert werden, unter anderem viralen Hepatitiden^{61,300}. $CD4^+$ T-Zellen mit zytotoxischem Charakter sind häufig aufgrund der Produktion von $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-2 als T_H1 -ähnlich beschrieben^{62,301-306}, jedoch ist die Expression dieser Zytokine nicht notwendig für ihre zytotoxische Funktion³⁰⁷⁻³¹⁰. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LIL von AIH-Patienten eine erhöhte *IL2*-, *IFNG*- und *TNF*-Expression aufwiesen (Abb. 15) sowie eine erhöhte Frequenz an $IFN\gamma$ - und $TNF\alpha$ -produzierenden $CD4^+$ T-Zellen in der Leber nachgewiesen werden (Abb. 16). Dahingehend ist nicht auszuschließen, dass in der AIH $CD4^+$ T-Zellen ein zytotoxisches Potential besitzen. Bei den Expressionsanalysen der zytolytischen Proteine im intrahepatischen Kompartiment der AIH-Patienten wurde nicht zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterschieden. Es sollte also weiterführend geklärt werden, welche Zellen in der Leber von AIH-Patienten einen zytotoxischen Charakter aufweisen. Zusammengefasst scheinen die LIL der AIH-Patienten aufgrund der erhöhten Genexpression zytolytischer Komponenten eine zytotoxische Kapazität aufzuweisen. Weiterführende Analysen sollten klären, welche Zellen in der Leber von AIH-Patienten die zytolytischen Proteine produzieren und deren zytotoxisches Potential in entsprechenden Tests evaluiert werden.

4.2 Das Expansionsprofil leberinfiltrierender Lymphozyten von AIH-Patienten

Die Rolle von T-Zellen bei Entstehung und Aufrechterhaltung der AIH ist bisher nur teilweise verstanden. Man nimmt an, dass der Leberschaden durch eine Immunreaktion von autoreaktiven

T-Zellen gegen Selbstantigene ausgelöst wird^{111,148}. Bisher konnten CYP2D6 in ca. 10%^{138,149,214} und SepSecS in ca. 20% der Patienten^{145,152,215} als Autoantigene in der AIH identifiziert werden, dennoch sind bei ca. 70 % der AIH-Patienten mutmaßliche Autoantigene unbekannt. Es wird angenommen, dass leberinfiltrierende T-Zellen, die vorwiegend zu den CD4⁺ T_H-Zellen gehören und einen $\alpha\beta$ -TCR tragen, an der Immunpathogenese der AIH beteiligt sind^{150,223,227}. Dennoch ist unbekannt, ob die Leberentzündung in der AIH durch einen spezifischen Stimulus bedingt ist oder durch eine Bystander-Hepatitis, bei der es zu einer unspezifischen Rekrutierung und Aktivierung von inflammatorischen Zellen in die Leber kommt^{275,311}. Hierüber kann die Analyse des TCR von leberinfiltrierenden T-Zellen Aufschluss geben. Ein limitiertes TCR-Repertoire spiegelt aufgrund der klonalen Expansion einzelner antigenspezifischer T-Zellen einen antigengetriebenen Prozess wider, während ein heterogenes Repertoire auf den Bystander-Effekt schließen lässt³¹².

Aufgrund der Vielzahl zu bekämpfender pathogener Strukturen weisen T-Zellen ein TCR-Repertoire von theoretisch ca. 10^{18} verschiedenen Antigenspezifitäten auf⁸, wobei jede T-Zelle in der Regel zwischen $1 \cdot 10^4$ und $3 \cdot 10^4$ identische Kopien eines einzelnen TCR auf ihrer Oberfläche trägt⁶⁴. Zur Untersuchung der Diversität des TCR-Repertoires von leberinfiltrierenden T-Zellen in AIH-Patienten wurden die Oberflächenmarker CD4 und CD8 sowie die V β -Ketten des TCR durchflusszytometrisch analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden von 131 expandierten T-Zellkulturen 86 als potentiell klonal eingestuft, davon 41 als CD4⁺ und 45 als CD8⁺ T-Zellpopulationen (Abb. 37A). Dies steht im Kontrast zu der Aussage von Schlaak *et al.*, die vorwiegend CD4⁺ T-Zellklone (190/255 Klone) aus der Leber von AIH-Patienten isolieren konnten¹⁵⁰. Dies könnte allerdings mit dem Ort der Biopsieentnahme aus der Leber und der Verteilung der darin residierenden Lymphozyten zusammenhängen. Bei den Biopsien handelt es sich um kleine Gewebefragmente, welche aufgrund ihrer Größe nur einen Bruchteil der LIL-Zusammenstellung widerspiegeln. Es ist gezeigt, dass in der AIH Typ I CD4⁺ T-Zellen vornehmlich in den portalen Bereichen und CD8⁺ T-Zellen in den periportalen Bereichen der Leber zu finden sind²⁰². Tatsächlich konnten auch in der vorliegenden Arbeit bei zwei Patienten ausschließlich CD4⁺ T-Zellklone generiert werden, während bei zwei weiteren Patienten vornehmlich CD8⁺ und weniger CD4⁺ T-Zellklone expandiert wurden.

Die Untersuchung des TCR V β -Repertoires erfolgte mithilfe eines durchflusszytometrisch-basierten Fertigsystems, durch welches 24 verschiedene TCR V β -Spezifitäten nachgewiesen werden konnten. Von den als klonal eingestuften T-Zellkulturen konnten bei 15 CD4⁺ und bei 25 CD8⁺ Kulturen keine spezifische V β -Kette (V β -Ak⁻) durchflusszytometrisch detektiert werden (Abb. 37B). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass das Fertigsystem nur ca. 70 % des normalen humanen TCR V β -Repertoires der CD3⁺ Lymphozyten abdeckt. Auch könnte es sich um T-Zellen mit einem $\gamma\delta$ -TCR handeln, welche ebenfalls in die AIH-Pathogenese involviert sind^{107,111,313}. Sato *et al.* konnten zeigen, dass in der Leber ca. 60 % der $\gamma\delta$ -T-Zellen CD4⁺CD8⁻ sind und die restlichen 40 % den CD8⁻ nicht aber den CD4⁻

Korezeptor exprimieren³¹⁴. Weiterführend konnte durchflusszytometrisch bei 26 der CD4⁺ und bei 20 der CD8⁺ Kulturen eine spezifische V β -Kette (V β -Ak⁺) nachgewiesen werden (Abb. 37B). Dabei war die V β -Familie Vb 8 am häufigsten repräsentiert, durch insgesamt acht T-Zellklone in vier der vier untersuchten AIH-Probanden, gefolgt von je fünf Vb 2⁺ und Vb 17⁺ T-Zellklonen in drei der vier untersuchten Patienten (Abb. 37C). Die Resultate vorheriger Studien sind teilweise kontrovers. So wurde durch Arenz *et al.* mittels Durchflusszytometrie eine Überexpression von TCR V β 3 und V β 13.1 in AIH-Patienten gezeigt, jedoch wurde die Klonalität der T-Zellen nicht dokumentiert³¹⁵. Yoshizawa *et al.* konnten mittels des CDR3-Spectratypings die Expression von TCR V β 2, V β 3, V β 4, V β 16 oder V β 22 in zwei und mehr Patienten feststellen und von TCR V β 4 in fünf Fällen³¹⁶. Die *complementarity determining region* (CDR)3 ist Bestandteil beider TCR-Ketten und für die Bindung des antigenen Peptids an den TCR verantwortlich. Aufgrund der hohen Variabilität der CDR3-Region in Länge und Zusammensetzung wird das TCR CDR3-Spectratyping zur Überprüfung der Klonalität von expandierten T-Zellen verwendet und für TCR-Repertoireanalysen herangezogen. Hoshino *et al.* wies mit der gleichen Methode ebenfalls die Expression von TCR V β 3 in allen vier untersuchten Patienten nach³¹⁷. Dagegen wurde durch Löhr *et al.* in verschiedenen Patienten unter anderem eine Überexpression von V β 2- und V β 17-, V β 8- und V β 17- bzw. V β 1- und V β 18-spezifischen PCR-Produkten gemessen³¹⁸, was mit den Daten dieser Arbeit zum Teil korreliert. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine eingeschränkte Expression von Vb 8, Vb 2 und Vb 17 sowohl durch CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen (Abb. 37C). Dies lässt somit einen antigengetriebenen Prozess der Leberschädigung in der AIH vermuten, unabhängig vom phänotypischen und funktionellen Status der leberinfiltrierenden T-Zellen. Durch Arenz *et al.* wurden PBMC aus AIH-Patienten und gesunden Probanden hinsichtlich ihres TCR V β -Repertoires analysiert^{216,315}. Dabei konnten sie keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung einzelner TCR V β -Ketten bei Gesunden und AIH-Patienten zeigen, was wiederum auf eine polyklonale T-Zellverteilung im Blut verweist. Zusammengefasst deuten die durchflusszytometrischen Analysen der TCR V β -Ketten in der vorliegenden Arbeit, aber auch die Daten der Literatur auf ein eingeschränktes TCR V β -Repertoire in der Leber von AIH-Patienten hin, was auf eine antigengetriebene AIH-Pathogenese verweist.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

4.3.1 Das T-Zellprofil von AIH-Patienten

Anhand der Untersuchungen des gesamten PBMC-Kompartiments von therapienaiven AIH-Patienten bezüglich der Expression von T_H1-, T_H17- und T_H2-assoziierten Zytokinen auf RNA-Ebene konnte keine dominierende Effektorzellpopulation in der Peripherie identifiziert werden. Jedoch zeichneten sich die Zellen in ihrer Gesamtheit vor allem durch eine signifikant erhöhte *TNF*-Expression aus, aber auch *IL10* war erhöht. Dahingegen waren *TGF β* und *IL4* im gleichen Maße und *IFNG*, *IL2*, *IL17A*, *IL22*, *IL6*

und *IL13* verglichen zur Kontrollgruppe niedriger exprimiert. Außerdem geben die Daten erste Hinweise darauf, dass vor allem Zellen mit T_H17 - und T_H2 -Profil keine tragende Rolle in der Peripherie von AIH-Patienten zu haben scheinen. Des Weiteren verweisen die Daten auf eine mögliche Implikation von Tr1-Zellen, welche sich durch Sekretion von großen Mengen IL-10, moderaten Mengen an TGF β , wenig IL-5 und IFN γ , sowie kein IL-2 oder IL-4 auszeichnen^{238,239}. Inwieweit und ob diese regulatorische Zellpopulation tatsächlich in die AIH-Pathogenese involviert ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Da es sich bei PBMC um ein Gemisch verschiedener Zellen handelt, wurde weiterführend die Expression von T_H1 - und T_H17 -assoziierten Zytokinen, im speziellen auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, untersucht. Prinzipiell konnte in therapienaïven AIH-Patienten eine numerische Verschiebung zugunsten der $CD4^+$ T-Zellen festgestellt werden. Des Weiteren konnte sowohl bei den $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen eine hohe Frequenz von TNF α -sezernierenden Zellen gemessen werden, im Falle der $CD8^+$ T-Zellen sogar signifikant mehr als in der Kontrolle. Dagegen war die Frequenz von IL-17A⁺ bzw. IFN γ^+ IL-17A⁺ $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen gering bis nicht nachweisbar, was eine Implikation von T_H17 -Zellen in der Peripherie von AIH-Patienten ausschließt.

