

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik des Zentrums für Innere Medizin

Prof. Dr. Ansgar Wilhelm Lohse

Untersuchungen zur Rolle der Autoimmunantwort gegen SepSecS bei Leberentzündung im Mausmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Falko Clemens Schulte
aus Aachen

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 4. Juli 2016**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. Herkel

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. G. Tiegs

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Wenn man etwas wirklich verstehen will,
muss man es zu ändern versuchen.

(Autor unbekannt)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	08
1. Autoimmune Hepatitis	08
1.1 Definition und Klassifikation.....	08
1.2 Autoantikörper	08
1.3 SepSecS.....	09
1.4 Epidemiologie und Genetik.....	10
1.5 Klinik, Diagnostik und Therapie.....	11
1.6 Ätiopathogenetische Aspekte.....	12
1.7 Mausmodelle.....	15
2. Entwicklung und Vorergebnisse des Mausmodells	17
3. Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
3.1 Analyse von SLA/LP- und Antinukleären Antikörpern.....	18
3.2 Beschreibung der histologischen Entzündungsaktivität...	18
3.3 T-Zellreaktivität und Quantifizierung der Zytokinantwort nach Restimulation.....	18
3.4 Phänotypisierung der beteiligten Leber-infiltrierenden T-Lymphozyten.....	19
II. Material und Methoden	20
1. Material	20
1.1 Versuchstiere.....	20
1.2 Allgemeine Materialien.....	20
1.3 Materialien für die Produktion des murinen SepSecS Proteins.....	21
1.4 Materialien für den Nachweis des SepSecS-Proteins.....	22
1.5 Materialien für die Immunhistochemie.....	22
1.6 Antikörper und Beads.....	23
1.7 Kits.....	23
1.8 Medien, Puffer und Gele.....	23
1.9 Geräte.....	25
1.10 Software.....	26

2. Methoden	27
2.1 Produktion des murinen SepSecS-Proteins.....	27
2.1.1 Transformation eines SepSecS-Plasmids in kompetente Bakterien.....	27
2.1.2 Aufschluss des SepSecS-Proteins.....	28
2.1.3 His-tag/Metallchelat-Chromatographie.....	28
2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	29
2.1.5 Dialyse.....	29
2.1.6 Nachweis des SepSecS-Proteins.....	29
2.2 SepSecS-induzierte Immunreaktionen im murinen Lymphknoten (Versuchsaufbau 1).....	32
2.2.1 Auslösung der SepSecS-induzierten Immunreaktion.....	32
2.2.2 Entnahme und Aufbereitung der Lymphknoten..	33
2.2.3 Restimulation.....	33
2.2.4 Messung der Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand.....	33
2.3 Modell der SepSecS-induzierten Leberentzündung.....	34
2.3.1 Mausstämme.....	34
2.3.2 Induktion der Hepatitis.....	34
2.4 Phänotypisierung der an der Leberentzündung beteiligten Lymphozyten (Versuchsaufbau 2).....	35
2.4.1 Entnahme und Aufbereitung der Leber.....	35
2.4.2 Restimulation.....	36
2.4.3 Lebend-Tot-Färbung.....	37
2.4.4 Färbung von Oberflächen-Antigenen der Lymphozyten.....	37
2.4.5 Intrazelluläre Zytokin- und Antigenfärbung der Lymphozyten.....	37
2.4.6 Zellanalyse mittels FACS.....	38
2.5 Histologie.....	40
2.5.1 Paraffin-Einbettung der Organe.....	40
2.5.2 Herstellung der Schnitte.....	40
2.5.3 Hämatoxilin-Eosin Färbung nach Meyer.....	40

2.5.4 Semiquantitative Beurteilung der histologischen Entzündungsreaktionen.....	40
2.6 Serum-Analysen.....	42
2.6.1 ELISA-Analyse (SLA/LP-Antikörper).....	42
2.6.2 Ermittlung eines Referenzwerts für Mäuse.....	42
2.6.3 Analyse von Antinukleären Antikörpern.....	43
2.7 Statistische Auswertung.....	44
III. Ergebnisse.....	45
1. Analyse von SLA/LP-Antikörpern im Serum.....	45
2. Analyse von Antinukleären Antikörpern im Serum.....	45
3. Semiquantitative Beurteilung der histologischen Entzündungsreaktionen der untersuchten Mausstämme.....	46
4. Analyse der Zytokinkonzentrationen im Überstand von <i>in-vitro</i> restimulierten Lymphknoten- und Leberzellen mittels ELISA.....	49
4.1 Versuchsaufbau 1 – Lymphknotenzellen.....	49
4.2 Versuchsaufbau 2 – Leberzellen.....	51
5. FACS-Analyse der nicht-parenchymatösen Leberzellen.....	53
5.1 Populationsanalyse.....	53
5.2 Analyse der zytokinproduzierenden Zellen.....	56
5.2.1 IFN- γ produzierende Zellen.....	56
5.2.2 IL-17 produzierende Zellen.....	61
5.2.3 IL-17 und IFN- γ produzierende Zellen.....	63
IV. Diskussion.....	65
1. Autoantikörper.....	65
2. Grading der histologischen Entzündungsreaktion.....	67
3. Effektormechanismen beteiligter Lymphozyten.....	68
4. Komposition und Effektorzytokine der Leber-infiltrierenden Lymphozyten.....	69
5. Kritische Betrachtung.....	73
V. Zusammenfassung.....	76
VI. Summary.....	77
VII. Abkürzungsverzeichnis.....	78

VIII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	80
IX. Literaturverzeichnis.....	81
X. Danksagungen.....	88
XI. Lebenslauf.....	89
XII. Eidesstattliche Erklärung.....	90

I. Einleitung

1. Autoimmune Hepatitis

1.1 Definition und Klassifikation

Die Autoimmune Hepatitis (AIH) ist eine seltene inflammatorische Lebererkrankung mutmaßlich autoimmuner Genese. Das klinische Bild beinhaltet neben einer Transaminasämie eine Hypergammaglobulinämie, sowie regelhaft auch den serologischen Nachweis von Autoantikörpern (Hennes et al. 2008, Longhi et al. 2009). Die Prävalenz der AIH liegt in der kaukasischen Bevölkerung bei etwa 1:10.000 (Werner et al. 2008). In etwa drei bis acht Prozent der Fälle ist das Leberversagen als Folge einer AIH für eine Lebertransplantation verantwortlich (Duclos-Vallee und Sebagh 2009). Die AIH betrifft Frauen mit einem Verhältnis von 3:1 deutlich häufiger als Männer und kann in jedem Lebensalter auftreten, hat jedoch einen Erkrankungsgipfel in der vierten Lebensdekade (Lohse und Mieli-Vergani 2011). Die Autoimmune Hepatitis wird in die zwei serologisch und klinisch unterschiedlichen Typen 1 und 2 eingeteilt. Der Typ 1 ist charakterisiert durch das Auftreten von Antinukleären Antikörpern (ANA) und/oder Antikörper gegen glatte Muskulatur (Smooth Muscle Antibody, SMA), und/oder Antikörper gegen das lösliche Leberantigen/Leber-Pankreas-Antigen (Soluble Liver Antigen/Liver Pankreas Antigen, SLA/LP). Die Manifestation erfolgt überwiegend im Erwachsenenalter. Der Typ 2 ist charakterisiert durch Antikörper gegen Leber-Niere-Mikrosomen 1 (Antibodies against liver-kidney microsomes, Anti-LKM-1) und/oder Antikörper gegen Leberzytosol 1 (Antibodies against liver cytosol 1, Anti-LC-1). Der Typ 2 tritt meist im Kindes- oder Jugendalter auf und scheint einen deutlich aggressiveren Verlauf zu nehmen als die AIH Typ 1 (Krawitt 2006).

1.2 Autoantikörper

Bei der Autoimmunen Hepatitis treten in 44 % der Fälle Antinukleäre Antikörper auf (Lohse et al. 1995). ANA gehen mit einer Zerstörung von Zellen und der Freisetzung von Antigenen aus dem Zellkern einher, von denen viele jedoch noch nicht identifiziert sind (Czaja et al. 1994). Die Antikörper gegen glatte Muskulatur richten sich gegen F-Aktin, welches als Strukturprotein im

Zytoskelett fungiert (Frenzel et al. 2006). ANA und SMA werden mittels Immunfluoreszenz-Verfahren detektiert und gelten ab einem Titer von 1:80 als positiv. Zwischen 70-80 % der Patienten sind für ANA oder SMA, oder beide Autoantikörper positiv (McFarlane 2002). Weder ANA noch SMA sind spezifische Autoantikörper für die AIH. Bei Patienten mit einer Hepatitis B- oder Hepatitis C-Virusinfektion, sowie zahlreichen weiteren Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, dem systemischen Lupus Erythematoses oder Vaskulitiden werden auch ANA oder SMA-Autoantikörper nachgewiesen (Czaja et al. 1994, Lohse et al. 1995). Die Höhe der Autoantikörper-Titer (ANA, SMA) können während der Erkrankung fluktuieren, spiegeln aber im Allgemeinen nicht die Schwere der Erkrankung wieder (Czaja 1999).

In bis zu 19 % der Fälle finden sich SLA/LP-Antikörper in den Seren der Patienten mit einer Autoimmunen Hepatitis. Im Unterschied zu den anderen Autoantikörpern, die bei der AIH auftreten, sind die SLA/LP-Antikörper spezifisch für die AIH (Baeres et al. 2002). Der Nachweis der SLA/LP-Antikörper erfolgt nach einem diagnostischen Stufenschema. Zunächst werden SLA/LP-Antikörper über einen Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) detektiert und anschließend mit einem Westernblot bestätigt. Mit diesem Verfahren wird eine 99%ige Spezifität und 100%ige Sensitivität beim Nachweis von SLA/LP-Antikörpern erreicht (Baeres et al. 2002, Krawitt 2006).

1.3 SepSecS

Bei dem Begriff der SLA/LP-Antikörper handelt es sich um die zusammengeführte Bezeichnung zweier identischer Autoantikörper, von denen man einige Zeit annahm, sie hätten unterschiedliche Antigene als Zielstrukturen. So beschrieb die Arbeitsgruppe um Manns die SLA-Antikörper, die sich gegen ein lösliches Leberantigen richten (Manns et al. 1987), und die Arbeitsgruppe um Stechemesser die Antikörper gegen LP, die ihre zytosolischen Zielstrukturen in Leber- und Pankreaszellen haben (Stechemesser et al. 1993).

Im Jahr 2000 wurde das Antigen schließlich kloniert und für beide Antikörper dasselbe Zielantigen beschrieben (Wies et al. 2000). Hierbei handelt es sich um

O-Phosphoseryl-tRNA:Selenocysteinyl-tRNA-Synthase (SepSecS). SepSecS ist das hochkonservierte Enzym, das in Eukaryoten und Archaeen den letzten Schritt der Selenocysteininformation katalysiert (Yuan et al. 2006). Eine erhöhte Expression von SepSecS findet man in der Leber, des Weiteren in der Lunge, den Nieren und dem Pankreas, sowie in aktivierten Lymphozyten. Die SLA/LP-Antikörper reagieren mit einem immundominanten Epitop im Bereich der Aminosäuren 371 - 409 am Carboxy-Terminus des Proteins (Wies et al. 2000). Sie gehören überwiegend zum Subtyp Immunglobulin G1 (IgG1), was nahelegt, dass sie durch eine bei allen Patienten ähnliche spezifische Immunantwort entstanden sind (Herkel et al. 2002). Eine Verknüpfung von humoraler und zellulärer Immunantwort in der Autoimmunen Hepatitis konnte 2008 gezeigt werden (Mix et al. 2008). In der Publikation werden zwei Humane Leukozytenantigen (HLA)-DRB1*0301-restringierte Epitope des SepSecS-Proteins beschrieben, die von CD4+ T-Zellen erkannt werden können. Eines der beiden T-Zell Epitope überschneidet sich dabei mit dem dominanten von den SLA/LP-Antikörpern erkannten Epitop. Dieses Phänomen wurde von der Arbeitsgruppe um Wucherpfennig schon im Jahre 1997 für die Multiple Sklerose, einer anderer Autoimmunerkrankung, beschrieben (Wucherpfennig et al. 1997).

1.4 Epidemiologie und Genetik

Die AIH ist eine multifaktorielle Erkrankung. Neben möglichen äußeren Einflüssen wie hepatotropen Viren oder Xenobiotika spielen genetische Ursachen eine entscheidende Rolle. In der kaukasischen Bevölkerung besteht beispielsweise eine hohe Korrelation der AIH mit den HLA-Haplotypen DRB1*0301 und DRB1*0401. Diese beiden Allele werden in bis zu 80 % der Patienten mit AIH Typ 1 gefunden (Donaldson et al. 1991). Sie scheinen nicht nur eine Bedeutung für die klinische Ausprägung der Erkrankung zu haben, sondern auch für das Ansprechen auf eine Kortikosteroid-Therapie (Czaja 1997). Der Haplotyp DRB1*1501 hingegen scheint protektiv auf die AIH Typ 1 zu wirken (Strettell et al. 1997). Dass auch die ethnische Abstammung in der Ätiopathogenese eine Rolle spielt, legen regional unterschiedliche genetische Assoziationen nahe: In Japan, Mexiko und Argentinien besteht eher eine Suszeptibilität für die AIH Typ 1 mit dem Allel DRB1*0405. Dies lässt

vermuten, dass möglicherweise verschiedene genetische HLA-Assoziationen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen für den Krankheitsprozess bestimmend sind. Die krankheitsauslösenden Peptide, welche über HLA-Klasse-II-Moleküle T-Zell-Rezeptoren präsentiert werden, scheinen sich strukturell zu unterscheiden und entstammen damit möglicherweise verschiedener Antigene (Longhi et al. 2009). Derzeit liegen keine validen Studien an Zwillingen zur AIH vor, aber einige Fallstudien beschreiben bei eineiigen Zwillingen sowohl konkordante als auch diskordante Manifestationen einer AIH Typ 2 (Manns 1990, Nolte et al. 1995).

Patienten mit einer AIH weisen eine erhöhte Prädisposition für andere Autoimmunerkrankungen auf, so treten beispielsweise gehäuft Hashimoto-Thyreoiditis, Vitiligo und Diabetes mellitus Typ 1 auf (Lohse und Mieli-Vergani 2011).

1.5 Klinik, Diagnostik und Therapie

Die klinische Symptomatik einer AIH kann vielfältig und heterogen sein. Sie reicht vom fulminanten, akuten Leberversagen bis hin zu mildereren, bisweilen sogar subklinischen Symptomen. Häufig stellen sich Patienten mit unterschiedlich starken unspezifischen Erstsymptomen wie generalisierter Müdigkeit, Unwohlsein, Gelenkschmerzen oder Pruritus vor (Krawitt 2006). Ein Charakteristikum bei vielen Patienten mit einer AIH ist der fluktuierende Verlauf der Erkrankung, einhergehend mit einer entsprechenden Veränderung der klinischen Symptomatik und biochemischen Marker (McFarlane 2002). Die AIH manifestiert sich klinisch typischerweise mit erhöhten Serumtransaminasen, einer Hypergammaglobulinämie, charakteristischen Autoantikörpern und einem intrahepatischen hauptsächlich lymphozytären Zellinfiltrat (Krawitt 2006). Mit Ausnahme der erhöhten Serumtransaminasen als eine „conditio sine qua non“ einer Hepatitis fließen diese Parameter in die „Simplified Diagnostic Criteria for Autoimmune Hepatitis“ der International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) ein (**siehe Tabelle 1**). Hier werden bestimmten Ausprägungen der Symptome Punkte zugeordnet, die ab einer Summe von größer fünf Punkten eine AIH als wahrscheinlich und ab größer sechs Punkten als sicher einstufen (Hennes et al. 2008).

Tabelle 1: Vereinfachte Diagnosekriterien der AIH (Hennes et al. 2008)

Variablen	Kriterien	Punkte
Autoantikörper	ANA oder SMA \geq 1:40	1
	ANA oder SMA \geq 1:80 oder LKM \geq 1:40 oder SLA/LP	2
IgG (oder Immunglobuline)	Oberhalb des Referenzwerts	1
	>1,1-fach oberhalb des Referenzwerts	2
Leberhistologie	Vereinbar mit der AIH	1
	Typisch für die AIH	2
Abwesenheit einer viralen Hepatitis	Ja	2
	Nein	0

Die Hypergammaglobulinämie und Transaminasämie sind nicht nur ein wichtiger diagnostischer Marker, sie spielen auch während der Behandlung eine Rolle als Verlaufsparemeter (Lohse und Mieli-Vergani 2011).

Als Behandlungsstrategie hat sich eine Kombinationstherapie aus Glukokortikoiden und Azathioprin als Standard durchgesetzt, die nicht nur das Befinden der Patienten bessert, sondern auch Spätfolgen wie Leberzirrhose und Tod verhindern kann (Lohse und Mieli-Vergani 2011). Zur Erhaltung der Remission gilt Azathioprin als Mittel der Wahl (Stellon et al. 1988). Bei individuell angepasster Therapie haben AIH-Patienten eine nahezu unveränderte Lebenserwartung im Vergleich zur Normalbevölkerung (Kanzler et al. 2001), wobei aber Rezidive mit einer schlechteren Langzeitprognose assoziiert sind (Yoshizawa et al. 2012).

1.6 Ätiopathogenetische Aspekte

Das Verständnis der Ätiologie der Autoimmunen Hepatitis liegt noch in den Anfängen und bedarf weiterer Erforschung. Eine Hypothese postuliert die Anwesenheit von Virusepitopen zu Beginn der Erkrankung, die über molekulares Mimikry eine Kreuzreaktivität der Immunzellen mit Leberantigenen verursachen. Hier scheinen die Masern-Viren, Cytomegalie-Viren, Epstein-Barr-Viren, aber vor allem die Hepatitis-Viren eine Rolle zu spielen (Krawitt 2006). Trotzdem finden sich keine signifikanten Assoziationen zwischen einer ausgebrochenen Hepatitis A-, B- oder C-Infektion und der Autoimmunen Hepatitis bei diesen Patienten (Lohse et al. 1995).

Die AIH trägt alle Merkmale einer Autoimmunerkrankung. Die genetischen Assoziationen mit verschiedenen HLA-Klasse-II Genen deuten darauf hin, dass die Präsentation von spezifischen Peptiden für restringierte CD4+ T-Helferzellen einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese darstellt (Lohse und Mieli-Vergani 2011).

Um die immunologische Homöostase aus dem Gleichgewicht zu bringen und die Selbsttoleranz zu durchbrechen, muss ein solches spezifisches Peptid über die HLA-Klasse-II Moleküle der professionell Antigen-präsentierenden Zellen (pAPC) naiven CD4+ T-Helferzellen (T_{H0}) präsentiert werden. Die aktivierten T_{H0} -Zellen können nun, abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu, weitere Wege einschreiten, die zu unterschiedlichen pathogenetischen Aspekten der AIH führen (Longhi et al. 2009) **(siehe Abbildung 1)**.

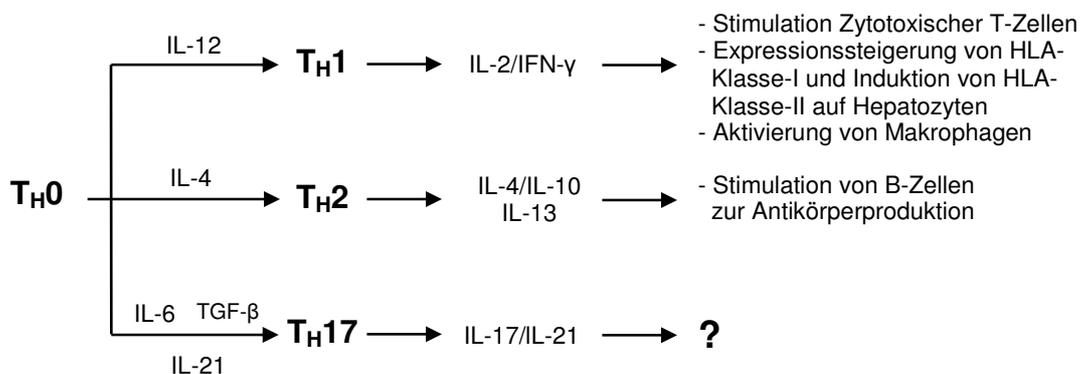


Abbildung 1: Differenzierungspfade der T_{H0} -Zellen

Naive T_{H0} -Zellen entwickeln sich in bestimmten Zytokinmilieus zu T_{H1} -, T_{H2} - und T_{H17} -Zellen, die ihrerseits wieder spezifische Zytokine mit unterschiedlichen Wirkungen sezernieren (Steinman 2007, Korn et al. 2009, Longhi et al. 2009). IFN- γ = Interferon-gamma, IL = Interleukin, TGF- β = Transforming Growth Factor-beta/Transformierender Wachstumsfaktor-beta

Zhao und Mitarbeiter zeigten, dass in humanem Plasma die IL-17 und IL-23 Konzentrationen bei AIH-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten und Patienten mit chronischer Hepatitis B signifikant erhöht waren (Zhao et al. 2011). Des Weiteren zeigte sich auch eine signifikante Erhöhung der T_{H17} -Zellen in den peripheren mononukleären Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) von AIH-Patienten gegenüber denen von Gesunden und Patienten mit chronischer Hepatitis B. Durch immunhistochemische Färbungen von IL-17 konnten sie ebenfalls zeigen, dass in AIH-Patienten im Vergleich zu Patienten mit einer chronischen Hepatitis B der Grad der

Entzündung zwar identisch ist, aber bei der AIH deutlich mehr IL-17+ Zellen in der Leber vorkommen, insbesondere in den Portalfeldern und Gebieten mit Lymphozyteninfiltrationen (Zhao et al. 2011).

Rolle der humoralen Immunität

Die Rolle der Autoantikörper in der Pathogenese der Autoimmunen Hepatitis ist ebenfalls nicht abschließend geklärt. Einen ersten Hinweis auf eine mögliche pathogene Wirkung gab es 1987 durch Studien von Vergani et al., in denen gezeigt wurde, dass Hepatozyten von AIH-Patienten auf ihrer Oberfläche gebundene Antikörper tragen, die eine zytotoxische Reaktion auslösen, wenn sie mit allogenen mononukleären Zellen in Kontakt kommen, der sogenannte Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität-Mechanismus (Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) (Vergani et al. 1987). Unterstützt wird die Hypothese einer Antikörperbeteiligung am Leberzellschaden durch die Entdeckung, dass Hepatozyten auf ihrer Zellmembran das Zielantigen der LKM-1 Antikörper, Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6), tragen. Davon ausgehend lässt sich vermuten, dass im physiologischen Zustand eine Toleranz gegenüber oberflächlich exprimiertem CYP2D6 besteht, welche im Laufe der Entstehung der AIH Typ 2 durchbrochen wird und das Selbstantigen CYP2D6 zu einem Ziel für autoreaktive Immunzellen werden lässt (Muratori et al. 2000).

Rolle der zellulären Immunität

In verschiedenen Studien konnte sowohl für T-Zellpopulationen (Wen et al. 1990) als auch für Nicht-T-Zellpopulationen (Vergani et al. 1979) eine zytotoxische Wirkung auf Hepatozyten nachgewiesen werden. Hierbei wurden unterschiedliche Membranproteine als Zielstrukturen zellulärer Angriffe beschrieben. Wen et al. konnte zeigen, dass ein Großteil der Klone aus dem peripheren Blut der AIH-Patienten von CD4+ T-Zellen mit $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor (T cell receptor, TCR) abstammen, während im Lebergewebe die Klone der CD4-CD8- T-Zellen mit $\gamma\delta$ TCR oder CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen überwogen (Wen et al. 2001). Beide aus der Leber gewonnen Subtypen von Zellklonen konnten in Anwesenheit von Leberantigenen, wie Leber-spezifisches Lipoprotein (Liver specific lipoprotein, LSP) und Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) proliferieren.

Eine wichtige Steuerfunktion über die oben beschriebenen Differenzierungs- und Aktivierungsprozesse übernehmen regulatorische T-Zellen (T_{Regs}). T_{Regs} sind $CD4^+$ T-Zellen, die sowohl den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead-Box-Protein P3), als auch konstitutiv die alpha-Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) exprimieren. Im gesunden Menschen machen $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T_{Regs} etwa fünf Prozent der gesamten $CD4^+$ T-Zellen aus. Es scheint, als seien T_{Regs} daran beteiligt, das eigene Immunsystem in seiner Aktivität zu unterdrücken, um so die Immuntoleranz gegenüber Selbstantigenen zu erhalten. In einer Vielzahl an Autoimmunerkrankungen wurde eine zentrale Beteiligung von T_{Regs} bereits nachgewiesen (Sakaguchi 2004, Sakaguchi et al. 2008).

Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl an T_{Regs} bei Patienten mit einer aktiven Hepatitis deutlich erhöht ist im Vergleich zu AIH-Patienten in Remission. Dennoch zeigen Patienten mit einer aktiven Autoimmunen Hepatitis im Vergleich zu gesunden Probanden eine ähnliche Anzahl an zirkulierender T_{Regs} . Auch die Suppressorfunktion der T_{Regs} scheint in Patienten mit einer AIH im Vergleich zu gesunden Probanden nicht verringert zu sein (Peiseler et al. 2012).

1.7 Mausmodelle

Bei Mausmodellen, im Vergleich zur Forschung am Menschen, kann der Krankheitsprozess von Beginn an und nicht erst mit den frühen Symptomen beobachtet werden. Ein weiterer Vorteil ist auch, dass in verschiedenen Mausmodellen Teilaspekte der ganzen Erkrankung dargestellt werden können.

Die ersten Modelle der Experimentellen Autoimmunen Hepatitis (EAH) beruhten auf der Immunisierung von C57BL6-Mäusen mittels einer Suspension aus allogenen Leberantigenen und dem Immunverstärker Komplettes Freund'sches Adjuvans (Complete Freund's Adjuvant, CFA). Die Wirkung von CFA, als Wasser-Öl-Emulsion, besteht in einer Verstärkung der lokalen Immunantwort durch die darin enthaltenden inaktivierten Bestandteile von Mykobakterien. Hier zeigten sich in den meisten Mäusen zwar überwiegend nur milde entzündliche Infiltrate, aber einige entwickelten auch eine schwere periportale Infiltration. Mit diesem Modell gelang auch zum ersten Mal der adoptive Transfer der Hepatitis durch isolierte Milzzellen. Diese Untersuchungen lassen eine zelluläre

Komponente in der Pathogenese vermuten (Scheiffarth et al. 1965, Scheiffarth et al. 1967). Kuriki et al. präsentierten 1983 ein Mausmodell mit syngener Leberantigen-Immunisierung, bei dem alle Mäuse milde bis moderate entzündliche Läsionen in der Leber entwickelten. Hier wurde auch schon die Entwicklung von Antikörpern gegen Leberantigene beschrieben (Kuriki et al. 1983). Ein weiterer wichtiger Schritt in der Entwicklung der EAH-Mausmodelle war die Testung verschiedener Zellfraktionen zur Immunisierung. Es etablierte sich mit Mori et al. die Immunisierung mit S100, einem definierten Überstand nach Ultrazentrifugation frischen Leberhomogenisats. Hierbei zeigten sich sehr unterschiedliche genetische Suszeptibilitäten. Eine Immunisierung bei C57BL6-Mäusen war besonders effektiv hinsichtlich der Entwicklung einer EAH, ganz im Gegensatz zu BALB/C- und C3H/He-Mäusen (Mori et al. 1984).

Die Arbeitsgruppe um Lohse immunisierte die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Suspension aus S100 und CFA und erreichten so eine stärkere histologische Reaktion als bei subkutanen oder intramuskulären Injektionen (Lohse et al. 1990). Sie beobachteten auch den Verlauf der histologischen Aktivität. Diese entwickelte sich zunächst von einer überwiegend portal und zentrilobulären Infiltration durch polymorphonukleäre Leukozyten und begleitende Lymphozyten über dichte lobuläre Nekrosezonen bis hin zu Granulomen. Die Serumtransaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) stiegen entsprechend des entstandenen Zellschadens in der Leber an. Sowohl die biochemischen als auch die histologischen Marker zeigten ein Maximum der Entzündung in der vierten Woche an, wobei in der Histologie auch nach sechs Monaten immer noch eine moderate Entzündung nachzuweisen war. Es entwickelten sich auch Autoantikörper, die aber im weiteren Verlauf nicht mit der Entzündungsreaktion korrelierten.

2. Entwicklung und Vorergebnisse des Mausmodells

Mit bisher unveröffentlichten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Lohse und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass IL-10 defiziente C57BL/6-Mäuse (IL-10^{-/-}) suszeptibel für die Entwicklung einer Hepatitis sind, wenn sie mit einer Emulsionslösung aus dem Protein SepSecS und dem Immunverstärker CFA zweimalig intraperitoneal im Abstand mehrerer Wochen immunisiert werden (unveröffentlichte Daten). IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches durch eine Reduktion der Antigenpräsentation und Inhibition der T-Zell-Aktivität seine Wirkung entfaltet und von einer Vielzahl von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems produziert werden kann (Saraiva und O'Garra 2010). Seine bedeutende Rolle in der Unterdrückung von Entzündungszuständen wurde durch das gezielte Einbringen einer IL-10-Defizienz in der Maus deutlich. Hierdurch kam es bei den Mäusen nach einiger Zeit zur chronischen Enterokolitis, die wahrscheinlich auf einer entzündlichen Reaktion gegen Darm-eigene Antigene beruht. Insgesamt scheinen sich die IL-10^{-/-} Mäuse durch das Fehlen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in einem ständigen Zustand erhöhter Entzündungsbereitschaft zu befinden (Kuhn et al. 1993, Rennick et al. 1995, Grutz 2005).

Die SepSecS/CFA-immunisierten IL-10^{-/-} Mäuse zeigten eine spezifische Entzündung der Leber, auf die im weiteren Verlauf dieser Dissertation noch näher eingegangen wird. Andere Mausstämme wie BALB/C oder die C57BL/6-Wildtypen entwickelten keine derartige Hepatitis nach SepSecS-Immunsierung. Zur Untersuchung der Zytokinantwort wurden den Mäusen zehn Tage nach SepSecS/CFA-Injektion in die Hinterpfoten die drainierenden Lymphknoten entnommen, aufgereinigt und restimuliert. Nach Restimulation mit SepSecS zeigten IL-10^{-/-} Mäuse im Unterschied zu den Wildtypen eine deutlich erhöhte proinflammatorische Zytokinantwort, die durch massiv erhöhtes IL-6 und IL-17, sowie erhöhtes IFN- γ charakterisiert war (Arbeitsgruppe Lohse, unveröffentlichte Ergebnisse). In Mäusen konnte IL-6 im Zusammenspiel mit TGF- β die Differenzierung von naiven T_H0-Zellen in T_H17-Zellen induzieren (Bettelli et al. 2006). Gleichzeitig scheint IL-17 aber auch die IL-6-Produktion von einigen Zelltypen, darunter Fibroblasten und Hepatozyten, zu forcieren. Dabei entsteht eine positive Rückkopplung, die zu einer gesteigerten Generierung von T_H17-Zellen führt (Ogura et al. 2008, Zhao et al. 2011).

3. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Dissertation ist es, das Mausmodell der SepSecS-induzierten Leberentzündung näher zu charakterisieren, sowie die beteiligten autoreaktiven Zellen zu phänotypisieren. Um die Einflüsse des genetischen Hintergrunds einer suszeptiblen IL-10^{-/-} Maus besser nachvollziehen zu können wurden als Vergleichsgruppen zu den im Modell verwendeten IL-10^{-/-} Mäusen C57BL/6 Wildtypen (WT) herangezogen. Das Mausmodell der SepSecS-induzierten Autoimmunen Hepatitis sollte hinsichtlich der bekannten charakteristischen Merkmale der humanen AIH, wie beispielsweise die Bildung spezifischer SLA/LP-Antikörper oder die charakteristische histologische Entzündung, verglichen werden. Zur Charakterisierung wurden vier Themenfelder untersucht:

3.1 Analyse von SLA/LP- und Antinukleären Antikörpern

Fragestellung: Kommt es nach mehrmaliger SepSecS-Immunsierung von IL-10^{-/-} Mäusen und WT auch zur Bildung von den für die AIH typischen Autoantikörpern? Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden beispielhaft zwei charakteristische Autoantikörper der AIH näher im Mausmodell untersucht: 1.) Antinukleäre Antikörper, die sich gegen eine Vielzahl an Kernstrukturen in der Zelle richten und 2.) SLA/LP-Antikörper, die spezifisch bei einem Subtyp der AIH gebildet werden.

3.2 Beschreibung der histologischen Entzündungsaktivität

Fragestellung: Lässt sich die histologische Entzündungsaktivität im Mausmodell der SepSecS-induzierten Autoimmunen Hepatitis durch die Anwendung eines histologischen Scores für das Grading der Entzündungsaktivität in den histologischen Schnitten darstellen? Sind dadurch mögliche Parallelen zur Histologie der humanen AIH erkennbar?

3.3 T-Zellreaktivität und Quantifizierung der Zytokinantwort nach Restimulation

Fragestellung: Zeigen die Leber-infiltrierenden Lymphozyten (LIL) eine ähnliche T-Zellreaktivität wie die untersuchten Lymphknotenzellen? In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass Lymphknotenzellen aus SepSecS-immunisierten

IL-10^{-/-} Mäusen ein deutlich ausgeprägteres proinflammatorisches Zytokinmilieu erzeugten als WT-Zellen. Hierauf aufbauend sollte die Zytokinantwort auf spezifische (SepSecS) und unspezifische (Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/Ionomycin) Restimulation von isolierten Leber-infiltrierenden T-Lymphozyten innerhalb dieses Mausmodells untersucht werden.

3.4 Phänotypisierung der beteiligten Leber-infiltrierenden T-Lymphozyten

Fragestellung: Welchen Einfluss übt der genetische Hintergrund der IL-10-Defizienz auf die Einwanderung der T-Zellen in die Leber aus und reagieren T-Zellen aus IL-10^{-/-} Mäusen anders auf eine spezifische Restimulation mit SepSecS als die WT-Zellen? Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollten die Leber-infiltrierenden T-Lymphozyten auf ihr Verhältnis von beteiligten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und auf mögliche funktionelle Unterschiede in ihrem Zytokinprofil analysiert werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Versuchstiere

Für die Versuchsaufbauten 1 und 2 (siehe II. 2.2 - 2.4) wurden die Mausstämme C57BL/6 (WT) und Interleukin-10 defiziente C57BL/6 (IL-10^{-/-}) verwendet. Beim Versuchsaufbau 1 wurden sieben bis neun Wochen alte Mäuse unterschiedlichen Geschlechts immunisiert. In Versuchsaufbau 2 waren die Tiere zwischen 11-18 Wochen alt. Ein genehmigter Tierversuchsantrag liegt vor.

1.2 Allgemeine Materialien

Accu-Check Lanzetten	Roche, Mannheim
BD GolgiPlug	BD Pharmingen, Heidelberg
BSA (Bovines Serum Albumin)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Capronsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
(CFA) Complete Freund Adjuvant	Difco Laboratories, Detroit, USA
Cryotube (CryoPure Röhren/CryoPure Tube (1,6ml))	Sarstedt, Nümbrecht
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin-Natrium Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Ulm
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanülen, BD Microlance	BD Biosciences, Heidelberg
Ketamin	aniMedica GmbH, Senden
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach
Nylonsieb Cell Strainer 40 µm, 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Optiprep	Sigma-Aldrich, Steinheim

PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 15 ml, 50 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Röhrchen, Durchflusszytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Rompun 2 %	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Spritzen, BD Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
Stabpipetten	greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter Filtropour V50	Sarstedt, Nümbrecht
Streptomycin/Penicillin	Invitrogen, Darmstadt
Tissue Culture Plate 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Tek	Sakura, Staufen
Trypanblau 0,4 %	Invitrogen, Darmstadt
Zellkulturplatten, Rundboden (96-well-Format)	Sarstedt, Nümbrecht
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

1.3 Materialien für die Produktion des murinen SepSecS-Proteins

Bradford-Reagenz (Roti®-Quant)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BSA-Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BugBuster®	Novagen, EMD Chemicals Inc., USA
Dialysekammern	D-Tube Dialyser Novagen 6-8kDa
E.coli BL21 (DE3)	Stratagene, USA
Einmalküvetten aus Polysterol	Sarstedt, Nümbrecht
Faltenfilter	Rotilabo® , Carl Roth GmbH, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Laktose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB Agar (Ultrapure 35 g/l)	USB Corporation, USA
LB Medium (Broth Ultrapure 20 g/l)	USB Corporation, USA

Lysozym	Merck, Darmstadt
Nuclease (Benzonase® Novagen)	EMD Chemicals Inc., USA

1.4 Materialien für den Nachweis des SepSecS-Proteins

Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Anti-Human IgG-Antikörper	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Coomassielösung (Roti®-Blue)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DAB/metal-Konzentrat (10X) und Peroxidasepuffer	Roche, Deutschland
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roche, Deutschland
Milchpulver (Spinnrad®)	InterTee Handels GmbH, Deutschland
PVDF-Membran 0,2 µm (Immun-Blot™)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein-Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfate) (= Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Temed	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (Trizma®base)	Sigma-Aldrich, USA

1.5 Materialien für die Immunhistochemie

Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen
Eisessig (Essigsäure 100 %)	Merck, Darmstadt
Eosin G – Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Entellan®	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	Th. Geyer GmbH, Renningen
Formaldehyd 37 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Objektträger (Super Frost Plus)	Hecht-Assistent, Sondheim
Roticlear®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

1.6 Antikörper und Beads

Anti-Mouse CD3 (Pe-Cy7)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Mouse CD4 (APC-Cy7)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Mouse CD8 (APC)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Mouse IL-17 (Pe)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Mouse IFN- γ (AlexaFluor 700)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Mouse IFN- γ (FITC)	BD Biosciences, Heidelberg
BD CompBeads, Anti-Mouse	BD Biosciences, Heidelberg
BD CompBeads, Anti-Rat, Anti-Hamster	BD Biosciences, Heidelberg
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD3e	BD Pharmingen, Heidelberg

1.7 Kits

Mouse IFN- γ DuoSet ELISA Development System	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse IL-17 DuoSet ELISA Development System	R&D Systems Wiesbaden
Anti-SLA/LP ELISA (IgG)	Euroimmun AG, Lübeck
Mosaik: Hep-2/Leber (Affe)	Euroimmun AG, Lübeck
Live/Dead® Fixable Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Darmstadt

1.8 Medien, Puffer und Gele

ACK Puffer

150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1,3 mM EDTA, pH 7,4

Anodenpuffer 1

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

Anodenpuffer 2

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

Auftragspuffer

20 mM HEPES (pH 7,9), 8 M Guanidinium-Hydrochlorid

Blocklösung

PBS, 5 % Milchpulver, 0,5 % Tween® 20

Dialysepuffer

20 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 0,01 mM EDTA, 0,02 % SDS

DTT(Dithiothreitol)-Puffer (2fach)

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

Elektrodenpuffer

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

Elutionspuffer

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

Formaldehydlösung, gepuffert (4 %, pH 7,5) (Histologie)

21,62 ml Formalin (37 %) - Ad 200 ml PBS

Kathodenpuffer (SepSecS-Protein-Nachweis)

100 ml 0,25 M TRIS (pH 9,4), 200 ml Methanol, 4,65 ml Capronsäure - Ad 1
Liter H₂O

Laufgel, 10ml (SepSecS-Protein-Nachweis)

4 ml H₂O, 3,3 ml Rotiphorese® Gel 30, 2,5 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8),
0,1 ml SDS (10 %), 0,1 ml Ammoniumpersulfat(10 %), 0,004 ml Temed

LEW-Puffer (SepSecS-Protein-Chromatographie)

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0

PBS (phosphate buffered saline)

2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,3

Sammelgel, 5m (SepSecS-Protein-Nachweis)

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

SOB-Medium (SepSecS-Proteinherstellung)

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

SOC-Medium (SepSecS-Proteinherstellung)

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

Solubilisierungspuffer (SepSecS-Proteinherstellung)

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

Waschlösung (SepSecS-Protein-Nachweis)

PBS, 0,5 % Tween® 20

Waschpuffer (SepSecS-Protein-Chromatographie)

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

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) – Invitrogen, Darmstadt

5 % Fetales Kälber Serum, 1 % Penicillin/Streptomycin

1.9 Geräte

CO ₂ -Inkubator	SANYO Biomedica, München
Digitalkamera Moticam 2500	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ELISA-Auslesegerät (Opsys MRX TC II)	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf
Elektrophoresekammer (Mini-Protean® Tetra Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Durchflusszytometer:	
- LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
- FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Lichtmikroskope	
- Leica Microsystems DM IRB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
- Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Magnetrührer (MR 3001 K)	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Mikrotom (HM 335 E)	Microm, Walldorf
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Werkbank	BDK Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Rollgerät (Stuart SRT6)	Barloworld Scientific Ltd, UK
Scanner (GS-800 Calibrated Densitometer)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Semi-Dry Blotter (PerfectBlue)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spannungsregler (PowerPac Basic)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Tiefkühlgerät (-80 °C) Ultra Low	SANYO Biomedical, USA
Thermo-Rüttler (Thermo Mixer Comfort)	Eppendorf, Hamburg
Vortexer, Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Waage	Kern&Sohn GmbH, Balingen Frommern
Wärmeplatte (Präzitherm)	Störk-Tronic, Stuttgart
Wärme-/Trockenschrank (Heraeus® Function Line)	Thermo Scientific, USA
Zentrifugen	
- Megafuge 2.0	Heraeus Instruments, Osterode
- Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
- Rotanta 460	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Elektrophoreseapparaturen	BIOplastics, BIOzym, Niederlande
Pipettus, Pipet-Boy	Pipetboy acu Integra Biosciences, Schweiz
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Präparierbesteck	VWR International GmbH, Darmstadt

1.10 Software

BD FACSDiva™ Software 6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg
FLOWJO 6.7.1	FlowJo, LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism 4.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

2. Methoden

2.1 Produktion des murinen SepSecS-Proteins

2.1.1 Transformation eines SepSecS-Plasmids in kompetente Bakterien

In den unten beschriebenen Versuchen wurde rekombinantes murines SepSecS-Protein eingesetzt. Für die Produktion dieses Proteins wurde ein laboreigenes Expressions-Plasmid mit His-tag und einer Kanamycin-Resistenz in kompetente Bakterien des *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stammes BL21(DE3) transformiert. Dafür wurden 75 ng beziehungsweise 0,3 µl des Plasmids (250 ng/µl) mit einem 50 µl-Aliquot kompetenter *E.coli* BL21(DE3) in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, für 40 s auf 42 °C erhitzt und direkt danach für fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurde die Suspension für 20 min schüttelnd bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde bei vier Grad Celsius und 1700 G für zwei Minuten zentrifugiert, von dem Überstand 800 µl verworfen und das restliche Präzipitat resuspendiert und auf einer Agarplatte (LB = Luria-Bertani-Agar mit 1 % Glukose und 50 µg/ml Kanamycin) mit einem Plattierungsspatel verteilt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine Bakterienkolonie der Agarplatte wurde ausgewählt und zur Animpfung mit zehn Millilitern LB Medium (1 % Glukose, 50 µg/ml Kanamycin) in einem 15-ml-Reaktionsgefäß schüttelnd bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Im Anschluss wurden die Bakterien dieser Vorkultur bei Raumtemperatur mit 607 G für zehn Minuten abzentrifugiert. Die abgesetzten Bakterien wurden in einem Liter LB Medium auf zwei 500-ml-Kolben verteilt und solange in einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert, bis die Optische Dichte (OD) zwischen 0,8 und 1 lag. Die OD wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Sobald die OD in dem genannten Zielbereich lag, wurde Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (1 mM) und Laktose (1 %) zur Kultur hinzugegeben. Diese wurde in einem Schüttelinkubator dann über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.2 Aufschluss des SepSecS-Proteins

Am Folgetag wurde die Produktionskultur mit 1891 G bei Raumtemperatur für zehn Minuten abzentrifugiert und mit 50 ml BugBuster® (1/20 des Kulturvolumens, beziehungsweise ca. 5 ml/g Pellet) in einem 50 ml Röhrchen resuspendiert. Zur Zerstörung der Zellwand der Bakterien wurde 50 µl Benzonase® (1 µl/ml BugBuster®) hinzugefügt und das Röhrchen für 15 min auf einem Rollgerät in Bewegung gehalten. Es folgte eine Zentrifugation ohne Bremse mit 4755 G bei Raumtemperatur für 30 min. Der Überstand wurde abpipettiert. Das Sediment wurde erneut in 50 ml BugBuster® resuspendiert. Um das SepSecS-Protein aus den intrazellulären Einschlusskörperchen freizusetzen, wurde Lysozym (200 µg/ml) hinzugegeben, anschließend für 30 s gevortext und dann für fünf Minuten bei Ruhe in Raumtemperatur inkubiert.

Die Suspension wurde zur Verdünnung in einem Verhältnis von 1:6 in einen 500-ml-Zentrifugenbecher mit verdünntem BugBuster® (1:10 mit Aqua dest.) vermischt und für eine Minute geschüttelt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation mit 4779 G bei Raumtemperatur für 30 min ohne Bremse vorsichtig abpipettiert und verworfen, während das Präzipitat in 300 ml verdünntem BugBuster® (1:10 mit Aqua dest.) resuspendiert wurde. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Zur Lösung des Proteins wurde das Präzipitat anschließend in 40 ml Solubilisierungspuffer mit β -Mercaptoethanol (20 mM) in einem 50-ml-Reaktionsgefäß aufgenommen und durch einen Magnetrührer für 60 min bei Raumtemperatur durchmischt. Das so herausgelöste Protein wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit Solubilisierungspuffer ohne β -Mercaptoethanol verdünnt und danach mittels eines Faltenfilters filtriert.

2.1.3 His-tag/Metallchelate-Chromatographie

Bei der Chromatographie kamen Nickelmetallchelatsäulen zum Einsatz, die zu Beginn der Chromatographie mit je vier Millilitern LEW-Puffer (Lysis-Equilibration-Wash) äquilibriert wurden. Anschließend wurde jede Säule mit maximal 80 ml des gelösten SepSecS-Proteins beladen. Nachfolgend kamen fünf Milliliter Auftragspuffer und 30ml Waschpuffer.