Die Genexpressionsstudien der LIL zeigten bezüglich der T_H1 -assoziierten Gene eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen die Gene der T_H17 -assoziierten Zytokine keine erhöhte Expression aufwiesen. Auch auf Proteinebene zeichneten sich leberinfiltrierende $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen durch eine erhöhte IFN γ - und TNF α -Sekretion im Vergleich zur Peripherie von AIH-Patienten aus, wohingegen die Frequenz von IL-17A-sezernierenden Zellen gering war. Seit der Beschreibung von T_H17 -Zellen im Jahre 2005 als eigenständige pathogene Zellpopulation im Kontext von Autoimmunität³¹⁹⁻³²¹ wurde eine Implikation in verschiedenen humanen Erkrankungen autoimmuner Genese festgestellt, z.B. bei der MS, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, RA und Psoriasis³²²⁻³²⁵ sowie der autoimmunen Lebererkrankung PBC³²⁶. Auch für die AIH-Pathogenese werden T_H17 -Zellen als Effektorpopulation diskutiert^{111,163,181,233}. Dies widerlegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sondern verweisen vielmehr auf einen T_H1 - bzw. T_C1 -Status der LIL in den AIH-Patienten. Weiterhin könnte auch anhand der leicht erhöhten intrahepatischen Expression T_H2 -assoziiierter Gene auf eine Beteiligung von T_H2 -Zellen an der AIH-Immunpathogenese geschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte vor allem eine stark erhöhte Expression und Sekretion von TNF α durch Zellen sowohl in der Peripherie als auch in der Leber von AIH-Patienten bestimmt werden. Einzig im Zellkulturüberstand unspezifisch stimulierter PBMC von AIH-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Probanden weniger TNF α nachgewiesen werden, was auf die Expression von mTNF α auf aktivierten PBMC hindeuten könnte. Inwieweit und ob mTNF α auf aktivierten T-Zellen von AIH-Patienten exprimiert wird, bedarf weiterführender durchflusszytometrischer Untersuchungen. Dennoch legen die TNF α -Daten der vorliegenden Arbeit eine eminente Rolle dieses Effektorzytokins

in der AIH-Immunpathogenese nahe. Unterstützt wird dies durch eine erfolgreich durchgeführte *Off-Label*-Therapie mit anti-TNF α bei einem schwer zu behandelndem AIH-Fall²⁷².

Sowohl die PBMC als auch die LIL der AIH-Patienten wiesen eine erhöhte Expression der Chemokinliganden *CXCL9*, *CXCL10* und *CXCL11* auf. Diese Liganden sind nicht konstitutiv exprimiert, werden aber in Gegenwart eines proinflammatorischen Zytokinmilieus aufreguliert und rekrutieren T-Zellen zum Ort der Entzündung²⁸². Insbesondere *CXCL10* zeigte die höchste Expression in den LIL der AIH-Patienten. Dieser Ligand wird auch durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sezerniert und funktionell als T_H1-Chemokin kategorisiert^{182,285}. Als klassische Chemokinrezeptorkombination gelten für T_H1- bzw. T_C1-Zellen CXCR3/CCR5^{24,188-190,280} und für T_H17- bzw. T_C17-Zellen CXCR3/CCR6^{24,181}. Bei den Genexpressionsstudien der vorliegenden Arbeit wiesen sowohl *CCR5* als auch *CCR6* in den PBMC und LIL eine geringere Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Jedoch zeigte sich beim direkten Vergleich der Expressionsniveaus, dass *CCR5* stärker exprimiert war als *CCR6*. Dies würde zwar die bisherigen Ergebnisse der T_H1-Dominanz der LIL in der Leber von AIH-Patienten unterstützen, allerdings zeigte auch der CCR5-Ligand CCL5 eine verminderte Expression im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch sind Redundanz und Promiskuität Charakteristika des Chemokinsystems¹⁷⁴. So sind neben CCL5 auch CCL3 und CCL4 Liganden von CCR5, aber auch dem alternativen Rezeptor CCR1^{24,206,289,290}. Daher bedarf es einer Erweiterung der Analysen bezüglich des Profils von Chemokinrezeptoren und -liganden sowie einer Überprüfung der Expression auch auf Proteinebene. In der Summe zeigen die hier vorgestellten Untersuchungen, dass im PBMC- und LIL-Kompartiment die CXCR3-Liganden *CXCL9*, *CXCL10* und *CXCL11* aufgrund ihrer starken Aufregulation eine wichtige Rolle in der Rekrutierung innezuhaben scheinen. Weiterführend sollte untersucht werden, welche Zellpopulationen in der Leber für die erhöhte Expression verantwortlich sind. Auch T-Zellen können diese Liganden exprimieren und so in der Leber zur Pathogenese der AIH beitragen, indem sie zusätzlich zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine auch durch Sekretion inflammatorischer Chemokine die T-Zellinfiltration weiter verstärken. Hieraus könnte einer positiver Feedback-Loop entstehen, der die Entzündung weiter fördert.

GM-CSF gilt in neueren Studien als Kandidat für therapeutische Ansätze bei Autoimmun- und Entzündungserkrankungen^{297,298}. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression von M-CSF und GM-CSF in den LIL von AIH-Patienten nachgewiesen werden. Beiden CSF wird eine pathologische Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen zugewiesen^{210,291-294}. Durch Noster *et al.* wurde in der MS eine Verbindung der GM-CSF-Produktion mit T_H1-Zellen beschrieben²¹¹, was die bisher vorgestellten Daten bezüglich des T_H1-Phänotyps der LIL in AIH-Patienten unterstützt. Jedoch wurde die Expression bisher nur auf RNA-Ebene in den Gesamt-LIL nachgewiesen und bedarf einer Verifikation auf Proteinebene. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Genexpression der zytolytischen Proteine Granulysin, Granzym B und Perforin in den LIL der AIH-

Patienten signifikant erhöht war, was auf den zytotoxischen Status der intrahepatischen Lymphozyten verweist. Auch hier bedarf es der Untersuchung auf Proteinebene, im speziellen ob diese Proteine durch CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen synthetisiert werden. Generell gelten CD8⁺ T-Zellen als die zytotoxische Effektorpopulation, mittlerweile sind aber auch CD4⁺ T-Zellen mit zytotoxischem Charakter beschrieben, die häufig aufgrund der Produktion von IFN γ , TNF α und IL-2 als T_H1-ähnlich gelten^{62,301-306}.

Da die AIH, mit einer Prävalenz von 10,7 - 23,9/100.000 Einwohnern in Europa¹¹³⁻¹¹⁵, eine seltene Erkrankung darstellt, ist die Verfügbarkeit von geeignetem Probenmaterial begrenzt. Insbesondere die Probenverfügbarkeit von therapienaïven Patienten ist gering, im Speziellen von Lebergewebe zur Isolierung der LIL. Deshalb beruhen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit auf teilweise kleinen Gruppengrößen. Ein Aspekt für weitere Untersuchungen stellt somit die Erweiterung der Kohorten dar, ein Anderer die Akquisition weiterer adäquater Kontrollen für die Untersuchung des intrahepatischen Milieus.

4.3.2 Das T-Zellrezeptorrepertoire von AIH-Patienten

Zur Untersuchung des TCR-Repertoires wurden LIL aus dem Lebergewebe von AIH-Patienten isoliert und expandiert. Die Analysen der T-Zellklone hinsichtlich der Expression spezifischer TCR V β -Ketten zeigten, dass Vb 8 am häufigsten vertreten war, gefolgt von Vb 2 und Vb 17. Sowohl die Daten der vorliegenden Arbeit, aber auch die Ergebnisse weiterer Studien³¹⁵⁻³¹⁸ suggerieren grundsätzlich ein eingeschränktes TCR V β -Repertoire von AIH-Patienten, was auf eine antigengetriebene AIH-Pathogenese hinweist. Dennoch bedarf es weiterführender Analysen hinsichtlich der Verteilung des TCR-Repertoires und der Identifizierung weiterer potentieller Autoantigene. Hierfür werden zurzeit die in dieser Arbeit klonal expandierten T-Zellkulturen mithilfe des TCR CDR3-Spectratypings untersucht und deren Zielantigene mithilfe von sog. Kombinatorischen Peptidbibliotheken im *positional scanning*-Format identifiziert. Dabei handelt es sich um mehrere komplexe Peptidgemische, die jeweils eine definierte Aminosäure an einer definierten Position aufweisen und mit denen im Screening-Verfahren die aktivste Aminosäure an jeder Position bestimmt werden kann^{327,328}. Die Daten dieser Experimente sollen im Folgenden in systematischen Datenbankanalysen verwendet werden, um das gesamte Spektrum der Zielantigene identifizieren zu können. Die prognostizierten Peptide von hepatotropen, aber auch xenogenen Produkten sowie von leberspezifischen und ubiquitären Autoantigenen sollen synthetisiert werden und deren stimulatorische Kapazität evaluiert werden. Hierdurch ist es zudem möglich, das Spektrum von potentiellen Autoantigenen zu beurteilen. Außerdem könnten diese Analysen wichtige Hinweise auf mögliche Umweltfaktoren geben, die an der Induktion der AIH beteiligt sein könnten. So wird molekulares Mimikry als Ursache für Autoimmunerkrankungen diskutiert: In diesem Modell wird die

gegen Fremdartige gerichtete Immunantwort durch eine strukturelle Ähnlichkeit von Fremdartigen und Autoantigenen hervorgerufen^{100,111,148}.