Zur Elution der SepSecS-haltigen Fraktion liefen mehrere Durchläufe mit jeweils 100 µl Elutionspuffer, welche separat in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen wurden. Zur Dialyse kamen nur die Portionen mit der höchsten Proteinkonzentration, da üblicherweise bei der Dialyse die Hälfte des Proteins verloren geht.

2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration des SepSecS-Proteins wurde die Methode nach Bradford angewandt. Hierbei verschiebt sich das Absorptionsspektrum des „Coomassie brilliant blue G-250“-Farbstoffes nach Bindung von Proteinen im sauren Milieu.

In Einmalküvetten wurden 20 µl des gelösten Proteins auf einen Milliliter mit verdünntem Bradford-Reagenz/Roti®-Quant (1:5 mit H₂O) aufgefüllt. Die Messung der Proben im Photometer erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm, unter Mitführung eines Leerwertes, der nur proteinloses Bradford-Reagenz enthielt. Eine BSA-Standard-Reihe diente zur Eichung damit die Proteinkonzentration später errechnet werden konnte.

2.1.5 Dialyse

Die SepSecS-Proteinproben wurden dialysiert, um das SepSecS-Protein in einen physiologischen Puffer zu überführen. Hierfür wurden die Dialysekammern für zehn Minuten mit Dialysepuffer inkubiert, entleert und mit SepSecS-haltigem Elutionspuffer aufgefüllt. Die Kammern wurden mit einem Schwimmer in zwei Liter Dialysepuffer gelegt und über Nacht unter langsamem Rühren gelagert. Dadurch wurde der Harnstoff im Elutionspuffer minimiert. Die SepSecS-haltige Lösung wurde nun aus den Dialysekammern in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.

2.1.6 Nachweis des SepSecS-Proteins

Für den Nachweis des SepSecS-Proteins war zunächst eine Auftrennung der Proteine notwendig. Zur Proteinauftrennung wurde das „SDS-PAGE“ („sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)-Verfahren verwendet. Es wurden zwei

identische Gele für die doppelte Nachweisbestimmung angefertigt. Zwischen zwei fixierten Glasplatten wurde zunächst ein 5-ml-Laufgel und nach erfolgter Polymerisation hierauf noch ein 2,5-ml-Sammelgel gegossen.

Vor dem Aushärten des Gels wurden Käbme eingesteckt, um die Geltaschen zur Proteinfüllung herzustellen. Für die Denaturierung wurden fünf Mikrogramm SepSecS-Protein zusammen mit 20 µl eines 1:2 H₂O verdünnten DTT-(Dithiothreitol) Puffer (2fach) bei 95 °C für drei Minuten inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Die Proteintaschen der zwei Gele wurden jeweils mit dem SepSecS-Protein und einem Protein-Standard beladen. Diese wurden in einer Elektrophoresekammer für 15 min bei konstanten 80 V und im Anschluss konstant bei 120 V separiert. Nach Abtrennung des Sammelgels wurde das Laufgel für zehn Minuten im Anodenpuffer 2 inkubiert. Bei der elektrophoretischen Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Transferrmembran (Polyvinylidenfluorid) kam das Semi-Dry-Blot-System zum Einsatz. Der Semi-Dry-Blotter hatte folgenden Aufbau: Zwischen Anode und Transferrmembran lagen Filterpapiere, die in Anodenpuffer 1 und 2 getränkt worden waren. Richtung Kathode befand sich das Gel mit in Kathodenpuffer getränkten aufliegenden Filterpapieren. Zur Vorbereitung wurde die PVDF-Membran in Methanol (100 %) für zwei Minuten und danach 15 min in Anodenpuffer 2 inkubiert. Die Proteine wurden bei 380 mA in 45 min auf die PVDF-Membran übertragen.

Die Proteinbanden des Gels und der PVDF-Membran wurden mit zwei verschiedenen Färbetechniken sichtbar gemacht. Bei dem Gel wurde die Coomassie-Färbung angewendet. Hierfür inkubierte das Gel für eine Minute in verdünnter Coomassielösung (1:5 mit H₂O), dann mehrmals für einige Minuten in Methanol (50 %), bis es zu einer Entfärbung des Hintergrundes kam und die gefärbten Proteinbanden deutlich sichtbar wurden (**siehe Abbildung 2**). Um das SepSecS-Protein in den Banden spezifisch nachweisen zu können, wurde für die PVDF-Membran eine Antikörper-spezifische Proteinfärbung mit DAB (Diaminobenzidin)-Umsatz verwendet. Zunächst inkubierte die Membran in einer Blocklösung über Nacht bei vier Grad Celsius auf einem Rollgerät. Die Membran wurde am nächsten Tag dreimal in einer Waschlösung für fünf

Minuten auf einem Rollgerät gewaschen. Zur spezifischen Anfärbung der Banden wurde nun ein Gemisch aus SLA/LP-positiven Patientenseren im Verhältnis 1:200 mit fünf Millilitern einer Blocklösung verdünnt und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit der Membran auf einem Rollgerät inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift.

Der Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper „Anti-Human IgG“ wurde in fünf Millilitern Blocklösung 1:1000 verdünnt und unter denselben Bedingungen wie der Primärantikörper mit der Membran in Kontakt gebracht.

Zur eigentlichen Färbung der Banden wurde die Membran mit einer Substratlösung aus „DAB/metal“-Konzentrat (10X) und Peroxidasepuffer im Verhältnis 1:10 bedeckt und bis zur deutlichen Färbung von schwarz-braunen Banden zwischen 5-15 min inkubiert. Abschließend erfolgte ein Waschschrift.

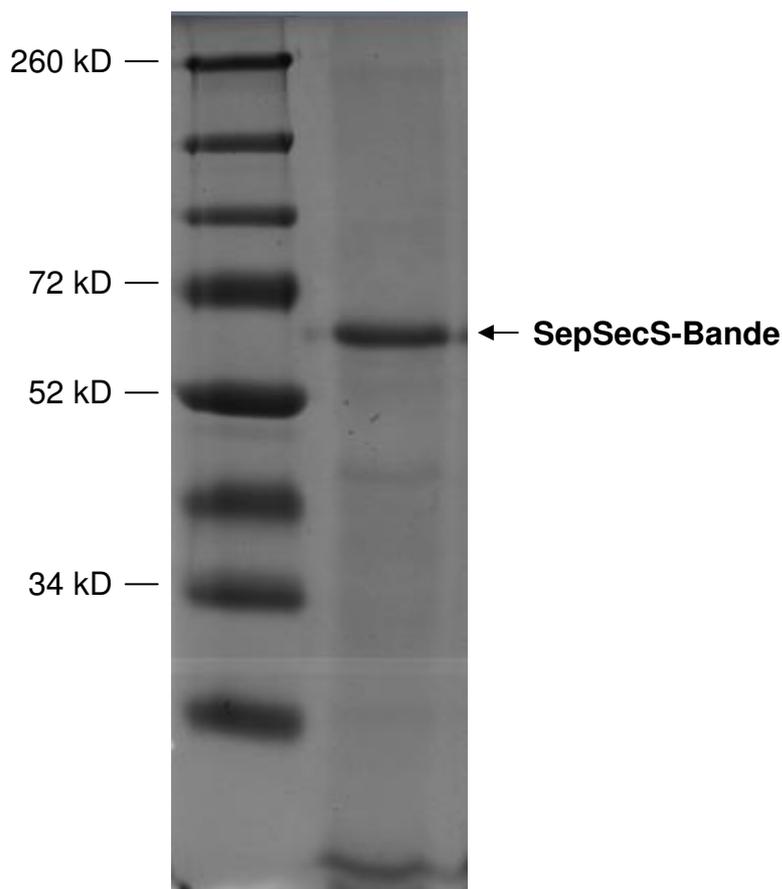


Abbildung 2: Nachweis des SepSecS-Proteins mittels der Coomassie-Färbung

Bei der Herstellung von neuen SepSecS-Proteinlösungen während der experimentellen Phase wurde stets eine vergleichende Qualitätskontrolle des neu gewonnen Proteins mit den vorherigen SepSecS-Proteinlösungen durchgeführt. Nur wenn eine ähnliche hohe Qualität vorlag, wurde das Protein für die Versuche verwendet.

2.2 SepSecS-induzierte Immunreaktionen im murinen Lymphknoten (Versuchsaufbau 1)

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Unterschiede der lokalen Immunreaktion im Lymphknoten bei genetisch unterschiedlichen Mäusen in Anwesenheit des SepSecS-Proteins zu untersuchen. Dazu wurden Wildtypen (WT) und IL-10^{-/-} Mäuse verglichen.

2.2.1 Auslösung der SepSecS-induzierten Immunreaktion

Es wurden Mäuse beider Mauslinien eine Emulsion zur Hälfte bestehend aus murinem SepSecS-Protein und CFA mit einer sterilen Kanüle subkutan in die Hinterpfoten gespritzt. Jede Maus erhielt eine Menge von zehn Mikrogramm SepSecS-Protein in einem Emulsionsvolumen von 20 µl pro Pfote (**siehe Abbildung 3**).

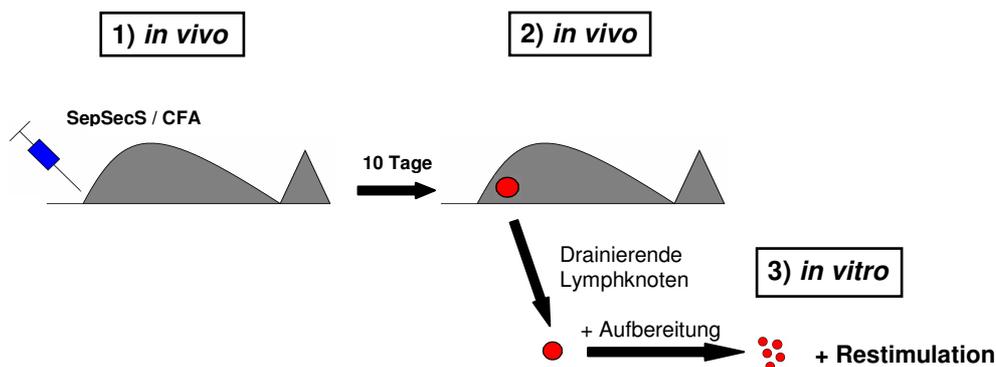


Abbildung 3: SepSecS-induzierte Immunreaktion im murinen Lymphknoten

In beide Hinterpfoten der Versuchstiere wurden jeweils 20 µl SepSecS/CFA-Emulsion mit zehn Mikrogramm SepSecS-Protein injiziert. Am elften Tag wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen, zur Einzelzellsuspension aufbereitet und restimuliert.

2.2.2 Entnahme und Aufbereitung der Lymphknoten

Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die vergrößerten, drainierenden, poplitealen Lymphknoten entnommen. Zur Anfertigung einer Einzelzellsuspension wurden die Lymphknoten mit einem Spritzkolben und Beimengung von phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) durch ein 100- μm -Nylon Sieb (Cell Strainer) gerieben. Die entstehende Zellsuspension wurde in einem 50-ml-Gefäß aufgefangen und durch ein 40- μm -Nylonsieb gerieben. Anschließend wurde die Einzelzellsuspension für fünf Minuten bei 472 G zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in einem Milliliter Iscoves Modifiziertes Dulbeccos Medium (IMDM) resuspendiert. Die Zahl der lebenden Zellen wurde nach Trypan-Blau-Färbung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Je $0,5 \times 10^6$ /ml Zellen wurden in einer Tissue Culture Plate 96-well Round-Bottom-Platte ausgesät.

2.2.3 Restimulation

Zur Bestimmung der Zytokinproduktion wurden die Zellen für 24 h entweder als Negativkontrolle unstimuliert belassen („sham“) oder mit SepSecS-Protein (4 ng/ μl) beziehungsweise als Positivkontrolle mit plattengebundenem anti-CD3 Antikörpern (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) restimuliert. Anschließend wurde der Überstand der Zellen vorsichtig abpipettiert und bis zur Messung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren.

2.2.4 Messung der Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand

Die Zytokinproduktion der restimulierten Zellen im Überstand der Zellkulturen wurde durch einen ELISA bestimmt. Das Prinzip beruht darauf, dass zwei Antikörper unterschiedliche Epitope desselben Moleküls erkennen können. Der Erstantikörper bindet die zu detektierenden Zytokine aus dem Überstand der Zellkultur an die Mikrotiterplatte. Danach folgte die Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper und Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase. Die photometrische Messung des Farbumschlags erfolgte nach Zugabe des Substrats. Durch eine mitgeführte Standardreihe konnte aus der gemessenen optischen Dichte eine Proteinkonzentration errechnet werden. Bei der Detektion von IL-17 und IFN- γ wurde Tetramethylbenzidin (TMB, fertige

Gebrauchslösung) als Substrat der Peroxidase verwendet. Die Vorbereitung der Proben und die Durchführung der Zytokinbestimmung wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3 Modell der SepSecS-induzierten Leberentzündung

2.3.1 Mausstämme

Für die Untersuchungen dieser Promotionsarbeit wurden die Mausstämme C57BL/6 (Wildtypen, WT) und C57BL/6 IL-10 Knockout (IL-10^{-/-}) verwendet. Alle Mäuse entstammten der Zucht der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Tiere wurden bei konstanter Raumtemperatur von 20 °C unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten und erhielten Futter und Wasser nach Belieben. Ein genehmigter Tierversuchsantrag liegt vor.

2.3.2 Induktion der Hepatitis

Bei WT und IL-10^{-/-} Mäusen wurde eine Emulsion, je zur Hälfte bestehend aus murinem SepSecS-Protein und CFA, mit einer sterilen Kanüle intraperitoneal injiziert, wobei jede Maus eine Menge von 20 µg SepSecS-Protein in einem Emulsionsvolumen von 100 µl erhielt. Die Wirkung von CFA, als Wasser-Öl-Emulsion, besteht in einer Verstärkung der lokalen Immunantwort. Eine erneute intraperitoneale Vakzination erfolgte nach 12-28 Wochen mit derselben Emulsionsmenge (Boost). Am elften Tag nach dem Boost wurden die Mäuse für den Versuch herangezogen (**siehe Abbildung 4**).

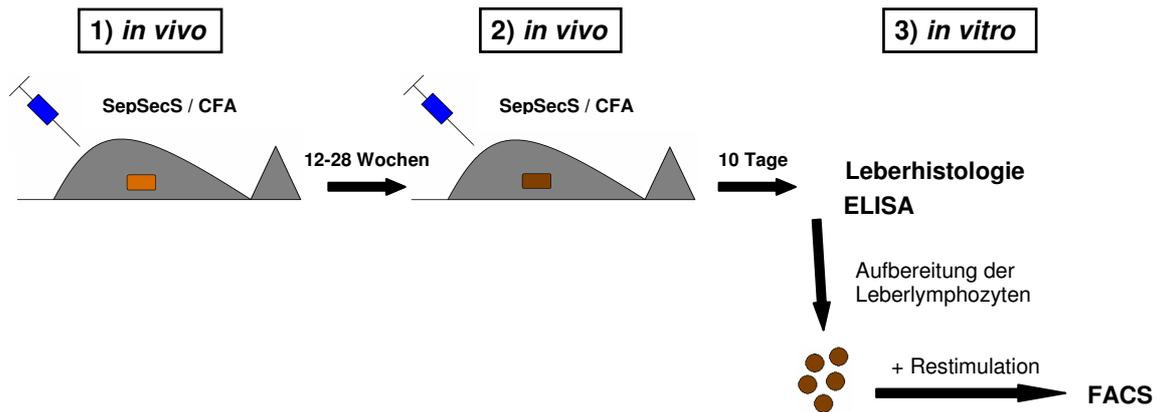


Abbildung 4: Immunisierungsschema für die SepSecS-induzierte Hepatitis

Zur Induktion der Hepatitis erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 20 µg SepSecS-Protein in einer 100 µl SepSecS-CFA-Emulsion. Nach 12-28 Wochen erfolgte ein Boost mit der gleichen Emulsionsmenge. Am elften Tag nach dem Boost wurde den Mäusen die Leber zur Histologie und Isolation der Leberlymphozyten entnommen. Eine Blutentnahme erfolgte zur Messung der ANA und SLA/LP-Antikörper.

2.4 Phänotypisierung der an der Leberentzündung beteiligten

Lymphozyten (Versuchsaufbau 2)

Ein weiterer Fokus der Arbeiten lag auf der Untersuchung einiger beteiligter Subpopulationen der intrahepatischen Lymphozyten und ihrer Effektormechanismen nach Induktion der experimentellen Autoimmunen Hepatitis durch Immunisierung mit der SepSecS/CFA-Emulsion.

2.4.1 Entnahme und Aufbereitung der Leber

Die vorbereiteten Mäuse wurden mit einer Ketamin-Rompun-Lösung narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Abdomen wurde eröffnet, die Leber freipräpariert, entnommen und von der Gallenblase befreit. Ein kleiner Leberlappen wurde in einer vierprozentigen Formalin-Lösung für 24 h fixiert und nachfolgend aufbereitet.

Die entnommene Leber wurde mit einem Spritzenkolben durch ein Nylonsieb mit der Porengröße 100 µm gerieben und der Durchfluss in einem 50-ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Hierbei wurde wiederholt mit PBS gespült. Durch Zentrifugation der Zellsuspension für vier Minuten bei 33 G setzten sich die Hepatozyten aufgrund ihres größeren Gewichts ab, während die

nicht-parenchymatösen Zellen im Überstand verblieben. Dieser wurde in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und noch einmal für vier Minuten bei 33 G zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für sieben Minuten bei 472 G zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde verworfen. Um die verbliebenen Zellen weiter aufzureinigen, wurde das Pellet mit 4,5 ml PBS resuspendiert und gemeinsam mit 2,5 ml Optiprep zu einem Dichtegradienten (17 %) aufpipettiert. Anschließend wurde der Gradient mit einem Milliliter PBS überschichtet und für 20 min bei 400 G ohne Bremse zentrifugiert. Die Leberlymphozyten, die sich nach der Zentrifugation im Gradienten zwischen der PBS-Schicht und der Schicht mit den verbliebenen Hepatozyten und Erythrozyten befanden, wurden abpipettiert, in einem frischen Reaktionsgefäß bis auf 15 ml PBS aufgefüllt und für fünf Minuten bei 472 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Leberlymphozyten im Pellet in frisches Medium überführt, resuspendiert und gezählt.

2.4.2 Restimulation

Im Folgenden gab es zwei *in-vitro* Restimulationsverfahren. Das eine Restimulationsverfahren diente zur Bestimmung der Zytokinproduktion mittels Durchflusszytometrie. Hier wurde die Negativkontrolle mit dem Proteintransport-Inhibitor Golgi-Plug (1 µg/µl) für sechs Stunden inkubiert. Der Positivkontrolle setzte man Golgi-Plug, Ionomycin (1 µg/ml) und 1:100 verdünntes PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetat) in der Endkonzentration von 25 ng/ml für sechs Stunden zu. Der dritte Ansatz wurde für acht Stunden mit murinem SepSecS-Protein (4 ng/µl) alleine restimuliert. Danach wurde Golgi-Plug für sechs weitere Stunden hinzugefügt. Nach Zugabe der jeweiligen Stimulantien wurden die Zellkulturen im Brutschrank bei 37 °C und fünf Prozent Kohlenstoffdioxid inkubiert. Nach Ablauf der Restimulationszeiten wurden die Zellen geerntet und gewaschen.

Das zweite Restimulationsverfahren, bei welchem der Proteintransport nicht unterbrochen wurde, diente zur Bestimmung der Zytokinproduktion im Überstand der Zellen. In diesem Ansatz wurden die Zellen für 24 h entweder als Negativkontrolle mit unbehandeltem Iscoves-Medium („sham“), mit SepSecS-

Protein (4 ng/ μ l), oder als Positivkontrolle mit anti-CD3 (2 μ g/ml) restimuliert. Anschließend wurde der Überstand der Zellen vorsichtig abgenommen und bis zur Messung bei -80 °C tiefgefroren.

2.4.3 Lebend-Tot-Färbung

Die Zellen wurden geerntet und in Röhrchen für die Durchflusszytometrie gewaschen und bei Bedarf bis zum Ende der restlichen Stimulationen in einem Milliliter PBS bei vier Grad Celsius gelagert. Die Proben wurden einer Lebend-Tot-Färbung (Live/Dead® Fixable Dead Cell Stain Kit) von Invitrogen unterzogen. Dabei inkubierten die Zellen auf Eis für 30 min in 200 μ l Gesamtvolumen unter Beifügung von einem Mikroliter des kateigenen Fluoreszenzfarbstoffes „Aqua“, der mit freien Aminen von toten Zellen reagierte. Anschließend wurden die Zellen gewaschen.

2.4.4 Färbung von Oberflächen-Antigenen der Lymphozyten

Zur Färbung der oberflächlichen Antigene wurde eine Antikörpermischung mit ausgewählten Fluoreszenzantikörpern, bestehend aus anti-CD3 (1 μ l/Probe), anti-CD4 (1 μ l/Probe) und/oder anti-CD8 (1 μ l/Probe) für das jeweilige Färbeschema erstellt. Die Proben inkubierten mit einem Färbevolumen von 50 μ l pro Probe für > 30 min im Dunkeln bei vier Grad Celsius. Die Zellen wurden gewaschen.

2.4.5 Intrazelluläre Zytokin- und Antigenfärbung der Lymphozyten

Zur Färbung intrazellulärer Zytokine und möglicherweise internalisierter Oberflächen-Antigene wurden die Zellen zunächst zur Fixierung mit 200 μ l PBS/4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei vier Grad Celsius versetzt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit einem Saponinpuffer (PBS, 1 % Bovines Serumalbumin (BSA), 0,5 % Saponin) gewaschen, um die Zellmembranen der Zellen zu permeabilisieren. Zur Färbung der intrazellulären Zytokine und internalisierten Antigene wurde eine Antikörpermischung mit Saponinpuffer und ausgewählten Fluoreszenzantikörpern aus anti-CD8 (1 μ l/Probe), anti-IL-17A (5 μ l/Probe) und/oder anti-IFN γ (2 μ l/Probe) für das jeweilige Färbeschema erstellt. Mit einem Färbevolumen von 50 μ l wurden die Proben für mindestens 50 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Färbung

wurden die Zellen mit dem Saponinpuffer gewaschen und in 200 - 400 μ l PBS/BSA bei vier Grad Celsius im Dunkeln gelagert.

2.4.6 Zellanalyse mittels FACS

Die gefärbten Zellen wurden mit einem LSR II Durchflusszytometer von BD Biosciences analysiert (**siehe Abbildung 5**). Zur Kompensation der Farbkanäle und zur Berechnung der Autofluoreszenz wurden Einzelfärbungen aller beteiligten Fluorochrome, sowie eine ungefärbte Zellprobe angefertigt und eingelesen. Die Ergebnisse wurden mit der FACS DIVA Software 6.1.3 und FlowJo 7.6.1 ausgewertet.