5 Zusammenfassung

Die AIH ist eine chronisch-entzündliche Lebererkrankung autoimmuner Genese, deren Pathomechanismus noch nicht ausreichend verstanden ist. Jedoch scheinen $CD4^+$ T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Immunpathogenese einzunehmen: So zeigen AIH-Patienten eine genetische Prädisposition für die MHCII-Moleküle HLA-DR3 und DR4 und weisen vermehrt $CD4^+$ T-Zellinfiltrate in der Leber auf. Dennoch sind der Phänotyp und die Funktion der extra- und intrahepatischen T-Zellen in AIH-Patienten bisher unzureichend beschrieben.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Profil von zirkulierenden und leberinfiltrierenden Lymphozyten in AIH-Patienten anhand der Charakterisierung von T-zellspezifischen Zytokinen sowie charakteristischen Chemokinen untersucht. Hierbei konnte im PBMC-Kompartiment von AIH-Patienten bezüglich der Expression von T_H1 -, T_H17 - und T_H2 -assoziierten Zytokinen keine dominierende Effektorpopulation identifiziert werden. Jedoch zeichneten sich die Zellen im Allgemeinen durch eine stark erhöhte Expression des proinflammatorischen Zytokins $TNF\alpha$ aus. Weiterführend wurde die Sekretion von T_H1 - und T_H17 -charakteristischen Zytokinen durch zirkulierende $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen untersucht. Auch hier konnte eine erhöhte Frequenz $TNF\alpha$ -sezernierender T-Zellen, sowohl im $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellkompartiment, nachgewiesen werden. Dahingegen konnten keine IL-17-sezernierenden Zellen detektiert werden, was eine Implikation von T_H17 -Zellen in der Peripherie auszuschließen scheint. Des Weiteren konnte eine numerische Verschiebung zugunsten der $CD4^+$ T-Zellen im PBMC-Kompartiment der AIH-Patienten festgestellt werden. Im LIL-Kompartiment wurde eine erhöhte Expression T_H1 -assoziierter Zytokine detektiert, ungleich der fehlenden Überexpression T_H17 -charakteristischer Zytokine. Auch zeichneten sich die intrahepatischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen von AIH-Patienten durch die erhöhte Frequenz an $IFN\gamma$ - und $TNF\alpha$ -, nicht aber IL-17-sezernierender Zellen im Vergleich zur Peripherie aus. Dies verweist zusammengefasst auf einen T_H1 - bzw. T_C1 -Status der LIL in den AIH-Patienten. Auch bezüglich der Expression des Chemokinliganden CXCL10 zeigten die LIL der AIH-Patienten eine stark erhöhte Expression. CXCL10 wird ebenfalls durch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sezerniert und funktionell als T_H1 -Chemokin kategorisiert. Zusätzlich wurde bei den LIL der AIH-Patienten auch die Expression von M-CSF und GM-CSF untersucht, denen eine pathologische Rolle in diversen Autoimmunerkrankungen zugewiesen wird. Vor allem GM-CSF zeigte eine stark erhöhte Expression und wurde schon in Verbindung mit T_H1 -Zellen beschrieben. Aufgrund der erhöhten Expression der zytolytischen Proteine Granulysin, Granzym B und Perforin wiesen die LIL der AIH-Patienten zudem einen zytotoxischen Status auf.

Inwieweit T-Zellen zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Leberentzündung in der AIH beitragen, ist soweit nur teilweise verstanden. Es wird jedoch diskutiert, dass die Immunreaktion durch autoreaktive T-Zellen ausgelöst wird. Nichtsdestotrotz sind die Zielantigene der leberinfiltrierenden

T-Zellen bei dem Großteil der AIH-Patienten noch unbekannt. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher anhand der TCR V β -Repertoireanalyse von LIL aus AIH-Patienten die Frage geklärt werden, ob es sich bei der Leberschädigung in der AIH um einen antigengetriebenen Prozess handelt oder um eine Bystander-Hepatitis, die durch die unspezifische Rekrutierung und Aktivierung von inflammatorischen Immunzellen in der Leber charakterisiert ist. Hierfür wurden T-Zellklone aus LIL von AIH-Patienten generiert und durchflusszytometrisch auf die Expression spezifischer TCR V β -Ketten untersucht. Die Analysen zeigten eine Dominanz der V β -Familien Vb 8, Vb 2 und Vb 17 durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklone. Dieses begrenzte und selektive TCR V β -Repertoire der LIL aus AIH-Patienten lässt darauf schließen, dass die AIH eine antigengetriebene Erkrankung ist.

Zusammengefasst verweisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf ein distinktes T_H1- bzw. T_C1-Profil von LIL in der AIH, wohingegen IL-17-sezernierende T-Zellen nicht in die Immunpathogenese involviert zu sein scheinen. Des Weiteren deutet das eingeschränkte TCR-Repertoire der LIL auf eine antigengetriebene Leberschädigung in der AIH.

6 Abstract

AIH is a chronic inflammatory autoimmune liver disease of unknown pathogenesis and etiology. However CD4⁺ T cells seem to have a decisive role in the immunopathogenesis. So, AIH patients show a genetic predisposition for the MHCII molecules HLA-DR3 and DR4 and also increased CD4⁺ T cell infiltrates in the liver. Nonetheless, the phenotype and function of circulating and liver infiltrating T cells in AIH patients have been described insufficiently so far.

In the first part of this study the profile of circulating and liver infiltrating lymphocytes of AIH patients was evaluated by characterization of T cell-specific cytokines and characteristic chemokines. No dominant effector population could be identified in the PBMC compartment of AIH patients with respect to the expression of Th1, Th17 and Th2-associated cytokines. Nonetheless, cells were generally characterized by a strong increased expression of the pro-inflammatory cytokine TNF α . The analysis of Th1 and Th17 cytokine secretion by circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells also revealed an increased frequency of TNF α -secreting T cells in both the CD4⁺ and the CD8⁺ T cell compartment, while no IL-17-secreting cells could be detected. This seems to exclude an implication of Th17 cells in the periphery of AIH patients. Furthermore, a numerical shift to the benefit of CD4⁺ T cells in the PBMC compartment of AIH patients was detected. In LIL an increased expression of Th1-associated cytokines was observed while no relevant expression of Th17-characteristic cytokines could be detected. Also intrahepatic CD4⁺ and CD8⁺ T cells from AIH patients were characterized by an increased frequency of IFN γ - and TNF α -, but not IL-17-secreting cells in comparison to the periphery. In summary this rather refers to an Th1 or Tc1 status of LIL in AIH patients. With regard to the chemokine CXCL10 LIL of AIH patients showed an increased expression. CXCL10 is also secreted by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and functionally characterized as Th1 chemokine. Additionally the expression of M-CSF and GM-CSF was analyzed in LIL of AIH patients based on their pathological role in various autoimmune diseases. Especially GM-CSF showed an increased expression and has been described in connection with Th1 cells. Furthermore, LIL of AIH patients appear to have a cytotoxic status due to the increased expression of the cytolytic proteins granulysin, granzyme B and perforin.

To what extent T cells contribute to the formation and maintenance of liver inflammation in AIH is only partially understood. However, it is discussed that the immune reaction is initiated by autoreactive T cells. Nevertheless, target antigens of liver infiltrating T cells are still unknown for the vast majority of AIH patients. In the second part of this study TCR V β repertoire analysis of LIL from AIH patients were performed to clarify the issue whether the liver damage in AIH is an antigen-driven process or a bystander hepatitis caused by non-specific recruitment and activation of inflammatory cells in the liver. For this, T cell clones were generated from LIL of AIH patients and analyzed for the expression of specific TCR V β chains by flow cytometry. Analyses revealed a predominance of the

V β families Vb 8, Vb 2 and Vb 17 by both CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones. The limited and selective TCR V β repertoire of LIL from AIH patients suggests that AIH is an antigen-driven disease.

In conclusion, the results of this study suggest a distinct Th1 or Tc1 profile of LIL in AIH, whereas IL-17-secreting T cells do not seem to be involved in the immune pathogenesis. In addition, the limited TCR V β repertoire of LIL indicates an antigen-driven liver damage in AIH.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- 1 Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H. & Pillai, S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. (Elsevier Health Sciences, 2012).
- 2 Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826, doi:10.1038/nature06246 (2007).
- 3 Clark, R. & Kupper, T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *The Journal of investigative dermatology* **125**, 629-637, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x (2005).
- 4 Borghans, J. A., Noest, A. J. & De Boer, R. J. How specific should immunological memory be? *Journal of immunology* **163**, 569-575 (1999).
- 5 Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 4th Edition edn, (Elsevier Saunders, 2012).
- 6 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 (2002).
- 7 Schütt, C. & Bröker, B. *Grundwissen Immunologie*. 3. Auflage edn, (Spektrum Akademischer Verlag, 2011).
- 8 Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's Immunobiology*. (Taylor & Francis Group, 2008).
- 9 Kamradt, T. & Ferrari-Kuhne, K. [Adaptive immunity]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **136**, 1678-1683, doi:10.1055/s-0031-1281577 (2011).
- 10 Oestreich, K. J. & Weinmann, A. S. Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4+ T cell transcription factors. *Nature reviews. Immunology* **12**, 799-804, doi:10.1038/nri3321 (2012).
- 11 Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology* **12**, 255-263, doi:10.1038/ni.1993 (2011).
- 12 Cosmi, L. *et al.* Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism* **63**, 2504-2515, doi:10.1002/art.30332 (2011).
- 13 Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* **9**, 1341-1346, doi:10.1038/ni.1659 (2008).
- 14 Putheti, P., Awasthi, A., Popoola, J., Gao, W. & Strom, T. B. Human CD4 memory T cells can become CD4+IL-9+ T cells. *PloS one* **5**, e8706, doi:10.1371/journal.pone.0008706 (2010).
- 15 Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* **10**, 857-863, doi:10.1038/ni.1767 (2009).
- 16 Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology* **10**, 864-871, doi:10.1038/ni.1770 (2009).
- 17 Nurieva, R. I. *et al.* Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* **325**, 1001-1005, doi:10.1126/science.1176676 (2009).

- 18 Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A. & Paul, W. E. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10188-10192 (1993).
- 19 Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669 (2000).
- 20 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* **136**, 2348-2357 (1986).
- 21 Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* **7**, 145-173, doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045 (1989).
- 22 Mosmann, T. R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* **17**, 138-146 (1996).
- 23 Bacellar, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity* **70**, 6734-6740 (2002).
- 24 Oo, Y. H. & Adams, D. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Journal of autoimmunity* **34**, 45-54, doi:10.1016/j.jaut.2009.07.011 (2010).
- 25 Ekkens, M. J. *et al.* Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses. *Infection and immunity* **75**, 2291-2296, doi:10.1128/IAI.01328-06 (2007).
- 26 Geginat, J. *et al.* The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Seminars in immunology* **25**, 252-262, doi:10.1016/j.smim.2013.10.012 (2013).
- 27 Jager, A. & Kuchroo, V. K. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian journal of immunology* **72**, 173-184, doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x (2010).
- 28 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**, 485-517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710 (2009).
- 29 Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596 (1997).
- 30 Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. & Bettelli, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in immunology* **19**, 362-371, doi:10.1016/j.smim.2007.10.007 (2007).
- 31 Ivanov, I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133, doi:10.1016/j.cell.2006.07.035 (2006).
- 32 Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2271-2279, doi:10.1084/jem.20061308 (2006).
- 33 Acosta-Rodriguez, E. V. *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology* **8**, 639-646, doi:10.1038/ni1467 (2007).
- 34 Wilson, N. J. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology* **8**, 950-957, doi:10.1038/ni1497 (2007).

- 35 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189, doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001 (2006).
- 36 Zhou, L. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* **8**, 967-974, doi:10.1038/ni1488 (2007).
- 37 Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M. & Huston, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology* **145**, 3796-3806 (1990).
- 38 Miyara, M. & Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine* **13**, 108-116, doi:10.1016/j.molmed.2007.01.003 (2007).
- 39 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787, doi:10.1016/j.cell.2008.05.009 (2008).
- 40 Josefowicz, S. Z. & Rudensky, A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* **30**, 616-625, doi:10.1016/j.immuni.2009.04.009 (2009).
- 41 Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E. & Romagnani, S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *International immunology* **20**, 1361-1368, doi:10.1093/intimm/dxn106 (2008).
- 42 Mills, K. H. & McGuirk, P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Seminars in immunology* **16**, 107-117, doi:10.1016/j.smim.2003.12.006 (2004).
- 43 Shevach, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* **25**, 195-201, doi:10.1016/j.immuni.2006.08.003 (2006).
- 44 Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G. & Mirshafiey, A. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis* **2012**, 805875, doi:10.1155/2012/805875 (2012).
- 45 Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y. & O'Shea, J. J. Helper T cell diversity and plasticity. *Current opinion in immunology* **24**, 297-302, doi:10.1016/j.coi.2012.01.014 (2012).
- 46 Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F. & Annunziato, F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **85**, 36-42, doi:10.1002/cyto.a.22348 (2014).
- 47 Zhou, L., Chong, M. M. & Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-655, doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001 (2009).
- 48 Annunziato, F., Romagnani, C. & Romagnani, S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* **135**, 626-635, doi:10.1016/j.jaci.2014.11.001 (2015).
- 49 Mittrucker, H. W., Visekruna, A. & Huber, M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Archivum immunologiae et therapias experimentalis* **62**, 449-458, doi:10.1007/s00005-014-0293-y (2014).
- 50 Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology* **6**, 15-25, doi:10.1038/cmi.2009.3 (2009).

- 51 Shen, D. T., Ma, J. S., Mather, J., Vukmanovic, S. & Radoja, S. Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. *Journal of leukocyte biology* **80**, 827-837, doi:10.1189/jlb.0603298 (2006).
- 52 Ma, J. S. *et al.* Protein kinase C δ regulates antigen receptor-induced lytic granule polarization in mouse CD8+ CTL. *Journal of immunology* **178**, 7814-7821 (2007).
- 53 Krensky, A. M. & Clayberger, C. Granulysin: a novel host defense molecule. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **5**, 1789-1792, doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00970.x (2005).
- 54 Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169-1178 (1993).
- 55 Stranges, P. B. *et al.* Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* **26**, 629-641, doi:10.1016/j.immuni.2007.03.016 (2007).
- 56 Gupta, S., Bi, R. & Gollapudi, S. Central memory and effector memory subsets of human CD4(+) and CD8(+) T cells display differential sensitivity to TNF- α -induced apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1050**, 108-114, doi:10.1196/annals.1313.012 (2005).
- 57 Liu, Z. G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell research* **15**, 24-27, doi:10.1038/sj.cr.7290259 (2005).
- 58 Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology* **214**, 149-160, doi:10.1002/path.2287 (2008).
- 59 Ngai, P. *et al.* Gamma interferon responses of CD4 and CD8 T-cell subsets are quantitatively different and independent of each other during pulmonary Mycobacterium bovis BCG infection. *Infection and immunity* **75**, 2244-2252, doi:10.1128/IAI.00024-07 (2007).
- 60 Appay, V. The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail? *Clinical and experimental immunology* **138**, 10-13, doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02605.x (2004).
- 61 Marshall, N. B. & Swain, S. L. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 954602, doi:10.1155/2011/954602 (2011).
- 62 Appay, V. *et al.* Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *Journal of immunology* **168**, 5954-5958 (2002).
- 63 Zaunders, J. J. *et al.* Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood* **103**, 2238-2247, doi:10.1182/blood-2003-08-2765 (2004).
- 64 Mak, T. W. & Saunders, M. E. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*. (Elsevier/Academic, 2006).
- 65 Kaufmann, S. H. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2272-2279 (1996).
- 66 Schatz, D. G. & Swanson, P. C. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annual review of genetics* **45**, 167-202, doi:10.1146/annurev-genet-110410-132552 (2011).
- 67 Padovan, E. *et al.* Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* **262**, 422-424 (1993).

- 68 Padovan, E. *et al.* Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1587-1591 (1995).
- 69 Davodeau, F. *et al.* Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1391-1398 (1995).
- 70 Khor, B. & Sleckman, B. P. Intra- and inter-allelic ordering of T cell receptor beta chain gene assembly. *European journal of immunology* **35**, 964-970, doi:10.1002/eji.200425806 (2005).
- 71 Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature reviews. Immunology* **11**, 251-263, doi:10.1038/nri2941 (2011).
- 72 Welsch, U. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2005).
- 73 Bogdanos, D. P., Gao, B. & Gershwin, M. E. Liver immunology. *Comprehensive Physiology* **3**, 567-598, doi:10.1002/cphy.c120011 (2013).
- 74 Invernizzi, P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. *Journal of autoimmunity* **46**, 1-6, doi:10.1016/j.jaut.2013.08.006 (2013).
- 75 Lohse, A. W., Weiler-Normann, C. & Tiegs, G. Immune-mediated liver injury. *Journal of hepatology* **52**, 136-144, doi:10.1016/j.jhep.2009.10.016 (2010).
- 76 Tiegs, G. & Lohse, A. W. Immune tolerance: what is unique about the liver. *Journal of autoimmunity* **34**, 1-6, doi:10.1016/j.jaut.2009.08.008 (2010).
- 77 Bottcher, J. P., Knolle, P. A. & Stabenow, D. Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver. *Digestive diseases* **29**, 384-390, doi:10.1159/000329801 (2011).
- 78 Parker, G. A. & Picut, C. A. Immune functioning in non lymphoid organs: the liver. *Toxicologic pathology* **40**, 237-247, doi:10.1177/0192623311428475 (2012).
- 79 Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**, S54-62, doi:10.1002/hep.21060 (2006).
- 80 Smedsrod, B. *et al.* Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* **35**, 1509-1516 (1994).
- 81 DeLeve, L. D. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *The Journal of clinical investigation* **123**, 1861-1866, doi:10.1172/JCI66025 (2013).
- 82 Nemeth, E., Baird, A. W. & O'Farrelly, C. Microanatomy of the liver immune system. *Seminars in immunopathology* **31**, 333-343, doi:10.1007/s00281-009-0173-4 (2009).
- 83 Norris, S. *et al.* Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *Journal of hepatology* **28**, 84-90 (1998).
- 84 Bertolino, P., McCaughan, G. W. & Bowen, D. G. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunology and cell biology* **80**, 84-92, doi:10.1046/j.0818-9641.2001.01048.x (2002).
- 85 Knolle, P. A. *et al.* Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* **116**, 1428-1440 (1999).
- 86 Cabillic, F. *et al.* Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *Journal of hepatology* **44**, 552-559, doi:10.1016/j.jhep.2005.08.010 (2006).

- 87 Wiegard, C. *et al.* Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance. *Gastroenterology* **133**, 2010-2018, doi:10.1053/j.gastro.2007.09.007 (2007).
- 88 Bamboat, Z. M. *et al.* Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *Journal of immunology* **182**, 1901-1911, doi:10.4049/jimmunol.0803404 (2009).
- 89 Bertolino, P., Trescol-Biemont, M. C. & Rabourdin-Combe, C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *European journal of immunology* **28**, 221-236, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<221::AID-IMMU221>3.0.CO;2-F (1998).
- 90 Bertolino, P. *et al.* Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *International immunology* **11**, 1225-1238 (1999).
- 91 Limmer, A. *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine* **6**, 1348-1354, doi:10.1038/82161 (2000).
- 92 Diehl, L. *et al.* Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology* **47**, 296-305, doi:10.1002/hep.21965 (2008).
- 93 Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Current opinion in immunology* **8**, 478-483 (1996).
- 94 Berke, G. The CTL's kiss of death. *Cell* **81**, 9-12 (1995).
- 95 Isogawa, M., Furuichi, Y. & Chisari, F. V. Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* **23**, 53-63, doi:10.1016/j.immuni.2005.05.005 (2005).
- 96 Mehal, W. Z., Juedes, A. E. & Crispe, I. N. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *Journal of immunology* **163**, 3202-3210 (1999).
- 97 Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-597, doi:10.1038/nature03724 (2005).
- 98 Limmer, A. *et al.* Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *European journal of immunology* **28**, 2395-2406, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199808)28:08<2395::AID-IMMU2395>3.0.CO;2-D (1998).
- 99 Rocken, M., Urban, J. F. & Shevach, E. M. Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* **359**, 79-82, doi:10.1038/359079a0 (1992).
- 100 Wucherpfennig, K. W. & Strominger, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705 (1995).
- 101 Theofilopoulos, A. N. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunology today* **16**, 150-159 (1995).
- 102 Vyse, T. J. & Todd, J. A. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* **85**, 311-318 (1996).
- 103 Bogdanos, D. P., Choudhuri, K. & Vergani, D. Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences. *Liver* **21**, 225-232 (2001).
- 104 Ma, H. D., Wang, Y. H., Chang, C., Gershwin, M. E. & Lian, Z. X. The intestinal microbiota and microenvironment in liver. *Autoimmunity reviews* **14**, 183-191, doi:10.1016/j.autrev.2014.10.013 (2015).
- 105 Christen, U. & Hintermann, E. Pathogen infection as a possible cause for autoimmune hepatitis. *International reviews of immunology* **33**, 296-313, doi:10.3109/08830185.2014.921162 (2014).