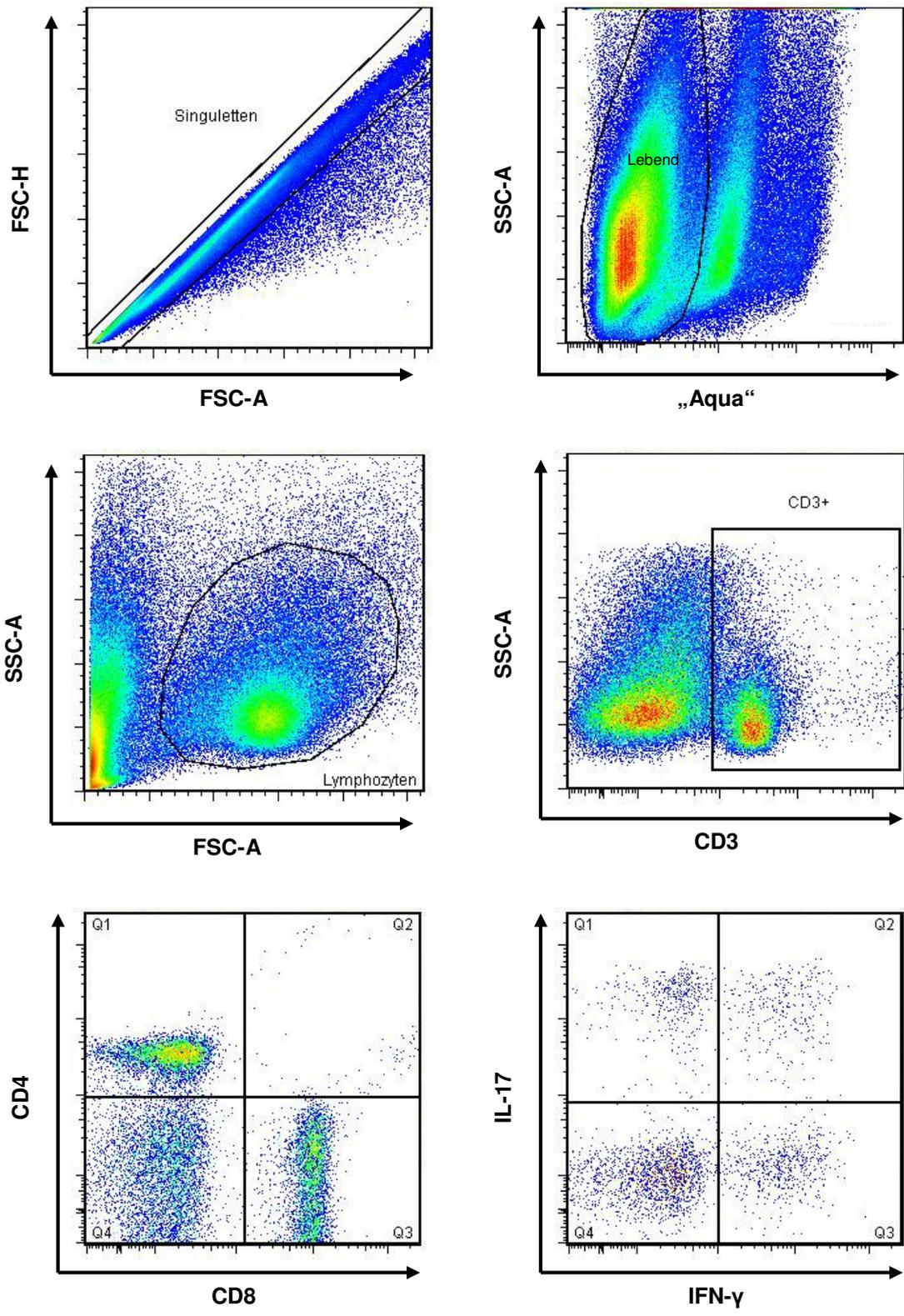


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung von FACS-Analysen der gefärbten Leberlymphozyten.

SSC-A = Side Light Scatter-Area/Seitwärtsstreulicht-Fläche, FSC-H = Forward Side Scatter-Hight/Vorwärtsstreulicht-Höhe, FSC-A = Forward Side Scatter-Area/Vorwärtsstreulicht-Fläche, Q = Quadrant

2.5 Histologie

2.5.1 Paraffin-Einbettung der Organe

Die entnommenen Organe wurden für 24 h bei Raumtemperatur in vierprozentiger Formalinlösung gelagert und für zwei Stunden in destilliertem Wasser inkubiert. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe in 20%igem Isopropanol und 40%igem Isopropanol für je 45 min und die Lagerung in 70%igem Isopropanol. Die Einbettung der Organe in Paraffin wurde freundlicherweise von der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf übernommen.

2.5.2 Herstellung der Schnitte

Die in Paraffin eingebetteten Organe wurden am SLEE Cut 5062 Mikrotom in drei Mikrometer dicke Schnitte geschnitten und zur histologischen Untersuchung auf Superfrost-Objektträger (Assistent) aufgezogen.

2.5.3 Hämatoxilin-Eosin Färbung nach Meyer

Zur Entparaffinierung inkubierten die Schnitte für fünf Minuten in Xylol und wurden anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (100%-, 90%-, 80%- und 70%igem Ethanol für je fünf Minuten) rehydriert. Die Schnitte wurden mit Wasser gespült und inkubierten für fünf Minuten in einer sauren Hämatoxilin-Farblösung. Danach wurden die Schnitte für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und für fünf Minuten in einer Eosin G Lösung 0,5 % (X883 Fa. Roth) gegengefärbt. Durch Zugabe von einem Tropfen Eisessig pro 100 ml (3738 Fa. Roth) wurde das alkalische Bläuen abgebrochen und die Kontrastfärbung erleichtert. Nach einem weiteren Waschvorgang folgte die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (in 50%igem Ethanol für fünf Sekunden, in 70%igem für 30 s, in 90%igem für eine Minute und in 100%igem für vier Minuten). Die gefärbten Schnitte wurden in Eukitt (Fa. Kindler GmbH) zur weiteren Verarbeitung eingedeckt.

2.5.4 Semiquantitative Beurteilung der histologischen Entzündungsreaktionen

Zur objektiven histopathologischen Unterscheidung der verschiedenen Entzündungsreaktionen wurde eine Auswahl an verblindeten Leber-Histologien

an einen Facharzt für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gesandt, der sich auf die Pathologie von Lebererkrankungen spezialisiert hat. Dieser hat die Schnitte mit dem modifizierten histologischen Aktivitätsindex (Modified Histological Activity Index, mHAI) bewertet (Ishak et al. 1995). Der mHAI ist eine in der klinischen Routine angewandte Methode zur Beschreibung der Intensität von nekroinflammatorischer Aktivität in chronischer Hepatitis. Mit diesem Score können die Schwere und der Verlauf der chronischen Hepatitis anhand der Ausprägung von vier verschiedenen Kriterien (A: Periportale oder periseptale Grenzzonenhepatitis, B: Konfluierende Nekrosen, C: Fokale lytische Nekrose, Apoptose und fokale Entzündung, D: Portale Entzündung) abgeschätzt werden (**siehe Tabelle 2**).

Tabelle 2: Kriterien zum Grading der chronischen Hepatitis mittels mHAI (Ishak et al. 1995).

modified Histological Activity Index

A. Periportal or Periseptal Interface Hepatitis (piecemeal necrosis)

Absent	0
Mild (focal, few portal areas)	1
Mild/moderate (focal, most portal areas)	2
Moderate (continuous around < 50 % of tracts or septa)	3
Severe (continuous around > 50 % of tracts or septa)	4

B. Confluent Necrosis

Absent	0
Focal confluent necrosis	1
Zone 3 necrosis in some areas	2
Zone 3 necrosis in most areas	3
Zone 3 necrosis + occasional portal-central (P-C) bridging	4
Zone 3 necrosis + multiple P-C bridging	5
Panacinar or multiacinar necrosis	6

C. Focal (spotty) Lytic Necrosis, Apoptosis, and Focal Inflammation*

Absent	0
One focus or less per 10x objective	1
Two to four foci per 10x objective	2
Five to ten foci per 10x objective	3
More than ten foci per 10x objective	4

D. Portal Inflammation

None	0
Mild, some or all portal areas	1
Moderate, some or all portal areas	2
Moderate/marked, all portal areas	3
Marked, all portal areas	4

*Does not include diffuse sinusoidal infiltration by inflammatory cells

2.6 Serum-Analysen

Zur Blutentnahme wurden die submandibulären Gefäße der Maus durch Fixation mit einer Hand gestaut. Mit Hilfe einer Lanzette wurden die Gefäße angestochen und das Blut tröpfchenweise in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend wurde dieses für zehn Minuten bei vier Grad Celsius mit 1800 G zentrifugiert. Das Serum wurde in neue Reaktionsgefäße abpipettiert und bis zur kurzfristigen weiteren Verarbeitung bei vier Grad Celsius gelagert oder falls nötig bei -80 °C tiefgefroren.

2.6.1 ELISA-Analyse (SLA/LP-Antikörper)

Zur Bestimmung der spezifischen humoralen Immunantwort auf die Immunisierung mit SepSecS-Protein wurden die SLA/LP-Antikörper aus dem Serum mittels ELISA gemessen. Die verdünnten Serumproben wurden auf eine mit rekombinantem SepSecS-Protein beschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen. Es folgte die Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper. Dieser wurde an Stelle des Kit-eigenen Peroxidase-gekoppelten Anti-Human IgG-Antikörper eingesetzt und reagierte in gleicher Weise mit dem Substrat. Durch Zugabe des Substrats kam es zu einem Farbumschlag, welcher durch Beifügung einer Stopp-Lösung beendet wurde. Die Proben wurden photometrisch (450 nm Messwellenlänge, Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Bei jeder Messung wurden drei Kalibratoren zur Ermittlung einer Standardkurve mitgeführt.

2.6.2 Ermittlung eines Referenzwerts für Mäuse

Zur Etablierung eines Referenzbereiches für murine SLA/LP-Titer wurde bei den WT und IL-10^{-/-} Mäusen eine Immunisierungsreihe mit drei Gruppen durchgeführt. Die erste Gruppe war unbehandelt (21 WT, 10 IL-10^{-/-}). Die zweite Mausgruppe erhielt intraperitoneal eine Injektion einer PBS/CFA-Emulsion (5 WT, 2 IL-10^{-/-}), die dritte einer SepSecS/CFA-Emulsion (15 WT, 10 IL-10^{-/-}). Beide Mausgruppen erhielten ihre Injektion jeweils zu Beginn des Experiments und einige Wochen später eine wiederholte Injektion der gleichen Emulsion, bevor ihnen zehn Tage später Blutproben entnommen wurden. Gemäß der Annahme, dass die unbehandelten und PBS/CFA-immunisierten Mäuse im Regelfall SLA/LP negativ sind, wurde ein möglichst niedriger

Grenzwert festgelegt, bei dem alle unbehandelten und PBS/CFA-immunisierten Mäuse als negativ und der größtmögliche Anteil der SepSecS-immunisierten Mäuse als positiv eingestuft werden konnten. Der hierbei ermittelte Grenzwert lag bei $> 0,2$ OD. Im Vergleich dazu wird beim Menschen eine Ratio berechnet, die jeweils den Quotienten aus dem Extinktionswert einer einzelnen Probe und eines in der Messung mitgeführten Kalibrators darstellt (Semiquantitativer Test). Für eine quantitative Testauswertung beim Menschen werden die Extinktionen der drei Kalibratoren gegen ihre definierten Konzentrationen (Kalibrator Nr.1 200 Relative Einheiten (RE)/ml, Kalibrator Nr.2 20 RE/ml, Kalibrator Nr.3 2 RE/ml) aufgetragen und somit eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Antikörperkonzentration der unbekannt Probe ermittelt werden kann. Bei der semiquantitativen Messung wird das Ergebnis ab einer Ratio größer eins, bei der quantitativen ab einer relativen Konzentration von ≥ 20 RE/ml als positiv bezeichnet.

2.6.3 Analyse von Antinukleären Antikörpern

Die Messung der Antinukleären Antikörper im Serum der Mäuse wurde mit einem indirekten Immunfluoreszenztest von Euroimmun durchgeführt. Die verdünnten Proben wurden auf den Reagenzträgern aufgetragen. Der Objektträger mit den beschichteten BIOCHIPS (Hep-2-Zellen und Primatenleber) wurde so auf den Reagenzträger gelegt, dass die Proben mit den BIOCHIPS inkubieren konnten. Nach einem Waschschrift wurde ein Ziege anti-Maus IgG AlexaFluor488 gekoppelter Antikörper auf die BIOCHIPS aufgetragen, da das Kit-eigene Antiserum mit humanen Antikörpern reagiert. Es folgten Inkubation, ein weiterer Waschschrift und die Eindeckung der Proben für die Mikroskopie. Die Vorbereitung der Proben und die Durchführung des Tests wurden streng nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Beim Austausch des humanen Antikörpers gegen einen murinen Antikörper wurde sichergestellt, dass lediglich die variable Antigen-bindende Fragment-Region (fragment antigen-binding region, Fab-Region) des Antikörpers auf eine murine Spezifität geändert wurde. Die konstante kristallisierbare Fragment-Region (fragment crystallizable region, Fc-Region) stammte bei beiden Antikörpern aus der Ziege und beeinflusste somit nicht die Reaktionskette des Tests. Die fertigen Proben wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop

(Quecksilberdampf Lampe, Anregungsfilter: 488 nm, Farbteiler: 510 nm, Sperrfilter: 520 nm) bezüglich Fluoreszenzmuster und -intensität beurteilt. Dabei wurde ein Titer bestimmt, der die größte Verdünnung aufwies, bei der noch eine Reaktion nachzuweisen war. In unserer Bestimmungsreihe der ANA im Mausserum wurde eine Probe mit einem Titer von 1:80 oder höher als positiv bewertet. Des Weiteren wurde das Fluoreszenzmuster der Proben beschrieben. Bei bestimmten Krankheiten entstehen regelhaft spezifische Verteilungsmuster, so dass ein für die Krankheit typisches Fluoreszenzmuster entsteht. In der AIH-Diagnostik hat das Fluoreszenzmuster allerdings keine relevante diagnostische Aussage (Czaja et al. 1997).

2.7 Statistische Auswertung

Zur Berechnung der Signifikanzniveaus wurde mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism 4.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test mit einem 95%-Konfidenzintervall angewendet. Die errechneten Signifikanzen wurden als auf drei Nachkommastellen gerundete p-Werte mit folgender Abstufung der Signifikanzniveaus angegeben: $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*), $p > 0,05$ (nicht signifikant = ns). Die dargestellten Werte wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

III. Ergebnisse

1. Analyse von SLA/LP-Antikörpern im Serum

Das immunologische Ansprechen der Mäuse auf die Immunisierung mit dem SepSecS-Protein lässt sich über den humoralen Arm des Immunsystems zeigen. Der Nachweis spezifischer SLA/LP-Antikörper gegen SepSecS beweist, dass das Immunsystem der Maus Kontakt zu dem injizierten Antigen hatte und es im Zuge der durch CFA verstärkten Immunreaktion zur Antikörperbildung gekommen ist.

Mit dem von uns für Mäuse ermittelten Grenzwert von $> 0,2$ OD waren 73,3 % der SepSecS-immunisierten WT SLA/LP-Antikörper positiv, während hingegen bei den IL-10^{-/-} Mäusen 90 % positiv waren ($p = ns$) (siehe **Abbildung 6**). In beiden Mausgruppen waren die PBS/CFA-immunisierten und die unbehandelten Mäuse SLA/LP-Antikörper negativ.

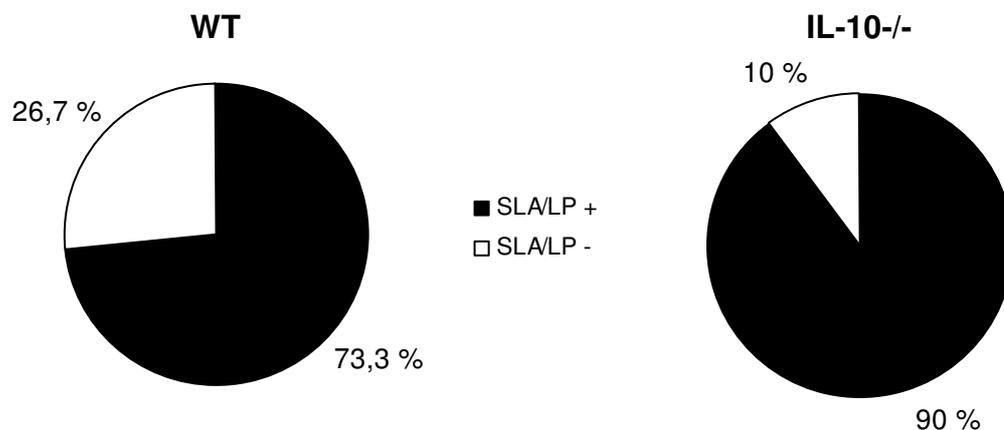


Abbildung 6: SLA/LP-Antikörperbildung bei WT und IL-10^{-/-} Mäusen auf zweifache SepSecS-Immunisierung im Abstand von mehreren Wochen

Bei einem Grenzwert von $> 0,2$ OD waren etwa 73 % bei den immunisierten WT SLA/LP-Antikörper positiv, während es 90 % bei den IL-10^{-/-} Mäusen waren.

2. Analyse von Antinukleären Antikörpern im Serum

Die Antinukleären Antikörper im Serum der Mäuse nach mehrmaliger SepSecS-Immunisierung wurden durch einen indirekten Immunfluoreszenztest detektiert. Proben mit einem Titer von 1:80 oder höher wurden als positiv gewertet. Von den fünf SepSecS-immunisierten WT war eine Maus mit einem ANA-Titer von 1:100 positiv, die restlichen WT negativ. Bei den drei immunisierten IL-10^{-/-}

Mäusen gab es eine Maus, die mit einem Titer von 1:100 positiv war, der Rest hatte negative Titer. Vereinzelt fanden sich unspezifische feingranuläre cytoplasmatische Fluoreszenzmuster. Alle nicht immunisierten Kontrollmäuse beider Mausgruppen (2 WT, 2 IL-10^{-/-}) waren ANA negativ.

3. Semiquantitative Beurteilung der histologischen Entzündungsreaktionen der untersuchten Mausstämme

Die bewerteten Schnitte der Lebern aus SepSecS-immunisierten WT (**siehe Abbildung 7**) ergaben einen Durchschnittswert von etwa zwei Punkten im mHAI, während die SepSecS-immunisierten Mäuse mit einer IL-10-Defizienz (IL-10^{-/-} Mäuse und IL-10^{-/-} HLA DRB1*0301 Mäuse) (**siehe Abbildung 8**) auf etwa sechs Punkte kamen ($p < 0,01$) (**siehe Tabelle 3**). Beim Menschen spricht man bis zu einem mHAI von drei über eine minimale, bis acht Punkte über eine milde und ab neun Punkte über eine mäßige bis schwere Hepatitis (Desmet et al. 1994).

Tabelle 3: Histologische Auswertung mittels mHAI

Versuchstiere: Sieben WT, zwei IL-10^{-/-} Mäuse und vier IL-10^{-/-} HLA-DRB1*0301 Mäuse. Die Summe aus den Bewertungen A-D ergaben die Indexsumme des mHAI.

modified HAI	Wildtypen							IL-10 ^{-/-} DR3				IL-10 ^{-/-}	
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6
A) Interface-Hepatitis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
B) Konfluierende Nekrosen	0	0	0	0	1	0	0	2	2	2	1	1	2
C) Fokal-lytische Nekrose, Apoptose und Entzündung	1	2	2	1	1	1	1	2	2	3	3	2	3
D) Portale Entzündung	1	1	1	0	0	0	0	1	2	2	1	1	1
Summe aus A-D	2	3	3	1	2	1	1	5	7	8	5	4	6

Es fiel auf, dass kein WT eine periportale oder periseptale Interfacehepatitis und nur ein WT eine milde fokale konfluierende Nekrose aufwies. Die Mäuse mit IL-10-Defizienz zeigten eine deutlich stärker ausgeprägte Neigung zu konfluierenden Nekrosen als die WT und wiesen eine milde portale Entzündung auf, zwei davon erfüllte sogar die Kriterien einer moderaten portalen Entzündung mit milder periportal/periseptaler Interfacehepatitis (**siehe Tabelle 3**).