- 106 Smilek, D. E. & St Clair, E. W. Solving the puzzle of autoimmunity: critical questions. *F1000prime reports* **7**, 17, doi:10.12703/P7-17 (2015).
- 107 Oo, Y. H., Hubscher, S. G. & Adams, D. H. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatology international* **4**, 475-493, doi:10.1007/s12072-010-9183-5 (2010).
- 108 Lohse, A. W. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* **55**, 171-182, doi:10.1016/j.jhep.2010.12.012 (2011).
- 109 Krawitt, E. L. Autoimmune hepatitis. *The New England journal of medicine* **354**, 54-66, doi:10.1056/NEJMra050408 (2006).
- 110 Vergani, D., Longhi, M. S., Bogdanos, D. P., Ma, Y. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *Seminars in immunopathology* **31**, 421-435, doi:10.1007/s00281-009-0170-7 (2009).
- 111 Liberal, R., Grant, C. R., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Autoimmune hepatitis: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity* **41**, 126-139, doi:10.1016/j.jaut.2012.11.002 (2013).
- 112 Heneghan, M. A., Yeoman, A. D., Verma, S., Smith, A. D. & Longhi, M. S. Autoimmune hepatitis. *Lancet* **382**, 1433-1444, doi:10.1016/S0140-6736(12)62163-1 (2013).
- 113 Werner, M. *et al.* Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study. *Scandinavian journal of gastroenterology* **43**, 1232-1240, doi:10.1080/00365520802130183 (2008).
- 114 Gronbaek, L., Vilstrup, H. & Jepsen, P. Autoimmune hepatitis in Denmark: incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study. *Journal of hepatology* **60**, 612-617, doi:10.1016/j.jhep.2013.10.020 (2014).
- 115 Yang, F., Wang, Q., Jia, J. & Ma, X. Autoimmune Hepatitis: East Meets West. *Journal of gastroenterology and hepatology*, doi:10.1111/jgh.12952 (2015).
- 116 Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Autoimmune paediatric liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 3360-3367 (2008).
- 117 Crapper, R. M., Bhathal, P. S., Mackay, I. R. & Frazer, I. H. 'Acute' autoimmune hepatitis. *Digestion* **34**, 216-225 (1986).
- 118 Czaja, A. J., Rakela, J. & Ludwig, J. Features reflective of early prognosis in corticosteroid-treated severe autoimmune chronic active hepatitis. *Gastroenterology* **95**, 448-453 (1988).
- 119 Amontree, J. S., Stuart, T. D. & Bredfeldt, J. E. Autoimmune chronic active hepatitis masquerading as acute hepatitis. *Journal of clinical gastroenterology* **11**, 303-307 (1989).
- 120 Kessler, W. R. *et al.* Fulminant hepatic failure as the initial presentation of acute autoimmune hepatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2**, 625-631 (2004).
- 121 Johnson, P. J. & McFarlane, I. G. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* **18**, 998-1005 (1993).
- 122 Alvarez, F. *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* **31**, 929-938 (1999).
- 123 Hennes, E. M. *et al.* Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* **48**, 169-176, doi:10.1002/hep.22322 (2008).

- 124 Murray-Lyon, I. M., Stern, R. B. & Williams, R. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet* **1**, 735-737 (1973).
- 125 Stern, R. B. & Williams, R. Controlled trials of immunosuppressive therapy in hepatitis. *Postgraduate medical journal* **50**, 392-394 (1974).
- 126 Summerskill, W. H., Korman, M. G., Ammon, H. V. & Baggenstoss, A. H. Prednisone for chronic active liver disease: dose titration, standard dose, and combination with azathioprine compared. *Gut* **16**, 876-883 (1975).
- 127 Kirk, A. P., Jain, S., Pocock, S., Thomas, H. C. & Sherlock, S. Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis. *Gut* **21**, 78-83 (1980).
- 128 Manns, M. P. *et al.* Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* **51**, 2193-2213, doi:10.1002/hep.23584 (2010).
- 129 Stellon, A. J., Keating, J. J., Johnson, P. J., McFarlane, I. G. & Williams, R. Maintenance of remission in autoimmune chronic active hepatitis with azathioprine after corticosteroid withdrawal. *Hepatology* **8**, 781-784 (1988).
- 130 Johnson, P. J., McFarlane, I. G. & Williams, R. Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis. *The New England journal of medicine* **333**, 958-963, doi:10.1056/NEJM199510123331502 (1995).
- 131 Manns, M. P. *et al.* Budesonide induces remission more effectively than prednisone in a controlled trial of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **139**, 1198-1206, doi:10.1053/j.gastro.2010.06.046 (2010).
- 132 Medina, J., Garcia-Buey, L. & Moreno-Otero, R. Review article: immunopathogenetic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **17**, 1-16 (2003).
- 133 Yeoman, A. D., Longhi, M. S. & Heneghan, M. A. Review article: the modern management of autoimmune hepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **31**, 771-787, doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04241.x (2010).
- 134 Amital, H. *et al.* Role of infectious agents in systemic rheumatic diseases. *Clinical and experimental rheumatology* **26**, S27-32 (2008).
- 135 McFarlane, I. G. The relationship between autoimmune markers and different clinical syndromes in autoimmune hepatitis. *Gut* **42**, 599-602 (1998).
- 136 Vergani, D. *et al.* Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Journal of hepatology* **41**, 677-683, doi:10.1016/j.jhep.2004.08.002 (2004).
- 137 Czaja, A. J., Cassani, F., Cataleta, M., Valentini, P. & Bianchi, F. B. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* **24**, 1068-1073, doi:10.1002/hep.510240515 (1996).
- 138 Manns, M. P., Johnson, E. F., Griffin, K. J., Tan, E. M. & Sullivan, K. F. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *The Journal of clinical investigation* **83**, 1066-1072, doi:10.1172/JCI113949 (1989).
- 139 Gueguen, M. *et al.* Identification of the main epitope on human cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *Journal of autoimmunity* **4**, 607-615 (1991).

- 140 Yamamoto, A. M., Cresteil, D., Boniface, O., Clerc, F. F. & Alvarez, F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *European journal of immunology* **23**, 1105-1111, doi:10.1002/eji.1830230519 (1993).
- 141 Kerkar, N. *et al.* Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *Journal of immunology* **170**, 1481-1489 (2003).
- 142 Manns, M., Gerken, G., Kyriatsoulis, A., Staritz, M. & Meyer zum Buschenfelde, K. H. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* **1**, 292-294 (1987).
- 143 Stechemesser, E., Klein, R. & Berg, P. A. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* **18**, 1-9 (1993).
- 144 Wies, I. *et al.* Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* **355**, 1510-1515 (2000).
- 145 Palioura, S., Herkel, J., Simonovic, M., Lohse, A. W. & Soll, D. Human SepSecS or SLA/LP: selenocysteine formation and autoimmune hepatitis. *Biological chemistry* **391**, 771-776, doi:10.1515/BC.2010.078 (2010).
- 146 Lohse, A. W. *et al.* Relation between autoimmune liver diseases and viral hepatitis: clinical and serological characteristics in 859 patients. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **33**, 527-533 (1995).
- 147 Baeres, M. *et al.* Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* **51**, 259-264 (2002).
- 148 Longhi, M. S., Ma, Y., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *Journal of autoimmunity* **34**, 7-14, doi:10.1016/j.jaut.2009.08.010 (2010).
- 149 Lohr, H. *et al.* Clonal analysis of liver-infiltrating T cells in patients with LKM-1 antibody-positive autoimmune chronic active hepatitis. *Clinical and experimental immunology* **84**, 297-302 (1991).
- 150 Schlaak, J. F., Lohr, H., Gallati, H., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Fleischer, B. Analysis of the in vitro cytokine production by liver-infiltrating T cells of patients with autoimmune hepatitis. *Clinical and experimental immunology* **94**, 168-173 (1993).
- 151 Lohr, H. F. *et al.* Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* **24**, 1416-1421, doi:10.1002/hep.510240619 (1996).
- 152 Mix, H. *et al.* Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **135**, 2107-2118, doi:10.1053/j.gastro.2008.07.029 (2008).
- 153 Crispe, I. N. Liver antigen-presenting cells. *Journal of hepatology* **54**, 357-365, doi:10.1016/j.jhep.2010.10.005 (2011).
- 154 Ebrahimkhani, M. R., Mohar, I. & Crispe, I. N. Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells. *Hepatology* **54**, 1379-1387, doi:10.1002/hep.24508 (2011).
- 155 Delneste, Y. *et al.* Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* **101**, 143-150, doi:10.1182/blood-2002-04-1164 (2003).
- 156 Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* **75**, 163-189, doi:10.1189/jlb.0603252 (2004).

- 157 Bachmann, M. F. & Oxenius, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO reports* **8**, 1142-1148, doi:10.1038/sj.embor.7401099 (2007).
- 158 Ichiki, Y. *et al.* T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmunity reviews* **4**, 315-321, doi:10.1016/j.autrev.2005.01.005 (2005).
- 159 Thomson, A. W. & Knolle, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews. Immunology* **10**, 753-766, doi:10.1038/nri2858 (2010).
- 160 Senaldi, G., Lobo-Yeo, A., Mowat, A. P., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Class I and class II major histocompatibility complex antigens on hepatocytes: importance of the method of detection and expression in histologically normal and diseased livers. *Journal of clinical pathology* **44**, 107-114 (1991).
- 161 Lobo-Yeo, A. *et al.* Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease. *Hepatology* **12**, 224-232 (1990).
- 162 Herkel, J. *et al.* MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology* **37**, 1079-1085, doi:10.1053/jhep.2003.50191 (2003).
- 163 Zhao, L. *et al.* Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS one* **6**, e18909, doi:10.1371/journal.pone.0018909 (2011).
- 164 Damsker, J. M., Hansen, A. M. & Caspi, R. R. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1183**, 211-221, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x (2010).
- 165 Waite, J. C. & Skokos, D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *International journal of inflammation* **2012**, 819467, doi:10.1155/2012/819467 (2012).
- 166 Longhi, M. S. *et al.* Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *Journal of hepatology* **41**, 31-37, doi:10.1016/j.jhep.2004.03.008 (2004).
- 167 Longhi, M. S. *et al.* Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *Journal of autoimmunity* **25**, 63-71, doi:10.1016/j.jaut.2005.05.001 (2005).
- 168 Ferri, S. *et al.* A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* **52**, 999-1007, doi:10.1002/hep.23792 (2010).
- 169 Peiseler, M. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *Journal of hepatology* **57**, 125-132, doi:10.1016/j.jhep.2012.02.029 (2012).
- 170 Fernandez, E. J. & Lolis, E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology* **42**, 469-499, doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838 (2002).
- 171 Chensue, S. W. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clinical microbiology reviews* **14**, 821-835, table of contents, doi:10.1128/CMR.14.4.821-835.2001 (2001).
- 172 Lalor, P. F., Shields, P., Grant, A. & Adams, D. H. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunology and cell biology* **80**, 52-64, doi:10.1046/j.1440-1711.2002.01062.x (2002).
- 173 Czaja, A. J. Review article: chemokines as orchestrators of autoimmune hepatitis and potential therapeutic targets. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **40**, 261-279, doi:10.1111/apt.12825 (2014).
- 174 Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568, doi:10.1038/33340 (1998).

- 175 Sallusto, F. & Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature immunology* **9**, 949-952, doi:10.1038/ni.f.214 (2008).
- 176 Curbishley, S. M., Eksteen, B., Gladue, R. P., Lalor, P. & Adams, D. H. CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *The American journal of pathology* **167**, 887-899, doi:10.1016/S0002-9440(10)62060-3 (2005).
- 177 Harvey, C. E. *et al.* Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *Journal of leukocyte biology* **74**, 360-369 (2003).
- 178 Colvin, R. A., Campanella, G. S., Sun, J. & Luster, A. D. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *The Journal of biological chemistry* **279**, 30219-30227, doi:10.1074/jbc.M403595200 (2004).
- 179 Arai, K., Liu, Z. X., Lane, T. & Dennert, G. IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver. *Cellular immunology* **219**, 48-56 (2002).
- 180 Schrage, A. *et al.* Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines. *Hepatology* **48**, 1262-1272, doi:10.1002/hep.22443 (2008).
- 181 Oo, Y. H. *et al.* CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *Journal of hepatology* **57**, 1044-1051, doi:10.1016/j.jhep.2012.07.008 (2012).
- 182 Antonelli, A. *et al.* Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* **13**, 272-280, doi:10.1016/j.autrev.2013.10.010 (2014).
- 183 Zeremski, M. *et al.* Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* **48**, 1440-1450, doi:10.1002/hep.22500 (2008).
- 184 Cole, K. E. *et al.* Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *The Journal of experimental medicine* **187**, 2009-2021 (1998).
- 185 Shields, P. L. *et al.* Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *Journal of immunology* **163**, 6236-6243 (1999).
- 186 Kunkel, E. J. *et al.* Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *The American journal of pathology* **160**, 347-355, doi:10.1016/S0002-9440(10)64378-7 (2002).
- 187 Boisvert, J. *et al.* Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *Journal of hepatology* **38**, 67-75 (2003).
- 188 Loetscher, P. *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**, 344-345, doi:10.1038/34812 (1998).
- 189 Qin, S. *et al.* The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *The Journal of clinical investigation* **101**, 746-754, doi:10.1172/JCI1422 (1998).
- 190 Viola, A. & Luster, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology* **48**, 171-197, doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.121806.154841 (2008).

- 191 Katsounas, A. *et al.* CCL5 mRNA is a marker for early fibrosis in chronic hepatitis C and is regulated by interferon-alpha therapy and toll-like receptor 3 signalling. *Journal of viral hepatitis* **19**, 128-137, doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01503.x (2012).
- 192 Seki, E. *et al.* CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1858-1870 (2009).
- 193 Berres, M. L. *et al.* Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 4129-4140, doi:10.1172/JCI41732 (2010).
- 194 Yamazaki, T. *et al.* CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *Journal of immunology* **181**, 8391-8401 (2008).
- 195 Singh, S. P., Zhang, H. H., Foley, J. F., Hedrick, M. N. & Farber, J. M. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *Journal of immunology* **180**, 214-221 (2008).
- 196 Helmreich-Becker, I., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Lohse, A. W. Safety and feasibility of a new minimally invasive diagnostic laparoscopy technique. *Endoscopy* **30**, 756-762, doi:10.1055/s-2007-1001417 (1998).
- 197 Dancygier, H. [Nonalcoholic steatohepatitis]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **126**, 930 (2001).
- 198 Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator: Immunologie*. 1. Auflage edn, (Spektrum Akademischer Verlag, 2004).
- 199 Moretta, A., Pantaleo, G., Moretta, L., Cerottini, J. C. & Mingari, M. C. Direct demonstration of the clonogenic potential of every human peripheral blood T cell. Clonal analysis of HLA-DR expression and cytolytic activity. *The Journal of experimental medicine* **157**, 743-754 (1983).
- 200 Donaldson, P. T. *et al.* Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* **13**, 701-706 (1991).
- 201 Eggink, H. F., Houthoff, H. J., Huitema, S., Gips, C. H. & Poppema, S. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. I. Lymphocyte subsets in liver biopsies of patients with untreated idiopathic autoimmune hepatitis, chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis. *Clinical and experimental immunology* **50**, 17-24 (1982).
- 202 De Biasio, M. B. *et al.* Liver infiltrating mononuclear cells in children with type 1 autoimmune hepatitis. *Journal of clinical pathology* **59**, 417-423, doi:10.1136/jcp.2005.028613 (2006).
- 203 Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1849-1861, doi:10.1084/jem.20070663 (2007).
- 204 Maggi, L. *et al.* Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *European journal of immunology* **42**, 3180-3188, doi:10.1002/eji.201242648 (2012).
- 205 Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793, doi:10.1038/383787a0 (1996).
- 206 Rossi, D. & Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology* **18**, 217-242, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217 (2000).
- 207 Loetscher, M. *et al.* Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **184**, 963-969 (1996).
- 208 Clark-Lewis, I., Mattioli, I., Gong, J. H. & Loetscher, P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *The Journal of biological chemistry* **278**, 289-295, doi:10.1074/jbc.M209470200 (2003).

- 209 Burgess, A. W. & Metcalf, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* **56**, 947-958 (1980).
- 210 Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* **8**, 533-544, doi:10.1038/nri2356 (2008).
- 211 Noster, R. *et al.* IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Science translational medicine* **6**, 241ra280, doi:10.1126/scitranslmed.3008706 (2014).
- 212 Ma, Y. *et al.* Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* **130**, 868-882, doi:10.1053/j.gastro.2005.12.020 (2006).
- 213 Longhi, M. S. *et al.* Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* **46**, 472-484, doi:10.1002/hep.21658 (2007).
- 214 Klein, R., Zanger, U. M., Berg, T., Hopf, U. & Berg, P. A. Overlapping but distinct specificities of anti-liver-kidney microsome antibodies in autoimmune hepatitis type II and hepatitis C revealed by recombinant native CYP2D6 and novel peptide epitopes. *Clinical and experimental immunology* **118**, 290-297 (1999).
- 215 Herkel, J. *et al.* Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas. *Hepatology* **35**, 403-408, doi:10.1053/jhep.2002.30699 (2002).
- 216 Arenz, M., Herzog-Hauff, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Lohr, H. F. Antigen-independent in vitro expansion of T cells does not affect the T cell receptor V beta repertoire. *Journal of molecular medicine* **75**, 678-686 (1997).
- 217 Fisher, H. W. & Puck, T. T. On the Functions of X-Irradiated "Feeder" Cells in Supporting Growth of Single Mammalian Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **42**, 900-906 (1956).
- 218 Rowen, L., Koop, B. F. & Hood, L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* **272**, 1755-1762 (1996).
- 219 Wei, S., Charmley, P., Robinson, M. A. & Concannon, P. The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* **40**, 27-36 (1994).
- 220 Doherty, D. G. & O'Farrelly, C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological reviews* **174**, 5-20 (2000).
- 221 Hata, K. *et al.* Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clinical immunology and immunopathology* **56**, 401-419 (1990).
- 222 Klugewitz, K., Adams, D. H., Emoto, M., Eulenbug, K. & Hamann, A. The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends in immunology* **25**, 590-594, doi:10.1016/j.it.2004.09.006 (2004).
- 223 Senaldi, G., Portmann, B., Mowat, A. P., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Archives of disease in childhood* **67**, 1447-1453 (1992).
- 224 Oo, Y. H. & Adams, D. H. Regulatory T cells and autoimmune hepatitis: what happens in the liver stays in the liver. *Journal of hepatology* **61**, 973-975, doi:10.1016/j.jhep.2014.08.005 (2014).
- 225 Taubert, R. *et al.* Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. *Journal of hepatology* **61**, 1106-1114, doi:10.1016/j.jhep.2014.05.034 (2014).