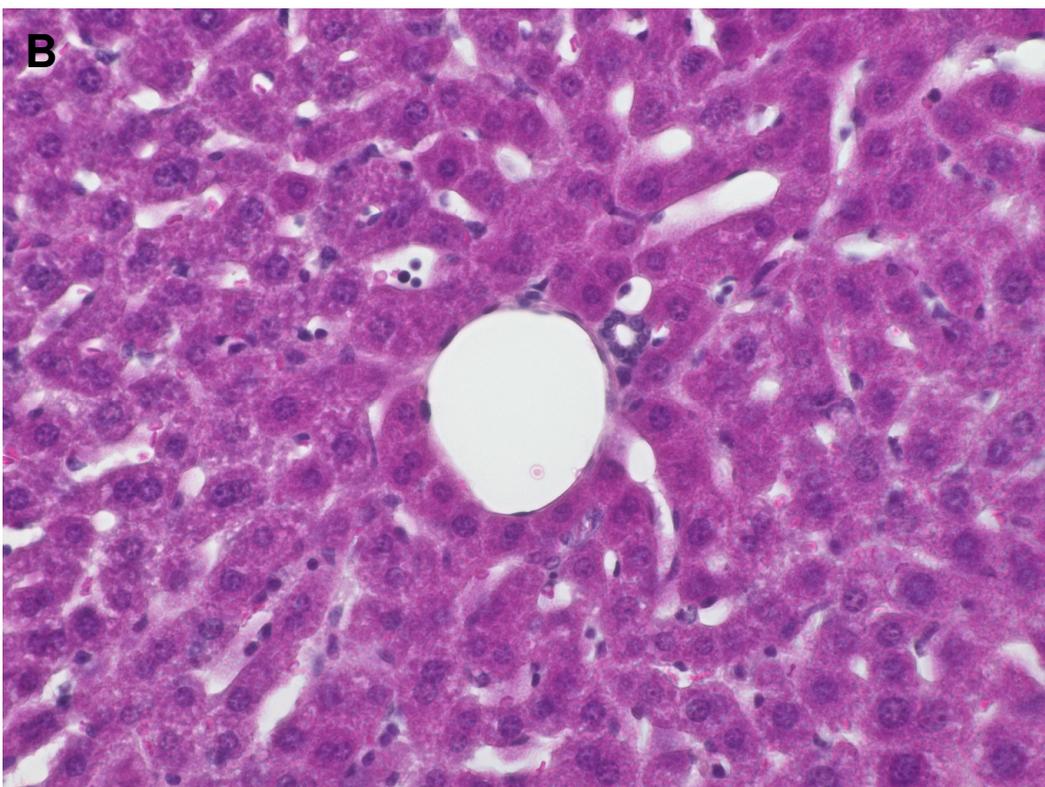
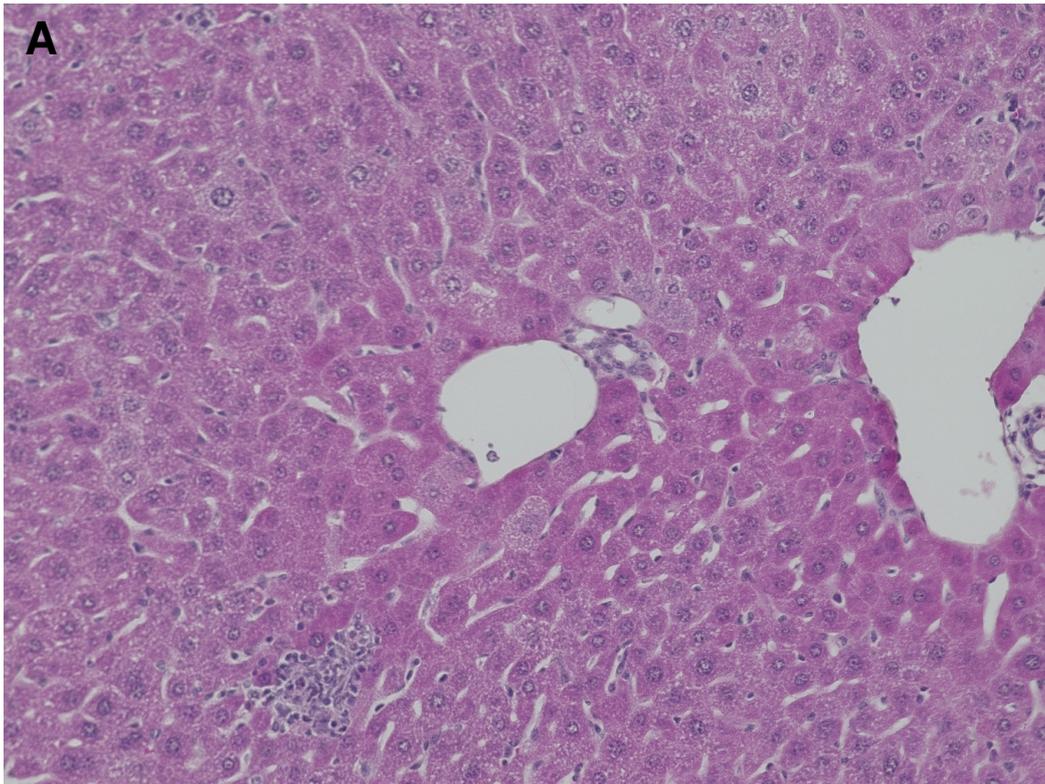


Abbildung 7: Histologie einer entzündeten Leber einer Wildtypmaus nach SepSecS-Immunisierung

A) Übersicht B) Ausschnitt eines Portalfelds

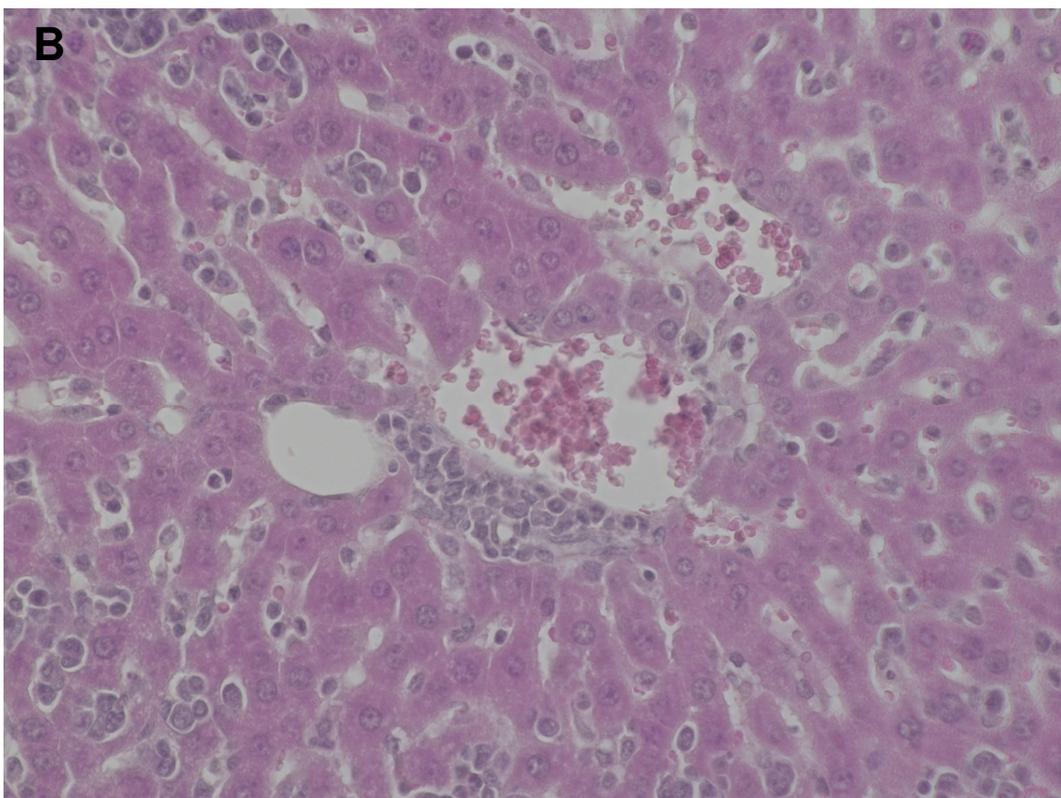
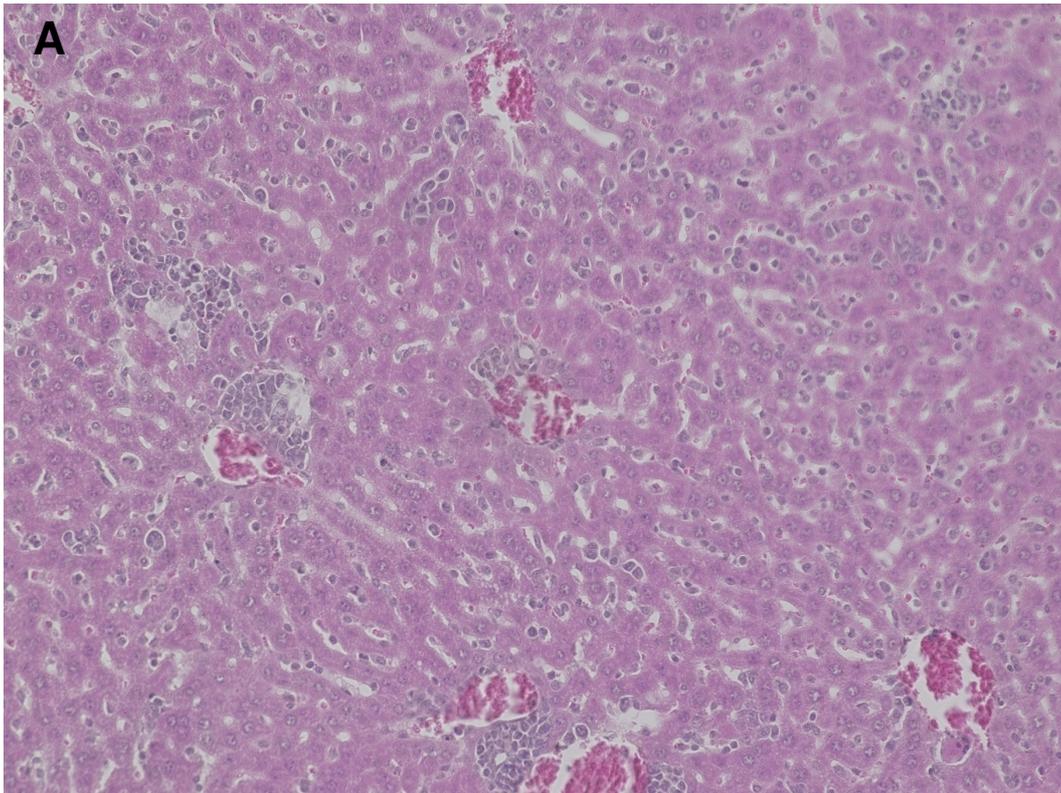


Abbildung 8: Periportale Infiltration einer SepSecS-immunisierten IL-10^{-/-} Maus

Diffuse Einwanderung lymphozytärer Entzündungszellen in das Lebergewebe.
A) Übersicht **B)** Ausschnitt eines Portalfelds

4. Analyse der Zytokinkonzentrationen im Überstand von *in-vitro* restimulierten Lymphknoten- und Leberzellen mittels ELISA

4.1 Versuchsaufbau 1 – Lymphknotenzellen

Anhand der Zytokinproduktion nach *in-vitro* Restimulation sollte untersucht werden, ob es auch im Aktivitätsgrad und der Zytokinproduktion einen Unterschied zwischen den WT-Zellen und den IL-10^{-/-} Mausezellen gibt. Hierfür wurden WT und IL-10^{-/-} Mäusen zehn Tage nach einer SepSecS/CFA-Injektion in die Hinterpfoten die poplitealen Lymphknoten entnommen, diese zur Einzelzellsuspension aufgereinigt und spezifisch mit SepSecS oder unspezifisch mit anti-CD3 restimuliert. Die Zytokinkonzentrationen aus den Überständen der restimulierten Lymphknotenzellen wurden mit einem Zytokin-ELISA für IL-17 und IFN- γ gemessen.

Messung von IFN- γ

In der unstimulierten Kontrolle konnte sowohl bei den Zellen der WT als auch der IL-10^{-/-} Mäuse keine signifikante Ausschüttung von IFN- γ beobachtet werden. Wurden die Zellen allerdings spezifisch mit SepSecS restimuliert, zeigte sich im Vergleich zur nicht restimulierten Kontrolle ein deutlicher Unterschied. Die Konzentration von IFN- γ nach SepSecS-Restimulation lag bei den IL-10^{-/-} Mäusen bei 1222 pg/ml (\pm 193 pg/ml) und war mit $p < 0,001$ signifikant erhöht im Vergleich zu dem nicht restimulierten Ansatz. Bei den WT-Zellen gab es lediglich nach SepSecS-Restimulation eine Produktion von 490 pg/ml (\pm 243 pg/ml), die gegenüber den nicht restimulierten WT-Zellen mit $p < 0,001$ signifikant erhöht war. Nach Restimulation mit anti-CD3 wurden im Durchschnitt 816 pg/ml (\pm 71 pg/ml) IFN- γ bei den IL-10^{-/-} Mäusen und 355 pg/ml (\pm 99 pg/ml) IFN- γ bei den WT gemessen ($p < 0,001$) **(siehe Abbildung 9)**. Der Unterschied in der IFN- γ -Produktion der WT- und IL-10^{-/-} Mausezellen nach SepSecS-Restimulation war signifikant ($p < 0,001$).

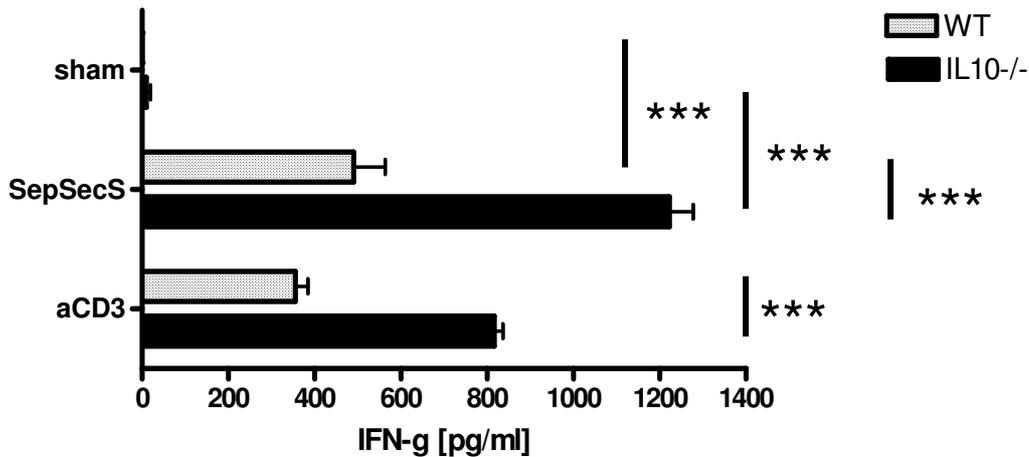


Abbildung 9: Versuchsaufbau 1 – IFN- γ Konzentrationen (ELISA)

IFN- γ -Konzentrationen in Überständen von Lymphknotenzellen aus WT und IL-10^{-/-}-Mäusen, die zehn Tage nach SepSecS-Immunsierung in die Hinterpfoten zur Einzelzellsuspension aufgereinigt und restimuliert wurden (vergleiche Versuchsaufbau 1). Die Zellen wurden entweder mit SepSecS oder anti-CD3 für 24 h ohne Proteintransportinhibitor Brefeldin A restimuliert.

Messung von IL-17

Die IL-17-Produktion der WT- und IL-10^{-/-}-Mauszellen im nicht restimulierten Zustand war mit weniger als 31 pg/ml gering. Nach spezifischer SepSecS-Restimulation fand sich im Überstand der WT eine IL-17-Konzentration von 177 pg/ml (\pm 104,6 pg/ml) ($p < 0,001$) und bei den IL-10^{-/-}-Mäusen von 494 pg/ml (\pm 139,8 pg/ml) ($p < 0,001$) (**siehe Abbildung 10**). Der Unterschied in der IL-17-Produktion zwischen den WT- und IL-10-defizienten Mauszellen nach SepSecS-Restimulation war mit $p < 0,001$ ebenfalls signifikant. Durch die Restimulation mit anti-CD3 konnte eine IL-17-Konzentration von 338 pg/ml (\pm 94 pg/ml) bei den WT-Zellen und von 804 pg/ml (\pm 166 pg/ml) bei den IL-10^{-/-}-Mauszellen beobachtet werden ($p < 0,001$).

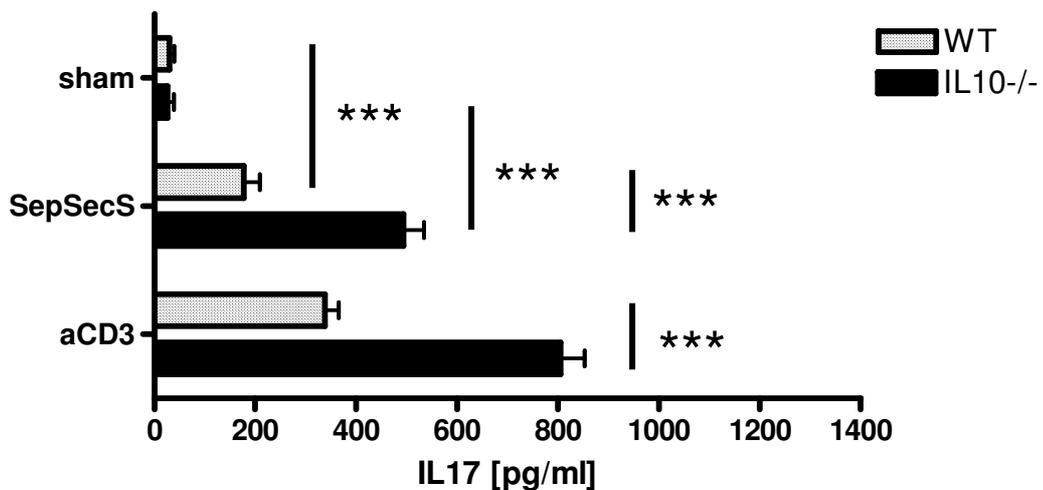


Abbildung 10: Versuchsaufbau 1 – IL-17-Konzentrationen (ELISA)

IL-17-Konzentrationen in Überständen von Lymphknotenzellen aus WT und IL-10^{-/-} Mäusen, die zehn Tage nach SepSecS-Immunsierung in die Hinterpfoten zur Einzelzellsuspension aufgereinigt und restimuliert wurden (vergleiche Versuchsaufbau 1). Die Zellen wurden entweder mit SepSecS oder anti-CD3 für 24 h ohne Proteintransportinhibitor Brefeldin A restimuliert.

4.2 Versuchsaufbau 2 - Leberzellen

Die isolierten nicht-parenchymatösen Zellen aus den Lebern der WT und IL-10^{-/-} Mäuse wurden zehn Tage nach der zweiten intraperitonealen SepSecS-Immunsierung (**vergleiche II. 2.3 - 2.4**) auf dieselbe Weise wie die Lymphknotenzellen auf ihre Zytokinproduktion hin untersucht.

Messung von IFN- γ

Es zeigte sich in der IFN- γ -Messung der nicht restimulierten Kontrolle ein signifikanter Unterschied zwischen den isolierten Zellen der WT und der IL-10^{-/-} Mäuse, der möglicherweise auf einen unterschiedlichen Aktivitätsgrad der Zellen nach zweifacher SepSecS/CFA-Immunsierung zurückzuführen war. So produzierten die WT-Zellen im Durchschnitt 12 pg/ml (\pm 13,72 pg/ml), die IL-10^{-/-} Mauszellen hingegen 469 pg/ml (\pm 321 pg/ml) IFN- γ in der nicht restimulierten Kontrolle ($p < 0,001$). Nach spezifischer Restimulation mit SepSecS lag die IFN- γ -Konzentration im Überstand bei den WT bei 62 pg/ml (\pm 54 pg/ml) und bei den IL-10^{-/-} Mäusen bei 3576 pg/ml (\pm 653 pg/ml) ($p < 0,001$). Der Unterschied in der IFN- γ -Produktion von nicht restimulierten

und SepSecS-restimulierten IL-10^{-/-} Mäusen war signifikant ($p < 0,001$). Auch bei den mit anti-CD3 maximal restimulierten Zellen war der Unterschied in der IFN- γ -Produktion von 1174 pg/ml (± 747 pg/ml) bei den WT-Zellen zu 4507 pg/ml (± 701 pg/ml) bei den IL-10^{-/-} Mauszellen mit $p < 0,001$ signifikant (siehe Abbildung 11).

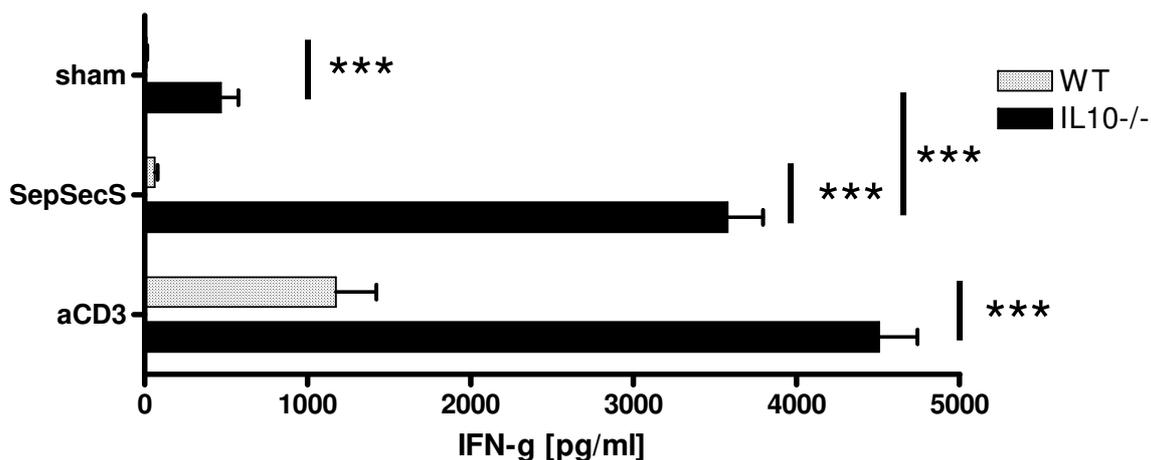


Abbildung 11: Versuchsaufbau 2 – IFN- γ Konzentrationen (ELISA)

IFN- γ -Konzentrationen von isolierten nicht-parenchymatösen Zellen aus der Leber von zweimalig SepSecS-immunisierten WT und IL-10^{-/-} Mäusen, die zehn Tage nach der zweiten Injektion zur Einzelzellsuspension aufgereinigt wurden (vergleiche Versuchsaufbau 2). Die Zellen wurden entweder mit SepSecS oder anti-CD3 für 24 h ohne Proteintransportinhibitor Brefeldin A restimuliert.

Messung von IL-17 im Zellüberstand

Ohne Restimulation („sham“) betragen die IL-17-Konzentrationen im Überstand 28 pg/ml (WT) und 60 pg/ml (IL-10^{-/-}) ($p = 0,011$). Bei den WT-Zellen gab es keinen signifikanten Unterschied in der IL-17-Produktion zwischen den nicht restimulierten Zellen und den mit SepSecS restimulierten Zellen. Bei den Zellen der IL-10^{-/-} Mäuse wies die IL-17-Produktion von 339 pg/ml (± 172 pg/ml) nach SepSecS-Restimulation einen signifikanten Unterschied zum nicht restimulierten Ansatz auf ($p < 0,001$). Die Differenz der gemessenen IL-17-Konzentrationen von 313 pg/ml zwischen den Zellen der WT und IL-10^{-/-} Mäusen nach SepSecS-Restimulation war signifikant ($p < 0,001$). Nach maximaler Restimulation mit anti-CD3 zeigte sich zwischen den WT-Zellen

mit 269 pg/ml (\pm 161 pg/ml) und den Zellen der IL-10^{-/-} Mäusen mit 1652 pg/ml (\pm 249 pg/ml) ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ (siehe **Abbildung 12**).

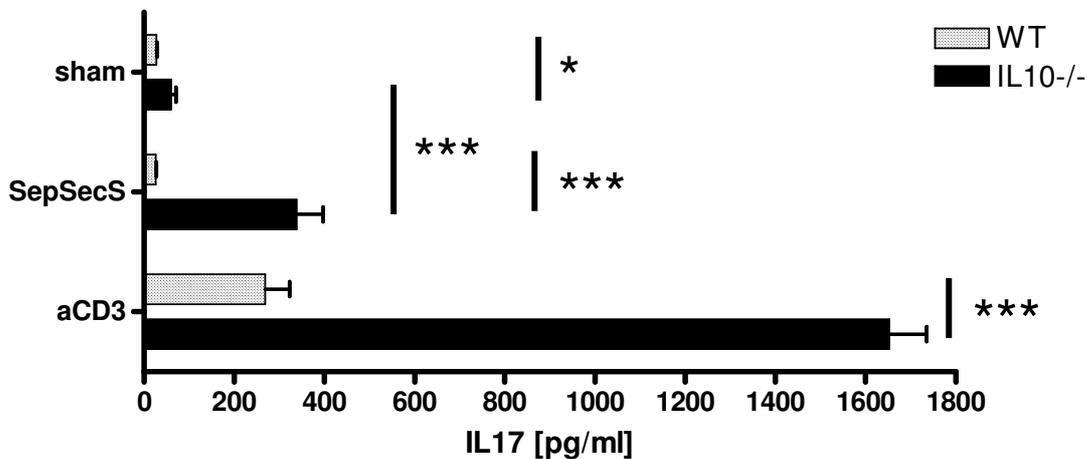


Abbildung 12: Versuchsaufbau 2 – IL-17 Konzentrationen (ELISA)

IL-17-Konzentrationen von isolierten nicht-parenchymatösen Zellen aus der Leber von zweimalig SepSecS-immunisierten WT und IL-10^{-/-} Mäusen, die zehn Tage nach der zweiten Injektion zur Einzelzellsuspension aufgereinigt wurden (vergleiche Versuchsaufbau 2). Die Zellen wurden entweder mit SepSecS oder anti-CD3 für 24 h ohne Proteintransportinhibitor restimuliert.