- 226 Myllymaki, J. M. *et al.* Severity of tubulointerstitial inflammation and prognosis in immunoglobulin A nephropathy. *Kidney international* **71**, 343-348, doi:10.1038/sj.ki.5002046 (2007).
- 227 Lohr, H. F. *et al.* Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* **14**, 161-166 (1994).
- 228 Hermann, G. E. & Rogers, R. C. TNFalpha: a trigger of autonomic dysfunction. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **14**, 53-67, doi:10.1177/1073858407305725 (2008).
- 229 Jiang, Y., Deacon, R., Anthony, D. C. & Campbell, S. J. Inhibition of peripheral TNF can block the malaise associated with CNS inflammatory diseases. *Neurobiology of disease* **32**, 125-132, doi:10.1016/j.nbd.2008.06.017 (2008).
- 230 Kawashima, H. *et al.* mRNA expression of T-helper 1, T-helper 2 cytokines in autoimmune hepatitis in childhood. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* **50**, 284-286, doi:10.1111/j.1442-200X.2008.02584.x (2008).
- 231 Robinson, R. T. *et al.* End-organ damage in a mouse model of fulminant liver inflammation requires CD4+ T cell production of IFN-gamma but is independent of Fas. *Journal of immunology* **182**, 3278-3284, doi:10.4049/jimmunol.0803417 (2009).
- 232 Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine* **13**, 139-145, doi:10.1038/nm1551 (2007).
- 233 Hammerich, L., Heymann, F. & Tacke, F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clinical & developmental immunology* **2011**, 345803, doi:10.1155/2011/345803 (2011).
- 234 Ng, T. H. *et al.* Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in immunology* **4**, 129, doi:10.3389/fimmu.2013.00129 (2013).
- 235 Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* **19**, 683-765, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683 (2001).
- 236 O'Garra, A. & Vieira, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature reviews. Immunology* **7**, 425-428, doi:10.1038/nri2097 (2007).
- 237 Roncarolo, M. G. *et al.* Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* **212**, 28-50, doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x (2006).
- 238 Groux, H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742, doi:10.1038/39614 (1997).
- 239 Beissert, S., Schwarz, A. & Schwarz, T. Regulatory T cells. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 15-24, doi:10.1038/sj.jid.5700004 (2006).
- 240 Trinchieri, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of experimental medicine* **204**, 239-243, doi:10.1084/jem.20070104 (2007).
- 241 Maynard, C. L. & Weaver, C. T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunological reviews* **226**, 219-233, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00711.x (2008).
- 242 Sabatos-Peyton, C. A., Verhagen, J. & Wraith, D. C. Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Current opinion in immunology* **22**, 609-615, doi:10.1016/j.coi.2010.08.006 (2010).

- 243 Royall, J. A. *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability. *The American journal of physiology* **257**, L399-410 (1989).
- 244 Wagner, J. G. & Roth, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacological reviews* **52**, 349-374 (2000).
- 245 Stefferl, A., Hopkins, S. J., Rothwell, N. J. & Luheshi, G. N. The role of TNF-alpha in fever: opposing actions of human and murine TNF-alpha and interactions with IL-beta in the rat. *British journal of pharmacology* **118**, 1919-1924 (1996).
- 246 Cairns, C. B., Panacek, E. A., Harken, A. H. & Banerjee, A. Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine* **7**, 930-941 (2000).
- 247 Dellinger, R. P. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **36**, 1259-1265, doi:10.1086/374835 (2003).
- 248 Pfeffer, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & growth factor reviews* **14**, 185-191 (2003).
- 249 Bankey, P. E., Mazuski, J. E., Ortiz, M., Fulco, J. M. & Cerra, F. B. Hepatic acute phase protein synthesis is indirectly regulated by tumor necrosis factor. *The Journal of trauma* **30**, 1181-1187; discussion 1187-1188 (1990).
- 250 Diehl, A. M. & Rai, R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *Journal of gastroenterology and hepatology* **11**, 466-470 (1996).
- 251 Sheth, K. & Bankey, P. The liver as an immune organ. *Current opinion in critical care* **7**, 99-104 (2001).
- 252 Tsai, E. Y., Jain, J., Pesavento, P. A., Rao, A. & Goldfeld, A. E. Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Molecular and cellular biology* **16**, 459-467 (1996).
- 253 Monastra, G. *et al.* Membrane form of TNF alpha induces both cell lysis and apoptosis in susceptible target cells. *Cellular immunology* **171**, 102-110, doi:10.1006/cimm.1996.0179 (1996).
- 254 Bantel, H. & Schulze-Osthoff, K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell death and differentiation* **10 Suppl 1**, S48-58, doi:10.1038/sj.cdd.4401119 (2003).
- 255 Kodama, S., Davis, M. & Faustman, D. L. The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 1850-1862, doi:10.1007/s00018-005-5022-6 (2005).
- 256 Neuman, M. G. *et al.* Serum tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine* **17**, 108-117, doi:10.1006/cyto.2001.0997 (2002).
- 257 Kamal, S. M. *et al.* Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. *Hepatology* **43**, 771-779, doi:10.1002/hep.21117 (2006).
- 258 Morais, C. N. *et al.* Correlation of biological serum markers with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**, 460-466 (2010).
- 259 Cookson, S. *et al.* Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* **30**, 851-856, doi:10.1002/hep.510300412 (1999).

- 260 Li, S. *et al.* Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) genetic polymorphisms and the risk of autoimmune liver disease: a meta-analysis. *Journal of genetics* **92**, 617-628 (2013).
- 261 Czaja, A. J. *et al.* Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **117**, 645-652 (1999).
- 262 Czaja, A. J. Genetic factors affecting the occurrence, clinical phenotype, and outcome of autoimmune hepatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **6**, 379-388, doi:10.1016/j.cgh.2007.12.048 (2008).
- 263 Tilg, H. *et al.* Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* **103**, 264-274 (1992).
- 264 Maggiore, G., De Benedetti, F., Massa, M., Pignatti, P. & Martini, A. Circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in children with autoimmune hepatitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **20**, 23-27 (1995).
- 265 Horiuchi, T. *et al.* Increased expression of membrane TNF-alpha on activated peripheral CD8+ T cells in systemic lupus erythematosus. *International journal of molecular medicine* **17**, 875-879 (2006).
- 266 Aversa, G., Punnonen, J. & de Vries, J. E. The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *The Journal of experimental medicine* **177**, 1575-1585 (1993).
- 267 Atreya, R. *et al.* In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nature medicine* **20**, 313-318, doi:10.1038/nm.3462 (2014).
- 268 Schwabe, R. F. & Brenner, D. A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **290**, G583-589, doi:10.1152/ajpgi.00422.2005 (2006).
- 269 Iwamoto, S. *et al.* TNF-alpha is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression. *Clinical immunology* **146**, 15-25, doi:10.1016/j.clim.2012.10.008 (2013).
- 270 Annunziato, F. *et al.* Reasons for rarity of Th17 cells in inflammatory sites of human disorders. *Seminars in immunology* **25**, 299-304, doi:10.1016/j.smim.2013.10.011 (2013).
- 271 Ashwell, J. D., Lu, F. W. & Vacchio, M. S. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annual review of immunology* **18**, 309-345, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.309 (2000).
- 272 Weiler-Normann, C., Wiegand, C., Schramm, C. & Lohse, A. W. A case of difficult-to-treat autoimmune hepatitis successfully managed by TNF-alpha blockade. *The American journal of gastroenterology* **104**, 2877-2878, doi:10.1038/ajg.2009.433 (2009).
- 273 Efe, C., Purnak, T. & Ozaslan, E. Anti TNF-alpha therapy can be a novel treatment option in patients with autoimmune hepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **32**, 115; author reply 116-117, doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04316.x (2010).
- 274 Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 in T cell function. *Experimental cell research* **317**, 620-631, doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.017 (2011).
- 275 Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access.* (Elsevier Health Sciences, 2011).
- 276 Erhardt, A. *et al.* CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. *Journal of immunology* **186**, 5284-5293, doi:10.4049/jimmunol.1003750 (2011).

- 277 Ajuebor, M. N., Hogaboam, C. M., Le, T., Proudfoot, A. E. & Swain, M. G. CCL3/MIP-1alpha is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4(+) T cells to the liver. *European journal of immunology* **34**, 2907-2918, doi:10.1002/eji.200425071 (2004).
- 278 Tiegs, G., Hentschel, J. & Wendel, A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *The Journal of clinical investigation* **90**, 196-203, doi:10.1172/JCI115836 (1992).
- 279 Wang, H. X. *et al.* Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World journal of gastroenterology : WJG* **18**, 119-125, doi:10.3748/wjg.v18.i2.119 (2012).
- 280 Larrubia, J. R., Benito-Martinez, S., Calvino, M., Sanz-de-Villalobos, E. & Parra-Cid, T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 7149-7159 (2008).
- 281 Moreno, C. *et al.* CCR5 deficiency exacerbates T-cell-mediated hepatitis in mice. *Hepatology* **42**, 854-862, doi:10.1002/hep.20865 (2005).
- 282 Lacotte, S., Brun, S., Muller, S. & Dumortier, H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173**, 310-317, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04813.x (2009).
- 283 Li, Y. L. *et al.* [Investigate circulating levels of chemokines and evaluate the correlation between these chemokines and liver function indicators in autoimmune hepatitis]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology* **21**, 299-303, doi:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2013.04.014 (2013).
- 284 Nishioji, K. *et al.* Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clinical and experimental immunology* **123**, 271-279 (2001).
- 285 Lee, E. Y., Lee, Z. H. & Song, Y. W. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* **8**, 379-383, doi:10.1016/j.autrev.2008.12.002 (2009).
- 286 Schall, T. J. *et al.* A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *Journal of immunology* **141**, 1018-1025 (1988).
- 287 Song, A., Nikolcheva, T. & Krensky, A. M. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunological reviews* **177**, 236-245 (2000).
- 288 Swanson, B. J., Murakami, M., Mitchell, T. C., Kappler, J. & Marrack, P. RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity* **17**, 605-615 (2002).
- 289 Ajuebor, M. N., Carey, J. A. & Swain, M. G. CCR5 in T cell-mediated liver diseases: what's going on? *Journal of immunology* **177**, 2039-2045 (2006).
- 290 Civatte, M. *et al.* Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathology and applied neurobiology* **31**, 70-79, doi:10.1111/j.1365-2990.2004.00591.x (2005).
- 291 Ponomarev, E. D. *et al.* GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* **178**, 39-48 (2007).
- 292 Codarri, L. *et al.* RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* **12**, 560-567, doi:10.1038/ni.2027 (2011).