5. FACS-Analyse der nicht-parenchymatösen Leberzellen

5.1 Populationsanalyse

WT und IL-10^{-/-} Mäuse wurden zweimalig im Abstand mehrerer Wochen intraperitoneal mit einer SepSecS/CFA-Emulsion immunisiert. Am elften Tag nach der zweiten Injektion wurde die Leber entnommen und aufgereinigt. Durch einen Dichtegradienten wurden Leberlymphozyten isoliert. Die isolierten Leberlymphozyten wurden entweder spezifisch mit SepSecS, unspezifisch mit PMA/Ionomycin oder nicht restimuliert und anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei ließen sich mit Hilfe fluoreszierender Antikörper die CD3⁺ Zellen in die Subpopulation der CD4⁺ Zellen, der CD8⁺ Zellen und der CD4⁻CD8⁻ Zellen unterteilen. Die CD4⁺CD8⁺ Zellen spielten aufgrund ihrer minimalen Anteile eine untergeordnete Rolle in der Populations- und Zytokinanalyse.

Im Folgenden wurden neben Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie in einigen Fällen auch absolute Zellzahlen der jeweiligen Zellpopulation angegeben. Hierbei handelte es sich um eine Hochrechnung der absoluten Zellzahl einer Subpopulation. Als Basis hierfür dienten die im Durchflußzytometer gezählten nicht-restimulierten Zellen der WT und IL-10^{-/-} Mäuse und die Anzahl der lebenden nicht-parenchymatösen Leberzellen nach der Gradientenaufreinigung. Im Mittel hatten die Lebern der WT $39,7 \times 10^6$ Zellen, die der IL-10^{-/-} Mäuse eine Zellzahl von $49,5 \times 10^6$ Zellen.

Der Anteil der CD3⁺ Zellen an den isolierten Leberlymphozyten lag im Durchschnitt etwa bei 26 % und unterschied sich nicht signifikant in den drei Restimulationsansätzen. Die Anzahl an CD3⁺ Zellen in der Leber eines WT lag hochgerechnet bei etwa $2,09 \times 10^6$, in der Leber einer IL-10^{-/-} Maus bei etwa $2,32 \times 10^6$ CD3⁺ Zellen.

WT und IL-10^{-/-} Mäuse wiesen einen deutlichen Unterschied in ihren Anteilen der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen auf (**siehe Abbildung 13 A+B**). So waren von den WT im nicht restimulierten Ansatz 19,2 % ($\pm 7,1$ %) der CD3⁺ Zellen auch CD4⁺, während es bei den IL-10^{-/-} Mäusen 35,7 % ($\pm 4,3$ %) waren ($p = 0,009$) (**siehe Abbildung 13 C**). Bei den CD8⁺ Zellen zeigte sich ein anderer Effekt. Hier waren 45,4 % ($\pm 10,4$ %) der nicht restimulierten CD3⁺ Zellen bei den WT auch CD8⁺, während es bei den IL-10^{-/-} Mäusen 31,6 % ($\pm 4,2$ %) waren ($p = 0,041$) (**siehe Abbildung 13 D**). Die absoluten Zellzahlen spiegelten den Unterschied in der CD4CD8-Ratio ebenfalls wieder. In der Leber eines WT befanden sich ohne Restimulation etwa 406.000 CD3⁺CD4⁺ Zellen, während es durchschnittlich 830.000 CD3⁺CD4⁺ Zellen in der Leber einer IL-10^{-/-} Maus waren. Im Vergleich dazu hatte die Leber eines WT etwa durchschnittlich 1.009.000 CD3⁺CD8⁺ Zellen, die Leber der IL-10^{-/-} Maus hingegen nur um die 737.000 CD3⁺CD8⁺ Zellen.

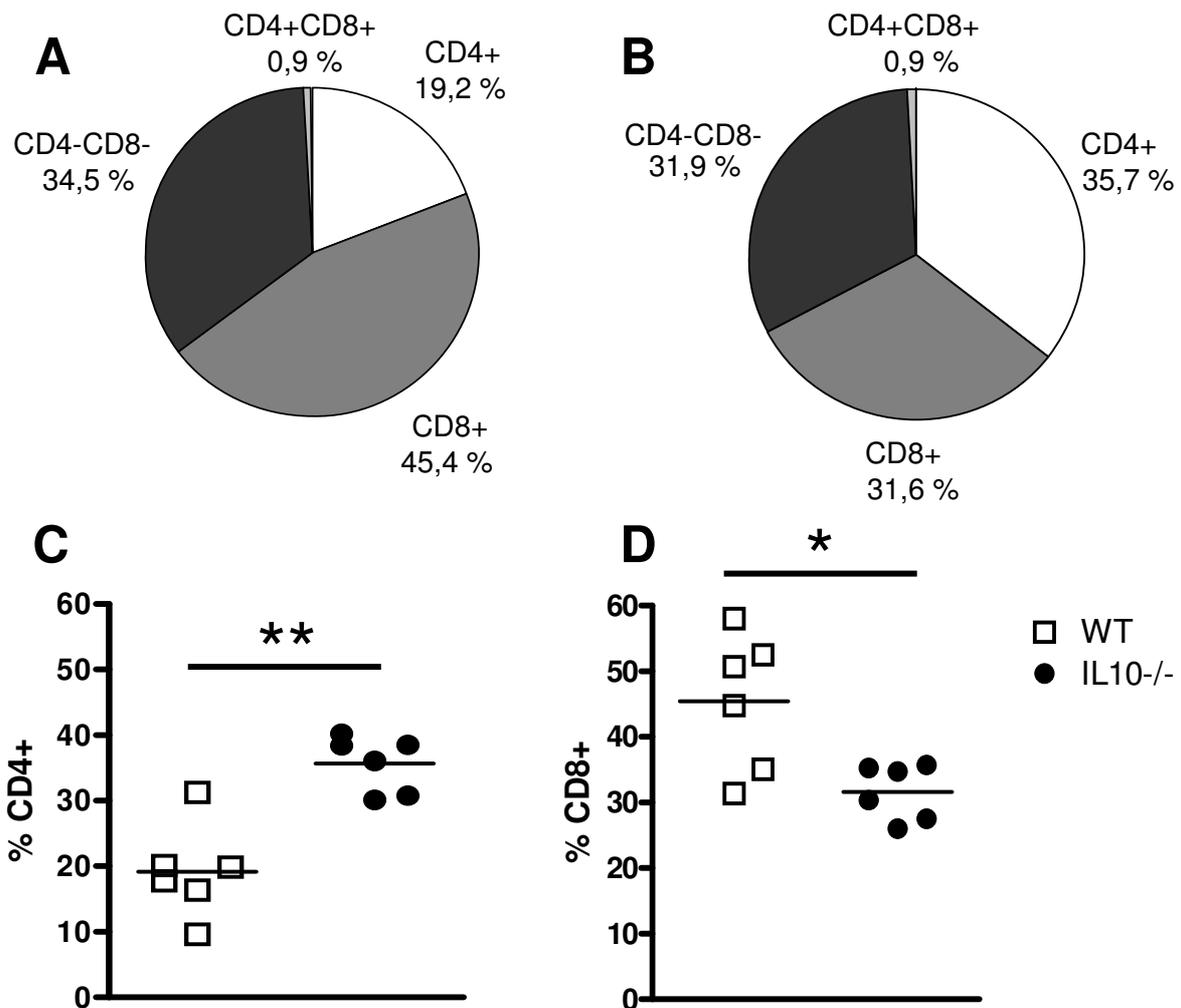


Abbildung 13: Versuchsaufbau 2 – Anteile der CD3+ Subpopulationen

Anteile der CD3+ Subpopulationen bei **A**) den WT und **B**) den IL-10^{-/-} Mäusen der nicht restimulierten Zellen aus den Lebern von zweifach SepSecS-immunisierten WT und IL-10^{-/-} Mäusen. Anteile an den CD3+ Zellen von **C**) den CD4+ Zellen und **D**) den CD8+ Zellen.

Die Unterschiede der Anteile bei den CD4-CD8- Zellen an den CD3+ Zellen zeigten eine weniger ausgeprägte Variabilität. Hier lagen die nicht restimulierten WT-Zellen bei 34,5 % ($\pm 12,7$ %) und die IL-10^{-/-}-Zellen bei 31,9 % ($\pm 7,4$ %) ($p = ns$). In den Ansätzen, die mit SepSecS und PMA/Ionomycin restimuliert wurden, gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IL-10^{-/-} Mäusen. Die CD4-CD8- Zellen zeigten besonders in der SepSecS restimulierten Gruppe eine ausgeprägte Standardabweichung (WT $\pm 17,6$ %, IL-10^{-/-} Mäuse $\pm 12,9$ %). In den Lebern der WT fanden sich etwa 653.000 CD3+CD4-CD8- Zellen, bei den IL-10^{-/-} Mäusen waren es durchschnittlich ca. 729.000 CD3+CD4-CD8- Zellen.

5.2 Analyse der zytokinproduzierenden Zellen

5.2.1 IFN- γ produzierende Zellen

CD3+ Zellen

Die CD3+ Zellen der nicht restimulierten WT- und IL-10^{-/-} Mauseellen bildeten mit Anteilen unter 0,75 % IFN- γ produzierender Zellen keine großen Zytokinmengen. Die mit SepSecS restimulierten WT-Zellen waren zu 1,3 % (\pm 0,7 %) IFN- γ +, während die Zellen der IL-10^{-/-} Mäuse neun Prozent (\pm 2 %) CD3+IFN- γ + Zellen aufwiesen ($p = 0,002$) (**siehe Abbildung 14**). Die maximale Restimulationskontrolle mit PMA/Ionomycin zeigte sowohl bei den WT-Zellen als auch bei den Zellen der IL-10^{-/-} Mäuse Anteile um 38 % CD3+IFN- γ + Zellen (WT \pm 9 %, IL-10^{-/-} \pm 6,3 %). Der Unterschied zwischen SepSecS- und maximal restimulierten IL-10^{-/-} Zellen war signifikant ($p = 0,002$).

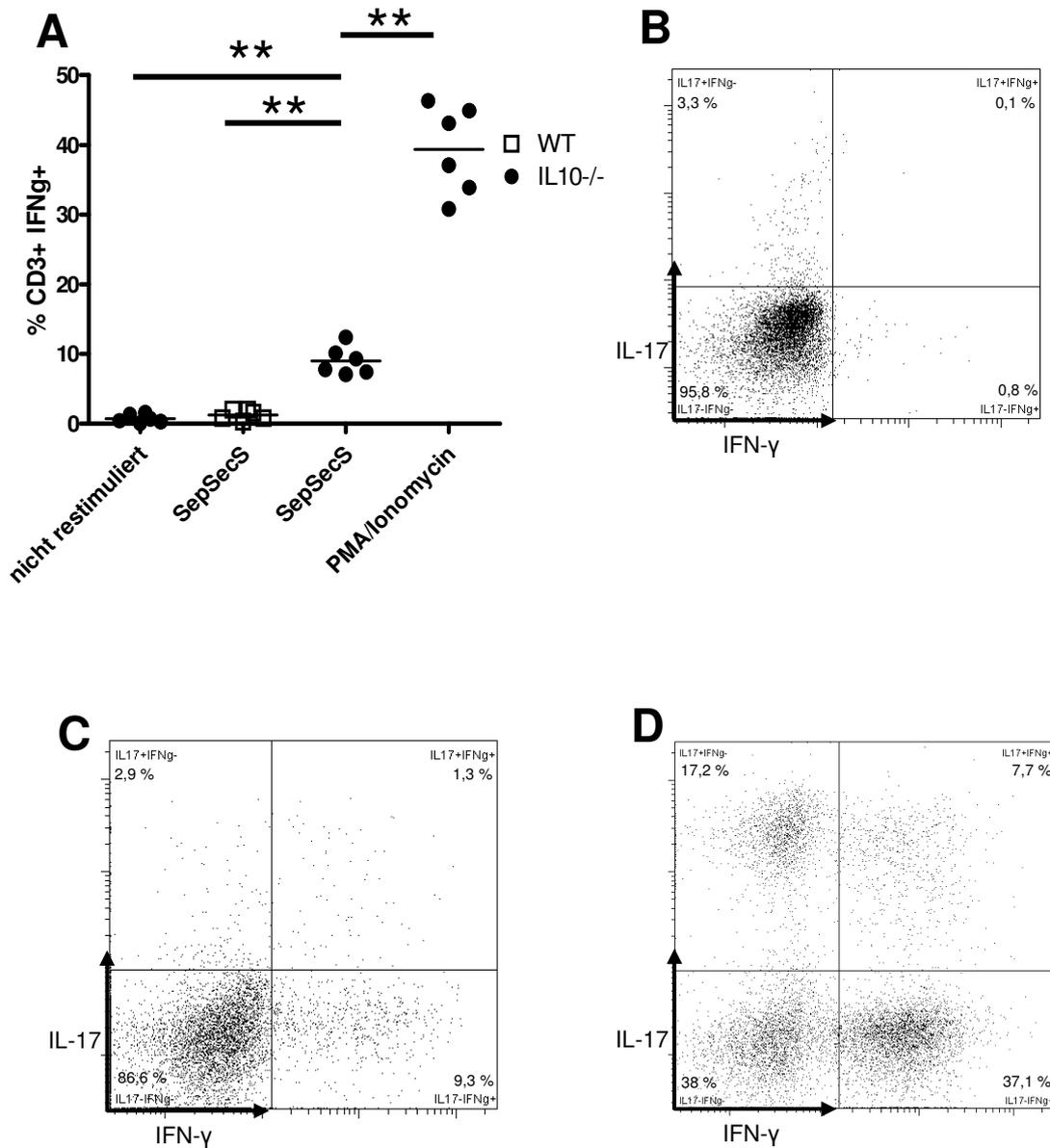


Abbildung 14: Versuchsaufbau 2 – Zytokinproduktion der CD3+ Zellen

Zytokinproduktion der CD3+ Zellen nach Restimulation von isolierten nicht-parenchymatösen Leberzellen aus zweifach SepSecS/CFA-immunisierten WT und IL-10^{-/-} Mäusen. **A)** Anteil der CD3+IL-17-IFN-γ+ Zellen. Repräsentative FACS-Diagramme von **B)** den SepSecS-restimulierten CD3+ WT-Zellen, **C)** den SepSecS-restimulierten IL-10^{-/-} Zellen und **D)** den PMA/Ionomycin-restimulierten IL-10^{-/-} Zellen.

CD4+ Zellen

Der Anteil der CD4+IFN-γ+ Zellen lag bei den nicht restimulierten Zellen beider Mausstämmen unter einem Prozent. Nach SepSecS-Restimulation fanden sich bei den WT-Zellen 3,3 % (± 2,5 %), bei den IL-10^{-/-} Mauszellen hingegen

16,9 % (\pm 9,3 %) CD4+IFN- γ + Zellen ($p = 0,009$) (siehe **Abbildung 15**). Der Unterschied zwischen den nicht restimulierten und den SepSecS restimulierten IL-10-/- Zellen war signifikant ($p = 0,002$). Nach maximaler Restimulation mit PMA/Ionomycin lag der Anteil an CD4+IFN- γ + Zellen im Ansatz der WT bei 20,1 % (\pm 2,3 %) und bei den IL-10-/- Mäusen bei 28,6 % (\pm 11 %).

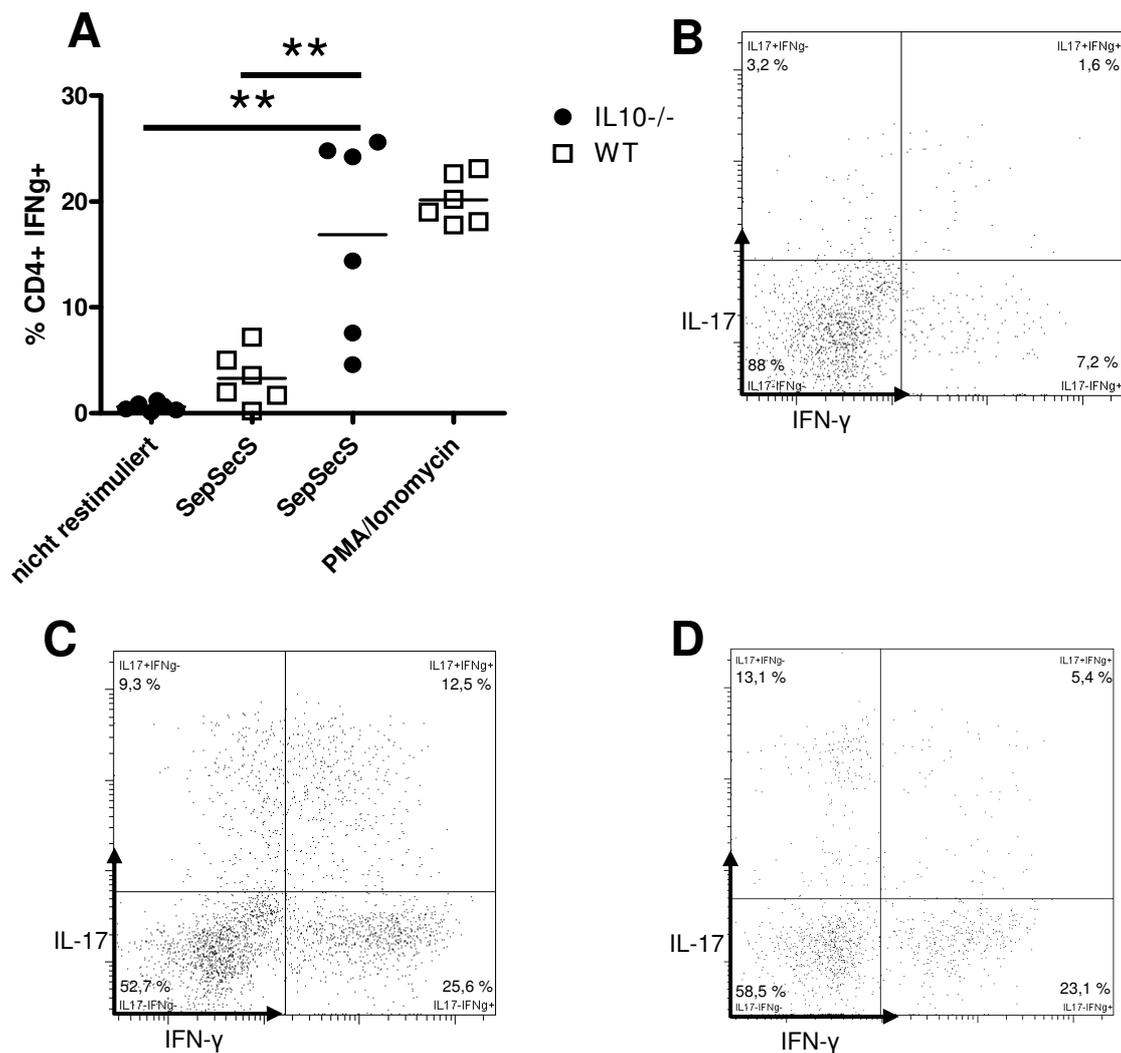


Abbildung 15: Versuchsaufbau 2 – Zytokinproduktion der CD4+ Zellen

Zytokinproduktion der CD4+ Zellen nach Restimulation von isolierten nicht-parenchymatösen Leberzellen aus zweifach SepSecS/CFA-immunisierten WT und IL-10-/- Mäusen. **A**) Anteil der CD4+IL-17-IFN- γ + Zellen. Repräsentative FACS-Diagramme von **B**) den SepSecS-restimulierten CD4+ WT-Zellen, **C**) den SepSecS-restimulierten CD4+ IL-10-/- Zellen, **D**) den PMA/Ionomycin-restimulierten CD4+ WT-Zellen

CD8+ Zellen

Der Anteil der CD8+IFN- γ + Zellen war bei den nicht restimulierten Zellen der WT und der IL-10 $^{-/-}$ Mäuse kleiner als ein Prozent. Die SepSecS-restimulierten WT-Zellen zeigten mit 0,7 % (\pm 0,4 %) CD8+IFN- γ + Zellen hier keine erhöhte IFN- γ -Produktion, wohingegen die SepSecS-restimulierten IL-10 $^{-/-}$ Mauszellen einen IFN- γ -Anteil von 6,8 % (\pm 3,5 %) hatten.

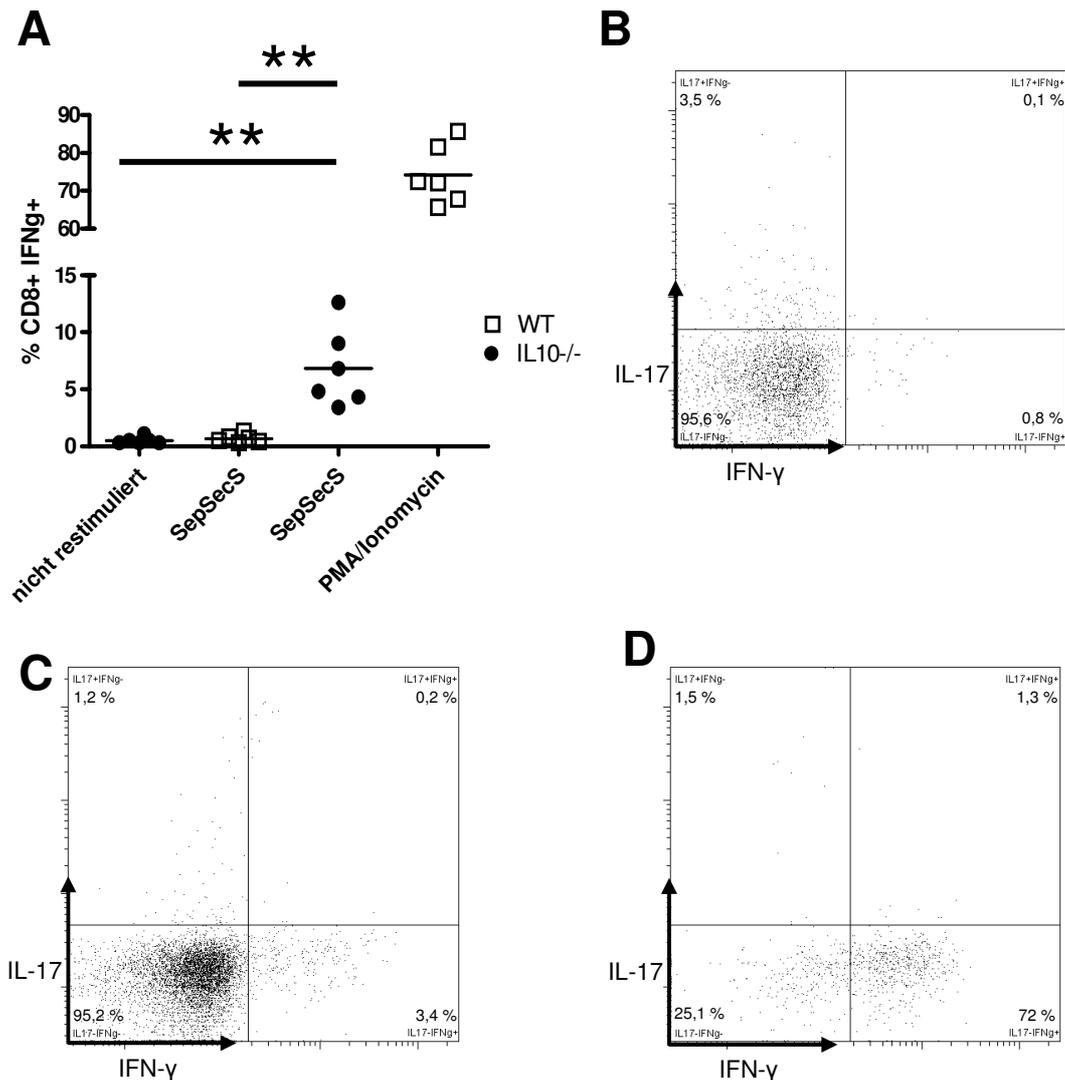


Abbildung 16: Versuchsaufbau 2 – Zytokinproduktion der CD8+ Zellen

Zytokinproduktion der CD8+ Zellen nach Restimulation von isolierten nicht-parenchymatösen Leberzellen aus zweifach SepSecS/CFA-immunisierten WT und IL-10 $^{-/-}$ Mäusen. **A**) Anteil der CD8+IL-17-IFN- γ + Zellen. Repräsentative FACS-Diagramme von **B**) den SepSecS-restimulierten CD8+ WT-Zellen **C**) den SepSecS-restimulierten CD8+IL-10 $^{-/-}$ Zellen, **D**) den PMA/Ionomycin-restimulierten CD8+ WT-Zellen.

Der Unterschied zwischen den SepSecS-restimulierten WT- und IL-10^{-/-}-Mauszellen war mit $p = 0,002$ signifikant (**siehe Abbildung 16**). Im Gegensatz zu den CD4⁺ Zellen lagen die CD8⁺IFN- γ ⁺ Zellen nach maximaler Restimulation durch PMA/Ionomycin höher zwischen 74,2 % (WT, $\pm 7,9$ %) und 76,6 % (IL-10^{-/-}, $\pm 4,5$ %).

CD4-CD8- Zellen

Die CD4-CD8- Zellen zeigten ähnliche Resultate in ihren IFN- γ -Anteilen wie die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Die WT- und IL-10^{-/-} Mauszellen in dem nicht restimulierten Ansatz zeigten, wie auch die WT-Zellen, die SepSecS restimuliert waren, weniger als 1,1 % CD4-CD8-IFN- γ ⁺ Zellen. Hier fand sich zwischen den SepSecS-restimulierten WT-Zellen und den SepSecS-restimulierten IL-10^{-/-} Zellen, die einen Anteil von 9,7 % ($\pm 4,3$ %) CD4-CD8-IFN- γ ⁺ Zellen aufwiesen, ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$) (**siehe Abbildung 17**). Die mit PMA/Ionomycin maximal restimulierte Kontrolle zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den WT-Zellen (17,5 % $\pm 6,1$ %) und den IL-10^{-/-} Mauszellen (28,1 % $\pm 3,6$ %) ($p = 0,002$).

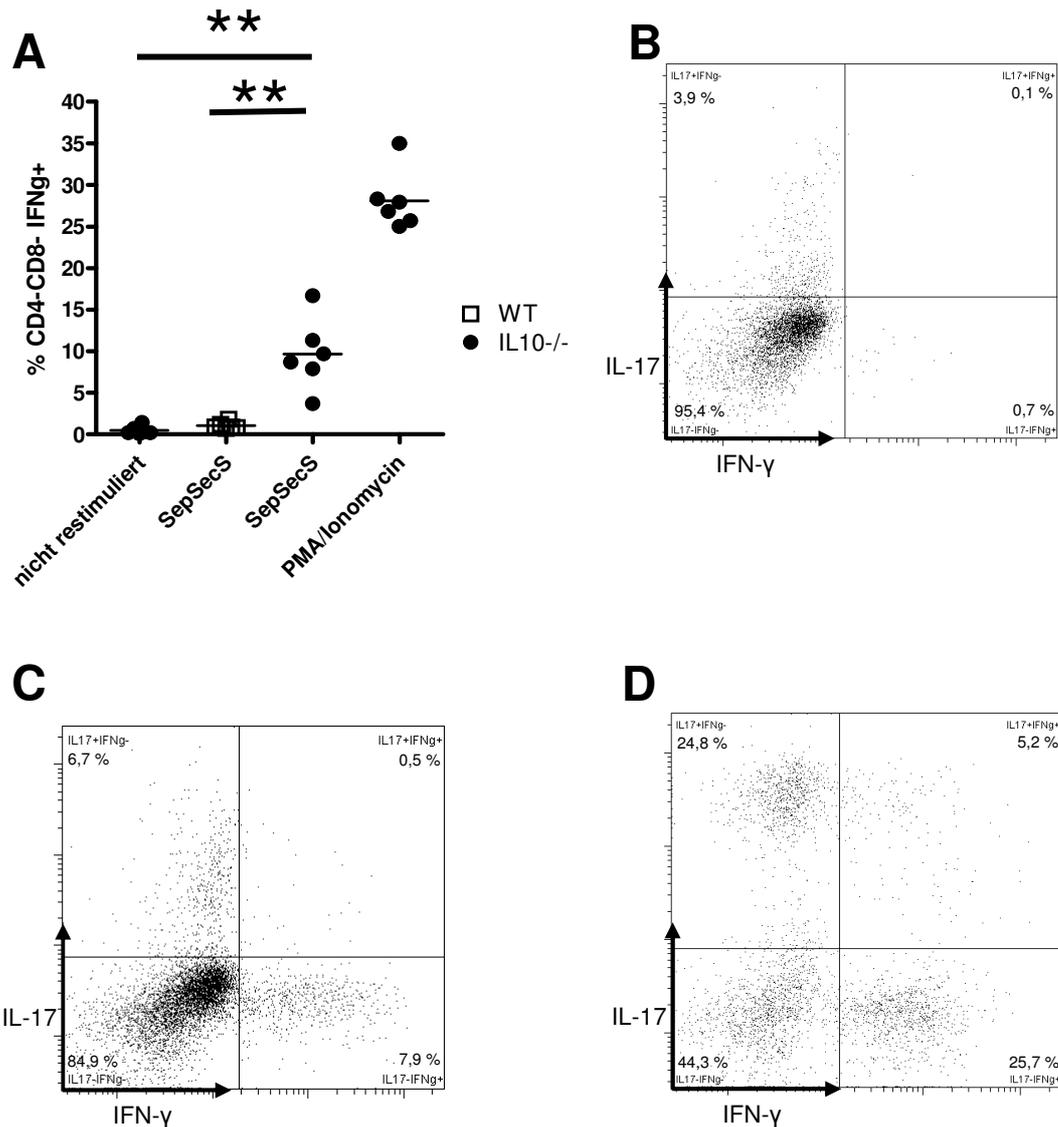


Abbildung 17: Versuchsaufbau 2 – Zytokinproduktion der CD4-CD8- Zellen

Zytokinproduktion der CD4-CD8- Zellen nach Restimulation von isolierten nicht-parenchymatösen Leberzellen aus zweifach SepSecS/CFA-immunisierten WT und IL-10^{-/-} Mäusen. **A)** Anteil der CD4-CD8-IL-17-IFN- γ ⁺ Zellen. Repräsentative FACS-Diagramme von **B)** den SepSecS-restimulierten CD4-CD8- WT-Zellen **C)** den SepSecS-restimulierten CD4-CD8- IL-10^{-/-} Zellen und **D)** den PMA/Ionomycin-restimulierten CD4-CD8- IL-10^{-/-} Zellen.

5.2.2 IL-17 produzierende Zellen

Der Anteil der CD3⁺IL-17⁺ Zellen zeigte innerhalb der nicht restimulierten und der SepSecS-restimulierten Ansätze keine signifikanten Unterschiede. Bei den nicht restimulierten WT-Zellen lag der Anteil der IL-17⁺ Zellen bei 5,2 % (\pm 3,6 %), bei den IL-10^{-/-} Mauszellen bei vier Prozent (\pm 1,4 %) CD3⁺IL-17⁺

Zellen. Die WT-Zellen wiesen nach SepSecS-Restimulation IL-17+ Anteile von 2,7 % ($\pm 0,6$ %) im Vergleich zu den IL-10^{-/-} Zellen mit 4,3 % ($\pm 1,6$ %) auf.

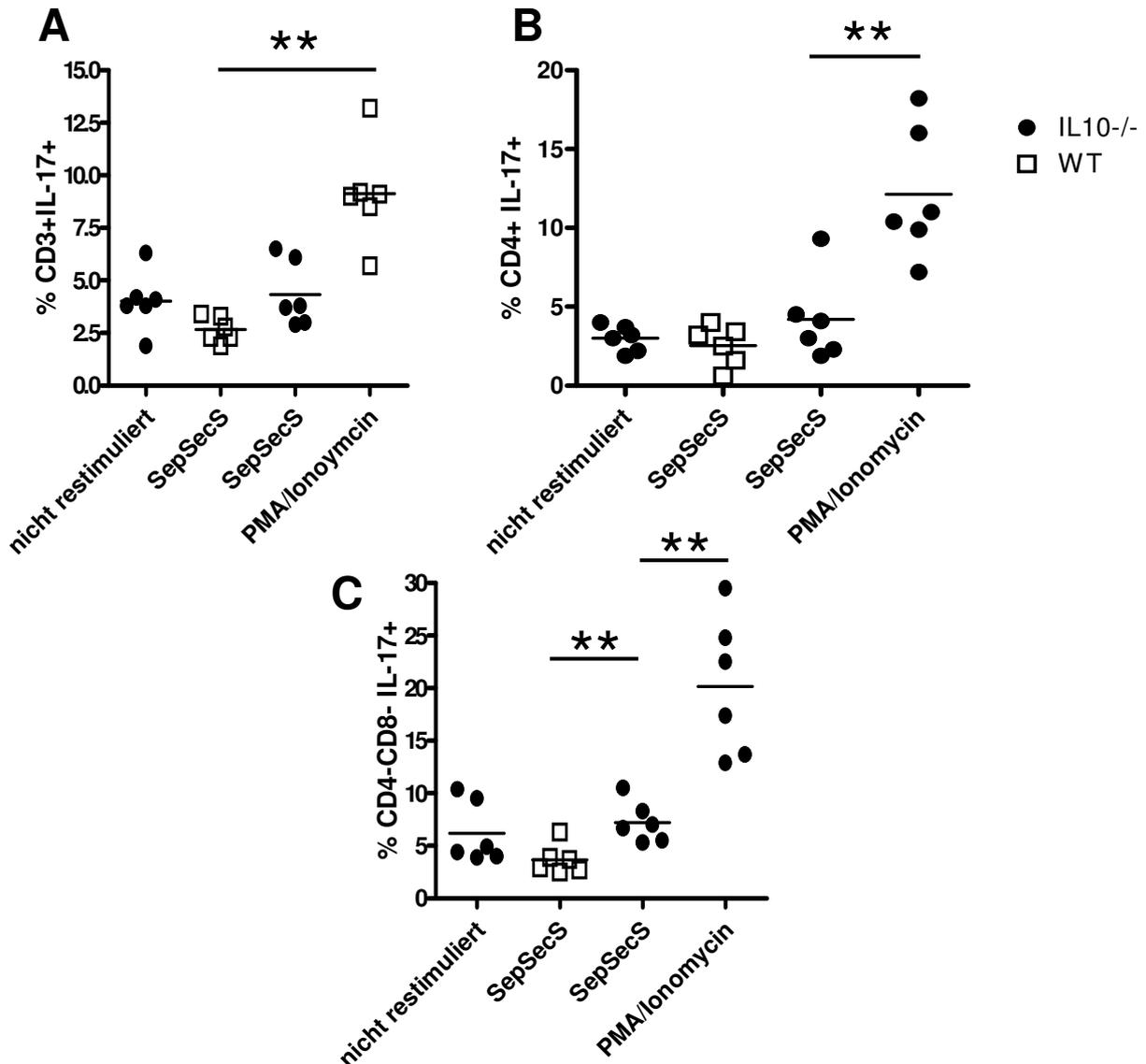


Abbildung 18: Versuchsaufbau 2 - IL-17+IFN- γ - Zellen unterschiedlicher Populationen

A) CD3+ Zellen B) CD4+ Zellen C) CD4-CD8- Zellen

Die Anteile nach maximaler Restimulation mit PMA/Ionomycin lagen bei 9,1 % (WT, $\pm 2,4$ %) und 12,8 % (IL-10^{-/-}, $\pm 3,2$ %). Der Unterschied zwischen den SepSecS- und PMA/Ionomycin restimulierten WT-Zellen war

mit $p = 0,002$ signifikant (**siehe Abbildung 18A**). Für repräsentative FACS-Diagramme der IL-17-Produktion der CD3+ Zellen **siehe Abbildung 14**.

Bei den CD4+ Zellen gab es weder mit SepSecS-Restimulation noch ohne Restimulation einen signifikanten Unterschied in den Anteilen IL-17 produzierender Zellen zwischen den WT und IL-10-/- Mäusen. Dabei hatten den größten Anteil an CD4+IL-17+ Zellen die SepSecS-restimulierten IL-10-/- Mauszellen mit 4,2 % ($\pm 2,7$ %). In der maximalen Restimulation mit PMA/Ionomycin zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede. Hier lag der IL-17-Anteil bei 11,1 % (WT, $\pm 4,6$ %) und bei 12,1 % (IL-10-/-, $\pm 4,1$ %) (**siehe Abbildung 18**). Ferner zeigten sich in den Anteilen IL-17 produzierender CD8+ Zellen keine signifikanten Unterschiede. Er lag sowohl bei WT als auch bei IL-10-/- Mäusen zwischen 1,2 % und 2,7 % CD8+ IL-17+ Zellen in allen drei Restimulationsansätzen. Allerdings wiesen die CD8+ Zellen eine große Standardabweichung im Anteil der IL-17+ Zellen auf. Für repräsentative FACS-Diagramme der IL-17-Produktion der CD4+ Zellen und der CD8+ Zellen **siehe Abbildungen 15 und 16**.

Die IL-17-Anteile der CD4-CD8- Zellen lagen bei den nicht restimulierten Zellen der WT bei 7,1 % ($\pm 3,8$ %) und der IL-10-/- Mäuse bei 6,2 % (± 3 %). Der Anteil bei den WT-Zellen nach SepSecS-Immunsierung lag bei 3,7 % ($\pm 1,4$ %), in den IL-10-/- Mauszellen hingegen bei 7,2 % ($\pm 1,9$ %). Es bestand ein signifikanter Unterschied ($p = 0,009$) innerhalb der SepSecS-restimulierten Mauszellen beider Gruppen, aber der Unterschied der IL-10-/- Mäuse zwischen der SepSecS-Restimulation und der nicht restimulierten Kontrolle lag lediglich bei einem Prozentpunkt. Nach maximaler Restimulation mit PMA/Ionomycin produzierten 13,8 % ($\pm 3,2$ %) der CD4-CD8- WT-Zellen nur IL-17, während es bei den IL-10-/- Mauszellen 20,1 % ($\pm 6,6$ %) waren ($p = ns$) (**siehe Abbildung 18C**). Für repräsentative FACS-Diagramme der IL-17-Produktion der CD4-CD8-Zellen **siehe Abbildung 17**.

5.2.3 IL-17 und IFN- γ produzierende Zellen

Die CD3+ Zellen der WT und der IL-10-/- Mäuse zeigten im nicht-restimulierten Ansatz, sowie die WT-Zellen im SepSecS-restimulierten Ansatz keinen

nennenswerten Anteil an doppelt positiven Zellen (IL-17 und IFN- γ). Hier lagen die Anteile IL-17+IFN- γ + Zellen unter 0,2 %. Lediglich die SepSecS-restimulierten IL-10-/- Zellen hatten einen Anteil von 1,2 % (\pm 0,5 %). Im Ansatz mit maximaler Restimulation durch PMA/Ionomycin lagen die doppelt positiven Zellen bei den WT-Zellen bei 3,3 % (\pm 1,9 %) und bei den IL-10-/- Mauszellen bei 9,9 % (\pm 3,6 %) ($p = 0,009$).

Die gleiche Tendenz spiegelte sich bei den CD4+ Zellen wieder. Von den nicht restimulierten und den SepSecS-restimulierten Zellen der WT und IL-10-/- Mäuse zeigten nur der SepSecS-restimulierte Ansatz der IL-10-/- Mauszellen einen nennenswerten Anteil an IL-17+IFN- γ + Zellen mit vier Prozent (\pm 4,3 %). Die Anteile an IL-17+IFN- γ + Zellen in den anderen Restimulationsansätzen lagen bei kleiner 0,5 %.

Die WT-Zellen zeigten nach PMA/Ionomycin-Restimulation einen IL-17+IFN- γ + Anteil von 6,9 % (\pm 3,8 %) und die IL-10-/- Mauszellen von 15 % (\pm 6,6 %). Bei den CD8+ Zellen fand sich lediglich nach maximaler Restimulation der IL-10-/- Zellen ein nennenswerter Anteil von 4,7 % (\pm 2,3 %) doppelt positiver zytokinproduzierender Zellen, während die Anteile bei den maximal restimulierten WT-Zellen bei etwa zwei Prozent (\pm 1,1 %) und bei den SepSecS- und nicht restimulierten Zellen der WT und IL-10-/- Mäuse unter einem Prozent lagen. Bei den CD4-CD8- Zellen war eine ähnliche Tendenz vorhanden. Lediglich nach PMA/Ionomycin Restimulation trat ein nennenswerter Unterschied von 2,9 % (\pm 2,3 %) IL-17+IFN- γ + WT-Zellen zu neun Prozent (\pm 5,1 %) IL-17+IFN- γ + Zellen bei den IL-10-/- Mauszellen auf ($p = 0,015$). In den Ansätzen ohne Restimulation und mit SepSecS-Restimulation gab es nur Anteile an IL-17+IFN- γ +CD4-CD8- Zellen von weniger als 1,5 %.

IV. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die weiterführende Beschreibung einer SepSecS-induzierten Leberentzündung in Mäusen mit einem IL-10-defizienten genetischen Hintergrund. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die in den Vorversuchen beschriebene induzierbare Leberentzündung in Mäusen durch deren Immunisierung mit dem injizierten Selbstantigen SepSecS, welche in unseren Untersuchungen konsekutiv auch zur Produktion von SLA/LP-Antikörpern führte. Ebenfalls lässt sich die ausgelöste Leberentzündung anhand von einem in der Leberpathologie gebräuchlichen Histologiescore charakterisieren und so deutlich von unspezifischen Leberentzündungsreaktionen abgrenzen. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 bei der Entstehung dieser Entzündungsreaktion eine hervorgehobene Rolle spielt. IL-10 scheint autoimmunologische Prozesse in der Leber und den Lymphknoten der Mäuse zu hemmen, da lediglich bei IL-10-defizienten Mäusen eine charakteristische, der AIH-ähnliche Leberentzündung durch SepSecS-Immunisierung hervorgerufen werden konnte. Zudem wurde deutlich, dass die IL-10-Defizienz die Leberinfiltration von T_H1-Zellen begünstigt.

1. Autoantikörper

Die Anteile an SLA/LP-Antikörper-positiven Mäusen von mindestens 73 % sowohl bei den WT als auch den IL-10^{-/-} Mäusen zeigen, dass der Großteil der immunisierten Mäuse sich immunologisch mit dem injizierten Selbstantigen auseinandergesetzt hat und es konsekutiv zu einer induzierten Autoimmunreaktion gegen das mäuseeigene SepSecS-Protein gekommen ist. Die Bildung der Autoantikörper bei SLA/LP-positiven AIH-Patienten ist ein entscheidendes Charakteristikum, somit war die Bildung dieser Autoantikörper auch ein hinreichendes Kriterium für unser Mausmodell.

Die Untersuchung der Antinukleären Antikörper macht deutlich, dass es zu keiner wesentlichen Bildung von ANA in unserem Mausmodell und den WT kommt. Die jeweils einzelnen ANA-positiven Seren bei WT und IL-10^{-/-} Mäusen

sind möglicherweise auf eine stärkere Immunantwort in den betroffenen Mäusen zurückzuführen. Über die Bedeutung von ANA in einem AIH-Mausmodell besteht derzeit in der Literatur keine eindeutige Meinung. In einigen Mausmodellen können Autoantikörper, darunter auch Antinukleäre Antikörper, gefunden werden, in anderen wiederum nicht (Bogdanos 2008, Kido et al. 2008). Die Frage nach der Ursache der ANA bleibt also – nicht nur im Tiermodell – offen.

Allerdings werden aktuell einige Hypothesen diskutiert, die als Ursache der ANA eine übermäßige Anzahl apoptotischer Zellbestandteile im Gewebe beschreiben, welche konsekutiv zu einer fehlgeleiteten Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem und somit zur Antikörperbildung führen. Eine erhöhte Apoptoseneigung, hervorgerufen durch genetische Veranlagung und exogene Faktoren, könnte zu einer erhöhten Anzahl an apoptotischen nukleären Zellbestandteilen und damit potentiellen Autoantigenen führen, ebenso wie Defekte in der geordneten Beseitigung von apoptotischem Material. Zudem werden Autoantigene in den Apoptosebläschen als besonders anfällig für oxidativen Stress oder anderweitige Modifikation beschrieben, welche unter Umständen die Auslösung einer Autoimmunreaktion erleichtert (Smeenk 2000). Wieso kommt es aber in einigen Mausmodellen nicht zur ANA-Bildung? Unter Berücksichtigung der im obigen Abschnitt diskutierten Ursachen für die ANA lässt sich an dieser Stelle spekulieren, dass möglicherweise der Zellschaden nach Induktion der Hepatitis in den Modellen ohne ANA nicht gravierend genug ist. Möglicherweise können sich nach Immunisierung mit einem zytosolischen Antigen wie SepSecS auch keine Autoantikörper gegen Kernantigene apoptischer Zellen entwickeln.

Die hier beschriebenen Untersuchungsansätze im Mausmodell können aufgrund der geringen Anzahl an Mäusen lediglich als Hinweis, nicht als fundierte Aussage bezüglich der ANA-Bildung gewertet werden. Möglicherweise fluktuierten die ANA auch zu stark und der variable Zeitraum zwischen erster und zweiter SepSecS-Immunisierung macht eine mehrzeitige Bestimmung der ANA-Titer bei den Mäusen notwendig (Czaja 1999).