- 293 El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* **12**, 568-575, doi:10.1038/ni.2031 (2011).
- 294 Campbell, I. K., Rich, M. J., Bischof, R. J. & Hamilton, J. A. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *Journal of leukocyte biology* **68**, 144-150 (2000).
- 295 Cornish, A. L., Campbell, I. K., McKenzie, B. S., Chatfield, S. & Wicks, I. P. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **5**, 554-559, doi:10.1038/nrrheum.2009.178 (2009).
- 296 Ritz, S. A., Stampfli, M. R., Davies, D. E., Holgate, S. T. & Jordana, M. On the generation of allergic airway diseases: from GM-CSF to Kyoto. *Trends in immunology* **23**, 396-402 (2002).
- 297 van Nieuwenhuijze, A. *et al.* GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Molecular immunology* **56**, 675-682, doi:10.1016/j.molimm.2013.05.002 (2013).
- 298 Shiomi, A. & Usui, T. Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation. *Mediators of inflammation* **2015**, 568543, doi:10.1155/2015/568543 (2015).
- 299 Lapierre, P., Beland, K. & Alvarez, F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **149**, 107-113, doi:10.1016/j.trsl.2006.11.010 (2007).
- 300 Aslan, N. *et al.* Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis. *Journal of viral hepatitis* **13**, 505-514, doi:10.1111/j.1365-2893.2006.00723.x (2006).
- 301 Mahon, B. P. *et al.* Poliovirus-specific CD4+ Th1 clones with both cytotoxic and helper activity mediate protective humoral immunity against a lethal poliovirus infection in transgenic mice expressing the human poliovirus receptor. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1285-1292 (1995).
- 302 Gagnon, S. J., Ennis, F. A. & Rothman, A. L. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *Journal of virology* **73**, 3623-3629 (1999).
- 303 van Leeuwen, E. M. *et al.* Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *Journal of immunology* **173**, 1834-1841 (2004).
- 304 Casazza, J. P. *et al.* Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2865-2877, doi:10.1084/jem.20052246 (2006).
- 305 Brien, J. D., Uhrlaub, J. L. & Nikolich-Zugich, J. West Nile virus-specific CD4 T cells exhibit direct antiviral cytokine secretion and cytotoxicity and are sufficient for antiviral protection. *Journal of immunology* **181**, 8568-8575 (2008).
- 306 Haigh, T. A. *et al.* EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4+ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines. *Journal of immunology* **180**, 1643-1654 (2008).
- 307 Hou, S., Fishman, M., Murti, K. G. & Doherty, P. C. Divergence between cytotoxic effector function and tumor necrosis factor alpha production for inflammatory CD4+ T cells from mice with Sendai virus pneumonia. *Journal of virology* **67**, 6299-6302 (1993).
- 308 Jellison, E. R., Kim, S. K. & Welsh, R. M. Cutting edge: MHC class II-restricted killing in vivo during viral infection. *Journal of immunology* **174**, 614-618 (2005).

- 309 Brown, D. M., Dilzer, A. M., Meents, D. L. & Swain, S. L. CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch. *Journal of immunology* **177**, 2888-2898 (2006).
- 310 Stuller, K. A., Cush, S. S. & Flano, E. Persistent gamma-herpesvirus infection induces a CD4 T cell response containing functionally distinct effector populations. *Journal of immunology* **184**, 3850-3856, doi:10.4049/jimmunol.0902935 (2010).
- 311 Boyman, O. Bystander activation of CD4+ T cells. *European journal of immunology* **40**, 936-939, doi:10.1002/eji.201040466 (2010).
- 312 Leung, D. T., Morefield, S. & Willerford, D. M. Regulation of lymphoid homeostasis by IL-2 receptor signals in vivo. *Journal of immunology* **164**, 3527-3534 (2000).
- 313 Wen, L., Peakman, M., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Elevation of activated gamma delta T cell receptor bearing T lymphocytes in patients with autoimmune chronic liver disease. *Clinical and experimental immunology* **89**, 78-82 (1992).
- 314 Sato, K., Ohtsuka, K., Watanabe, H., Asakura, H. & Abo, T. Detailed characterization of gamma delta T cells within the organs in mice: classification into three groups. *Immunology* **80**, 380-387 (1993).
- 315 Arenz, M., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Lohr, H. F. Limited T cell receptor Vbeta-chain repertoire of liver-infiltrating T cells in autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* **28**, 70-77 (1998).
- 316 Yoshizawa, K. *et al.* T cell repertoire in the liver of patients with autoimmune hepatitis. *Human immunology* **60**, 806-815 (1999).
- 317 Hoshino, Y. *et al.* Limited usage of T-cell receptor beta chains and sequences of the complementarity determining region 3 of lymphocytes infiltrating in the liver of autoimmune hepatitis. *Hepatology* **22**, 142-147 (1995).
- 318 Lohr, H. F., Pingel, S., Weyer, S., Fritz, T. & Galle, P. R. Individual and common antigen-recognition sites of liver-derived T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Scandinavian journal of immunology* **57**, 384-390 (2003).
- 319 Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* **6**, 1123-1132, doi:10.1038/ni1254 (2005).
- 320 Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* **201**, 233-240, doi:10.1084/jem.20041257 (2005).
- 321 Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* **6**, 1133-1141, doi:10.1038/ni1261 (2005).
- 322 Duerr, R. H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461-1463, doi:10.1126/science.1135245 (2006).
- 323 Kotake, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation* **103**, 1345-1352, doi:10.1172/JCI5703 (1999).
- 324 Lock, C. *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine* **8**, 500-508, doi:10.1038/nm0502-500 (2002).
- 325 Pene, J. *et al.* Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *Journal of immunology* **180**, 7423-7430 (2008).

- 326 Harada, K. *et al.* Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clinical and experimental immunology* **157**, 261-270, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03947.x (2009).
- 327 Borrás, E. *et al.* Findings on T cell specificity revealed by synthetic combinatorial libraries. *Journal of immunological methods* **267**, 79-97 (2002).
- 328 Sospedra, M., Pinilla, C. & Martín, R. Use of combinatorial peptide libraries for T-cell epitope mapping. *Methods* **29**, 236-247 (2003).

7.2 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AIH	Autoimmune Hepatitis
Ak	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANA	antinukleäre Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>Antigen presenting cell</i>)
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CDR	<i>complementarity determining region</i>
ConA	Concanavalin A
CSF	Koloniestimulierender Faktor (<i>colony stimulating factor</i>)
C_T	Schwellenwertzyklus (<i>Cycle treshold</i>)
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige (<i>double-stranded</i>) DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FC	Durchflusszytometrie (<i>flow cytometry</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Foxp3	<i>forkhead-box protein 3</i> ; Transkriptionsfaktor
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>Forward Scatter</i>)
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force, rcf</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i> ; Transkriptionsfaktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-CSF
Gy	Gray (Einheit für durch ionisierende Strahlung verursachte Energiedosis)
h	Stunde(n)
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheit (<i>international unit</i>)
kV	Kilovolt
l	Liter
LIL	leberinfiltrierende Lymphozyten (<i>liver infiltrating lymphocytes</i>)
LKM	Mikrosomen der Leber und Niere (<i>liver kidney microsomes</i>)
LSEC	sinusoidale Leberendothelzellen (<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>)
M	molare Masse

mA	Milliampere
M-CSF	Makrophagen-CSF
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	Multiple Sklerose
mTNFα	membrangebundenes TNF α
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis (<i>nonalcoholic steatohepatitis</i>)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PacO-NHS	Pacific Orange- <i>N</i> -Hydroxysuccinimid
PBC	Primär Biliäre Zirrhose
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
qPCR	Quantitative PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RORC	<i>retinoic acid-related orphan receptor C</i> ; Transkriptionsfaktor (human)
RORγT	<i>retinoic acid-related orphan receptor γT</i> ; Transkriptionsfaktor (murin)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SepSecS	O-Phosphoseryl-tRNA:Selenocysteiny-tRNA-Synthase
SLA	Lösliches Leberantigen (<i>soluble liver antigen</i>)
SLA/LP	<i>soluble liver antigen/liver pancreas</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SMA	Antikörper gegen glatte Muskulatur (<i>smooth muscle antibody</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side Scatter</i>)
Tbet	<i>T-box-expressed-in-T-cells</i> ; Transkriptionsfaktor
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>Transforming Growth Factor</i>)
T_H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	regulatorische T-Zellen

7.3 Kongressbeiträge

30. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber - GASL, Tübingen 2014

Leberinfiltrierende CD4 T-Zellen bei der autoimmunen Hepatitis zeigen ein distinktes TH1-Profil

Claudia Bovensiepen, Marcial Sebode, Mireia Sospedra, Roland Martin, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm, Johannes Herkel, Christina Weiler-Normann

The International Liver Congress™ 2014, 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver - EASL, London 2014

Autoimmune Hepatitis is a TH1-driven Disease

Claudia Bovensiepen, Marcial Sebode, Mireia Sospedra, Roland Martin, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm, Johannes Herkel, Christina Weiler-Normann

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse, Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik, möchte ich mich für Möglichkeit bedanken die vorliegende Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen.

Frau Prof. Dr. Susanne Dobler möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Arbeit zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Johannes Herkel für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit, dem Freiraum der Projektgestaltung, seine stets offene Tür bei Fragen sowie der kritischen Begutachtung dieser Arbeit.

Auch Frau Dr. Christina Weiler-Normann danke ich für ihre herzliche Betreuung und das vorbehaltlose Vertrauen in meine Arbeit. Auch möchte ich ihr für die die erste Durchsicht meines Manuskripts danken.

Außerdem möchte ich mich auch bei Frau Dr. Christina Weiler-Normann und Herrn Dr. Marcial Sebode bei der Unterstützung der Probenakquisition bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Marko Hilken für seine absolute Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen. Bei Computerproblemen oder anderen Widrigkeiten des Laboralltags hatte er stets ein offenes Ohr und nahm sich die Zeit, mich zu unterstützen. Auch Agnes Malotta und Christina Trabandt gebührt großer Dank für ihre stete Hilfsbereitschaft, wenn mal wieder Not am Mann war.

Natürlich danke ich auch allen anderen Kollegen des Labors für die herzliche Aufnahme, die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Jessica Rauch, Tanja Schoknecht, Nina Günther und Jan-Hendrik Kozik für ihre Freundschaft und die gemeinsamen Zeit inner- und außerhalb des Labors sowie dem Meistern des alltäglichen Laborwahnsinns. Im speziellen möchte ich Jessica und Tanja auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Schließlich möchte ich bei meinen Freuden, meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für ihre vorbehaltlose Unterstützung und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten bedanken.

Last but not least danke ich von ganzem Herzen meinem Freund Norman Jahn für seine Geduld und seinen Rückhalt, gerade in den letzten Monaten.

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit und sämtliche Ergebnisse selbständig erarbeitet und verfasst habe. Dazu wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Ort/Datum

Claudia Simone Bovensiepen