2. Grading der histologischen Entzündungsreaktion

Die typische Leberhistologie ist ein wichtiges phänotypisches Charakteristikum der Autoimmunen Hepatitis beim Menschen. Die Anwendung des mHAI zeigt, dass hier im untersuchten Mausmodell deutliche Unterschiede in der Entzündungsaktivität und -verteilung zwischen den WT und IL-10^{-/-} Mäusen auftraten. Die IL-10-defizienten Mäuse zeigten in ihrer Gesamtheit alle Eigenschaften einer autoimmunen Leberentzündung, wie sie auch beim Menschen zu erwarten gewesen wären. Bei den WT zeigte keine Maus eine Interface-Hepatitis und lediglich eine Maus eine konfluierende Nekrose. Vermutlich sind die histologischen Entzündungszeichen bei den WT auf den Effekt des in der SepSecS-Emulsion enthaltenen CFA zurückzuführen, welches aufgrund seiner bakteriellen Bestandteile zu einer unspezifischen Reaktion der Leber führt, während es bei den IL-10^{-/-} Mäusen durch die SepSecS-Komponente in der Emulsion zu einer zielgerichteten Entzündungsreaktion kommt. Dies könnte in einem vergleichenden Experiment verifiziert werden bei dem der einzige Unterschied die SepSecS-Komponente in der Immunisierungsemulsion ist. Hierbei würden IL-10^{-/-} Mäuse entweder mit PBS/CFA oder mit SepSecS/CFA immunisiert werden. Dadurch könnte der singuläre Effekt des SepSecS auf die Entstehung der induzierten Hepatitis besser untersucht werden. Diese Arbeit zeigt, dass es für einen objektiven und standardisierten Vergleich der histologischen Entzündungsreaktionen der Lebern verschiedener AIH-Mausmodelle sinnvoll ist, den mHAI bei Mäusen in ähnlicher Weise wie beim Menschen anzuwenden.

Offen bleibt weiterhin die Frage, welche Zelltypen für die Entstehung und Aufrechterhaltung der typischen Entzündungsinfiltrate der SepSecS-induzierten Hepatitis verantwortlich sind. Kido et al. gehen in ihrer Arbeit derselben Frage in einem anderen AIH-Mausmodell nach und beschreiben sowohl die Verteilung als auch die Funktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in ihrem Modell (Kido et al. 2008). Die Autoren schlussfolgern, die CD4⁺ T-Zellen seien vor allem für die Induktion der Hepatitis verantwortlich und fänden sich histologisch überwiegend in den Portalfeldern, während die CD8⁺ T-Zellen, vermutlich rekrutiert durch CD4⁺ T-Zellen, lediglich in der Progression hin zu einem massiven Leberzellschaden eine Rolle spielten und sich diffus im gesamten

Leberparenchym befänden. In Untersuchungen von Senaldi et al. stellten zytotoxische CD8⁺ T-Zellen vor allem die Mehrheit der Zellen in den Nekrosezonen dar (Senaldi et al. 1992). Es bleibt weiter zu klären, welchen Anteil antigenspezifische CD4⁺ Lymphozyten in den Entzündungsinfiltraten ausmachen und ob sie, wie von Liberal et al. vermutet, den Leberschaden steuern (Liberal et al. 2011). Verantwortlich für den eigentlichen, unspezifischen Leberschaden ist der Literatur nach eher die zytokinabhängige „Bystander-Hepatitis“, die durch Bowen et al. beschrieben wurde (Bowen et al. 2002).

3. Effektormechanismen beteiligter Lymphozyten

In den vorliegenden Untersuchungen zur Effektorantwort isolierter Lymphozyten aus Lymphknoten und Lebern zeigten die Zellen der IL-10^{-/-} Mäuse gegenüber den Zellen der WT deutlich ausgeprägtere IL-17- und IFN- γ -Zytokinantworten. Auffallend war zudem, dass die Leber-infiltrierenden Lymphozyten der IL-10^{-/-} Mäuse nach Kontakt mit dem Autoantigen SepSecS zwar große Mengen IFN- γ , aber nur wenig IL-17 in der Kultur sezernierten.

Die Analysen der Lymphknoten-Lymphozyten erlauben prinzipielle Rückschlüsse auf die im Lymphknoten initiierte T-Zelldifferenzierung der naiven T-Zellen in zeitlichem Zusammenhang zum ersten Kontakt mit dem gespritzten Autoantigen SepSecS. Die dabei angestoßenen Differenzierungsprozesse der Lymphozyten sind dann maßgeblich für den weiteren pathophysiologischen Pathway der geprimten Lymphozyten verantwortlich, wie etwa die Einwanderung von antigen-spezifischen Lymphozyten in die Leber. Die mehr als doppelt so hohe Zytokinausschüttung von IL-17 und IFN- γ durch Lymphknoten-Lymphozyten im Vergleich zwischen WT und IL-10^{-/-} Mäusen macht deutlich, dass das inflammatorische Potential der IL-10^{-/-} Mäuse größer ist, wodurch diese für eine Leberentzündung empfänglicher zu sein scheinen. Diese erhöhte Zytokinproduktion in IL-10^{-/-} Mäusen konnte dabei sowohl durch eine Antigen-spezifische, als auch unspezifische Stimulation ausgelöst werden. Die überschießende Ausschüttung von IFN- γ bei den SepSecS-restimulierten Lymphknoten-Lymphozyten unterstreicht die Hypothese einer T_H1-vermittelten Pathogenese. Dabei scheinen die im Lymphknoten geprimten Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen hauptverantwortlich für die Steuerung der Entzündungsreaktion in der Leber zu sein (Vergani und Mieli-Vergani 2008,

Liberal et al. 2011). Die Gesamtheit der Leber-infiltrierenden Lymphozyten stellt sich vermutlich als eine heterogenere Population reaktiver zellschädigender Lymphozyten dar, die beispielsweise neben spezifischen CD4⁺ T-Zellen auch reaktive CD8⁺ T-Zellen (Senaldi et al. 1992) und solche Zellen beinhalten, die aufgrund der Orchestrierung lediglich unspezifisch, bedingt durch das umgebende Zytokinmilieu, zum Entzündungsherd in der Leber gerufen werden und somit eine „Bystander-Hepatitis“ formieren (Bowen et al. 2002), die aber ebenfalls zu immensen Zytokinausschüttungen führt, wie wir sie beispielhaft anhand des sezernierten IFN- γ in unseren Kulturen der Leber-infiltrierenden Lymphozyten finden konnten.

Für ein tieferes Verständnis der Differenzierungsvorgänge der untersuchten Lymphozyten, wären weiterführende Arbeiten sinnvoll. Dabei sollte die Zusammensetzung der Lymphozyten aus den Lymphknoten SepSecS-immunisierte Mäuse und deren Effektorzytokinen untersucht werden, um mögliche phänotypische Unterschiede zu den Leber-infiltrierenden Lymphozyten darzustellen und daraus Rückschlüsse über die Rekrutierungsmechanismen ziehen zu können.

4. Komposition und Effektorzytokine der Leber-infiltrierenden Lymphozyten

In der Analyse der verschiedenen Zellpopulationen Leber-infiltrierender Lymphozyten fällt die unterschiedliche CD4/CD8-Ratio zwischen den WT und IL-10^{-/-} Mäusen auf. Während sich in der Zellkultur ohne Restimulation bei den IL-10^{-/-} Mäusen im Durchschnitt etwa 17 % mehr CD3⁺CD4⁺ Zellen finden, sind es bei den CD3⁺CD8⁺ Zellen etwa 14 % weniger als bei den WT. Die CD4/CD8-Ratio ist bei Lymphknotenzellen von WT und IL-10^{-/-} Mäusen, die eine SepSecS-Injektion in die Pfote erhalten haben (Daten nicht gezeigt) in ähnlicher Weise verschoben, sodass hier von einem systemischen Effekt auszugehen ist, der nicht nur die LIL betrifft, wie es beispielsweise aufgrund von T-Zell-Rekrutierungsmechanismen in der Leber für die PSC (Grant et al. 2002) und allgemein für die Leber von Klugewitz et al. gezeigt wurde (Klugewitz et al. 2002, Klugewitz et al. 2004).

Eine nahe liegende mögliche Erklärung für das systemische Phänomen der verschobenen CD4/CD8-Ratio ist der Effekt von IL-10 auf T-Zellen (Moore et al. 2001). De Waal Malefyt et al. fanden heraus, dass IL-10 in der Lage ist, die Proliferation von humanen CD4⁺ T-Zellen durch Inhibition antigen-präsentierender Monozyten zu unterdrücken (de Waal Malefyt et al. 1991). Durch die Abwesenheit von IL-10 könnte die inhibierende Wirkung wegfallen und so zu einer verstärkten Proliferation von CD4⁺ T-Zellen führen. Dass IL-10 auch in akuten Entzündungsreaktionen einen Einfluss auf die CD4⁺ T-Zellen hat, legen die Arbeiten von Brooks et al. nahe (Brooks et al. 2009). Sie zeigen, dass IL-10 sowohl die Effektor- als auch Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellantwort in Folge einer akuten viralen Infektion inhibieren kann. Durch eine IL-10-Blockade erhöhte sich dort ebenfalls das Vorkommen von IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen. Es zeigte sich allerdings kein Einfluss auf die Entwicklung von Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu konnten Rowbottom et al. in Zellkulturen nachweisen, dass IL-10 selektiv und APC-unabhängig in der Lage ist, eine sekundäre polyklonale CD8⁺ T-Zellproliferation zu induzieren (Rowbottom et al. 1999). Ob möglicherweise das Fehlen von IL-10 in unserem Mausmodell der SepSecS-induzierten Autoimmunen Hepatitis gegenteilige Wirkungen auf die CD8⁺ T-Zellen hat, und somit möglicherweise für die reduzierte Zahl an CD8⁺ Zellen in den IL-10^{-/-} Mäusen verantwortlich ist, sollte durch weitere Versuche eruiert werden.

Ähnlich wie in den ELISA-Untersuchungen wird durch die durchflußzytometrische Untersuchung die dominante Stellung des IFN- γ deutlich, die auch hier auf eine T_H1-verursachte Pathogenese hindeutet. Aber auch die CD8⁺IFN- γ ⁺ T-Zellen fallen mit IFN- γ -Anteilen von über 70 % auf. Für die IL-17-Produktion sind CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Zellen in unserem Mausmodell hauptverantwortlich. In die untersuchte Population der CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Zellen unseres Mausmodells fallen zwei Subpopulationen ($\gamma\delta$ und NK-T-Zellen), deren endgültige Bedeutung innerhalb der Pathogenese der AIH noch ungeklärt ist. Sie stellen aufgrund ihrer Kombination von Oberflächenmolekülen adaptiver und angeborener Immunzellen ein Bindeglied zwischen diesen beiden Komponenten des Immunsystems dar. $\gamma\delta$ T-Zellen tragen einen T-Zellrezeptor mit γ - und δ -Untereinheiten und kommen laut Jensen et al. sowohl als IL-17 und auch als IFN- γ sezernierende $\gamma\delta$ T-Zellen

vor, abhängig davon, ob sie vor der T-Zellrezeptorstimulation Antigenkontakt hatten oder nicht (Jensen et al. 2008). In der AIH scheinen sie in erhöhter Anzahl und mit gesteigerter IFN- γ - und Granzym B-Produktion zu wirken (Ferri et al. 2010).

Eine andere Population CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Zellen, denen eine Rolle in der Pathogenese der AIH zugeschrieben wird, sind die NK-T-Zellen. Sie tragen sowohl den T-Zellrezeptor, als auch den Marker NK1.1 der Natürlichen Killer-Zellen und sind in der Lage, situationsabhängig ein breites Zytokinspektrum, darunter Zytokine der T_H1-, T_H2- und T_H17-Effektormechanismen, zu sezernieren (Godfrey et al. 2000). In diesem Zusammenhang werden ihnen in verschiedenen Modellen autoimmuner Erkrankungen zum Teil proinflammatorische Eigenschaften, wie beispielsweise im Mausmodell der Con-A induzierten Hepatitis, oder antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben, so in Mausmodellen der Multiplen Sklerose oder des Diabetes mellitus Typ 1 (Santodomingo-Garzon und Swain 2011). Beide Zelltypen können somit zum Teil auch für die im ELISA gemessene Zytokinausschüttung verantwortlich sein. In weiteren Versuchen sollten die beteiligten Effektormechanismen dieser Zelltypen in dem hier untersuchten Mausmodell näher untersucht werden.

Bei den untersuchten Zellen wird weiterhin der entscheidende Einfluss des genetischen Hintergrunds der IL-10^{-/-} Mäuse auf das Zytokinmilieu deutlich, der nach *in-vitro* Kontakt mit SepSecS bei den CD3⁺ Zellen der IL-10^{-/-} Mäuse und den dazugehörigen Subpopulationen der CD3⁺CD8⁻CD4⁻, CD3⁺CD8⁺ und CD3⁺CD4⁺ Zellen zu signifikant höheren Anteilen IFN- γ ⁺ Zellen führt als bei den WT. Die IL-10-Defizienz hat auf die Produktion von IL-17 einen weniger deutlichen Einfluss und scheint hier lediglich als Subpopulation der CD3⁺ Zellen die CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Zellen zu beeinflussen.

Durch das spezielle proinflammatorische Zytokinmilieu, welches durch die IL-10^{-/-} Defizienz verursacht wird, kommt es nach *in-vitro* Restimulation mit SepSecS bei den IL-10^{-/-} Mauszellen zur massiven Sekretion von IFN- γ , die ohne das Protein in der Kultur nicht auftritt. Bei den Zellen der WT wird nach *in-vitro* SepSecS-Restimulation möglicherweise eine ähnliche Anzahl an Zellen aktiviert, diese zeigen jedoch bei erhaltener IL-10-Wirkung in den WT eine

geringere Bereitschaft zur Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine, beispielhaft gezeigt an der IFN- γ -Ausschüttung. Dieses Phänomen der unterschiedlichen Bereitschaft der Zellen zur Zytokinausschüttung lässt sich nur bei SepSecS-spezifischer Restimulation beobachten und nicht bei der maximalen Form der Restimulation durch PMA/Ionomycin, bei der eine zusätzliche Aktivierung auch unspezifischer Zellen die entscheidende Zytokinproduktion der spezifischen Zellen überlagert.

Die Einordnung der Ätiopathogenese unseres Mausmodells in die starren T_H1-, T_H2- oder T_H17-Effektormechanismen (Mosmann et al. 1986, Park et al. 2005) ist zum jetzigen Zeitpunkt schwierig. Aufgrund der bestehenden IFN- γ -Dominanz in unserem Modell ist den T_H1-Zellen sicherlich eine gewichtige Rolle zuzuschreiben. Demgegenüber wird in dieser Arbeit die Rolle des IL-17 noch nicht ganz deutlich, zudem auch die Funktion von IL-17 bezüglich einer proinflammatorischen oder protektiven Wirkung in immunologischen Erkrankungen noch nicht abschließend geklärt ist (Marwaha et al. 2012). Auch dem IFN- γ wird mittlerweile eine komplexere und ambivalente Funktion, sowie teils protektive Eigenschaften während des Krankheitsprogresses autoimmuner Erkrankungen zugeschrieben, wie in einer Übersicht von Rosloniec et al. anschaulich zusammengestellt (Rosloniec et al. 2002). Zhang beschreibt IFN- γ in entzündlichen Prozessen als ein zunächst proinflammatorisches Zytokin, welches zu einem bestimmten Punkt des Entzündungsprozesses in seiner Wirkung umschlägt und regulatorisch durch Initiierung eines negativen Feedbacks zum Abklingen der Entzündung führt (Zhang 2007).

Unveröffentlichte Untersuchungen der Arbeitsgruppe um A. Lohse konnten zudem aber bei AIH-Patienten zeigen, dass aus Leberbiopsien gewonnene Lymphozyten ebenfalls eine überwiegende IFN- γ -, aber kaum eine IL-17-Sekretion aufweisen.

Dem regulatorischen Zusammenspiel und möglichen Interaktionen zwischen IL-17 und IFN- γ sollte in weiteren Untersuchungen unseres Mausmodells vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden, denn es gibt Hinweise, dass T_H17-Zellen die eigene Konversion in IFN- γ produzierende T-Zellen durch Induktion von IL-12 und IL-23 sezernierenden Dendritischen Zellen fördern können (Feng et al. 2011). Bei Patienten mit Morbus Crohn, der ebenfalls zu

den Autoimmunerkrankungen gezählt wird, konnten im Darm IFN- γ produzierende T_H17-Zellen gefunden werden, die sowohl Eigenschaften von T_H1- als auch T_H17-Zellen aufzeigten (Annunziato et al. 2007). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell stand die Untersuchung der IL-17+IFN- γ + Zellen nicht im Fokus, dennoch fanden wir heraus, dass es zwischen WT und IL-10-/- Mäusen signifikante Unterschiede in den Anteilen IL-17 und IFN- γ produzierender Zellen gab, die insbesondere CD3+CD4-CD8- und CD3+CD4+ Zellen betrafen. Welche Rolle sie in der Pathogenese einnehmen und ob sie möglicherweise ein verknüpfendes Element des T_H1- und T_H17-Pathways darstellen, bleibt offen. Durch Antikörper-Depletion solcher wesentlicher Zytokine ließe sich möglicherweise die Rolle in der Pathogenese dieses Modells näher beleuchten, was für kommende Versuche sicherlich ratsam wäre.

5. Kritische Betrachtung

Abschließend bleibt die Frage zu diskutieren, ob die hier dargestellten Untersuchungen zur Rolle der Autoimmunantwort gegen SepSecS bei Leberentzündung ein ausreichend solides Mausmodell der AIH darstellen oder ob das beschriebene Modell lediglich das Bild einer unspezifischen Reaktion des Immunsystems nach einer Autoantigenimmunisierung widerspiegelt. Diese Frage lässt sich mit den hier dargestellten Untersuchungen nicht eindeutig beantworten. Zur ganzheitlichen Betrachtung des Mausmodells sollen aber neben den schon erwähnten bestätigenden Aspekten auch einige kritische aufgearbeitet werden.

Als ein Kritikpunkt des beschriebenen Modells müssen in diesem Zusammenhang die bis jetzt fehlenden Untersuchungen der Effektormechanismen und Zytokinproduktion im jüngeren Alter der Mäuse genannt werden. Möglicherweise unterliegen Mausmodelle mit IL-10-/- Defizienz einer ausgeprägten dynamischen Veränderung des Zytokinmilieus, insbesondere während der Entwicklung der Mäuse und nach Induktion der Erkrankung. Diese Vermutung wirft zumindest die Untersuchung von Gomes et al. auf, die für ihr IL-10-/- Mausmodell der spontanen Kolitis aufgrund altersabhängiger Unterschiede in der Zytokinkonzentration von IL-17 und IFN- γ

postulieren, dass in den IL-10^{-/-} Mäusen das IL-17 eine wichtige Rolle während der Initiierung der autoimmunen Inflammation gegen die Kolonschleimhaut spielt und es dann im weiteren Verlauf zur verstärkten IFN- γ -Produktion kommt (Gomes-Santos et al. 2012). Dies wirft für das in dieser Arbeit beschriebene Modell die Frage auf, wie sich die IL-17 und IFN- γ -Konzentrationen in der Leber im Altersverlauf darstellen. Fällt die im Vergleich zu Lymphozyten von WT deutlich erhöhte Produktion von IFN- γ durch intrahepatische IL-10^{-/-}-Lymphozyten bei jüngeren IL-10^{-/-} Mäusen geringer aus? Steigt dafür der Unterschied in der IL-17-Konzentration zwischen IL-10^{-/-} Zellen und WT-Zellen?

Die histologischen Ähnlichkeiten der Hepatitis von SepSecS-immunisierten IL-10^{-/-} Mäuse im Vergleich zur Histologie einer humanen AIH lassen sich durch Anwendung des mHAI darstellen und bekräftigen damit die Hypothese, dass dort auf zellulärer Ebene vergleichbare Prozesse wie beim Menschen ablaufen, die zu dieser speziellen Ausprägung der Hepatitis führen. Allerdings wären hier weiterführende Versuche für den Nachweis einer spezifisch durch SepSecS-Autoimmunität verursachten Hepatitis notwendig. Eine „sham“-Immunisierung von WT und IL-10^{-/-} Mäusen mit PBS/CFA, wo lediglich das fehlende Autoantigen den Unterschied zu dem hier angewendeten Versuchsaufbau darstellt, wäre eine sinnvolle Methode, um den Effekt von SepSecS auf die Hepatitis im untersuchten Mausmodell näher zu untersuchen. Daran lässt sich die kritische Frage nach dem zytologischen Aspekt der Leberinfiltrate anschließen. Die hier angeführten Untersuchungen haben sich nicht konkret der Beantwortung der Frage gewidmet, inwieweit es wirklich zu SepSecS-verursachter Leberinfiltration spezifischer T-Zellen in unserem Mausmodell kommt. In zukünftigen Untersuchungen wäre daher zu klären, ob sich beispielsweise durch SepSecS-HLA-Klasse-II-Peptid-Tetramere spezifische Lymphozyten in den Lebern der immunisierten Mäuse darstellen lassen oder ob die nachgewiesenen Infiltrate ganzheitlich eine unspezifische Umgebungsreaktion darstellen.

Der genetische Hintergrund der IL-10-Defizienz spielt in diesem Mausmodell eine entscheidende Rolle, indem es die Grundlage des proinflammatorischen Milieus in diesem Modell einer Autoimmunerkrankung darstellt. Der Knockout

des IL-10, einem pleiotropen Zytokin, welches eine dominante Rolle in der Immun- und Entzündungsregulation sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems spielt, führt konsequenterweise zu nicht komplett überschaubaren Effekten auf die immunregulatorischen Vorgänge in der Maus. Zudem ergibt sich die Frage, ob der Knockout dieses Zytokins mit seinen weitreichenden Wirkungen überhaupt in irgendeiner Form Modellcharakter für die humane Erkrankung haben kann. Ein Aspekt der Wirkung einer IL-10-Defizienz kann, wie hier, zur Abbildung einer AIH-ähnlichen Hepatitis führen, andere Aspekte können zum Beispiel zur Ausbildung einer Kolitis führen.

V. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit angeführten Untersuchungen hatten die weiterführende Charakterisierung einer SepSecS-induzierten Leberentzündung in IL-10-defizienten Mäusen zum Ziel. Hierbei konnten wir die für eine Unterform der AIH pathognomonischen SLA/LP-Autoantikörper nachweisen, die eine spezifische Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem injizierten SepSecS ableiten lassen. Es ließen sich allerdings keine Antinukleären Antikörper nachweisen. Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Immunisierung der IL-10^{-/-} Mäuse unseres Modells mit dem Autoantigen SepSecS zu einer charakteristischen Leberentzündung führt. Die beobachteten und mittels des mHAI objektiv bewerteten histologischen Charakteristika sind bei den untersuchten IL-10^{-/-} Mäusen mit denen einer humanen AIH vergleichbar und weisen so auf einen autoimmunen Charakter der hervorgerufenen Hepatitis hin. Bei funktionaler Anwesenheit von IL-10, wie in den untersuchten WT, wurde lediglich eine unspezifische Leberentzündung hervorgerufen, welche die inhibierende Rolle von IL-10 im Rahmen unseres Modells der SepSecS-induzierten Leberentzündung deutlich macht. Die IL-10-Defizienz machte sich bei den murinen Lymphknoten- und Leberlymphozyten mit einer deutlichen Steigerung der IFN- γ -Sekretion bemerkbar, während dieser Effekt auf die IL-17-Sekretion deutlich geringer ausfiel. Weiterhin zeigte sich bei IL-10^{-/-} Defizienz eine zugunsten der CD4⁺ T-Zellen verschobene CD4/CD8-Ratio. Zudem kam es zu einer vermehrten Infiltration von CD4⁺IFN- γ ⁺ T-Zellen in die Lebern immunisierter IL-10^{-/-} Mäuse, was die Hypothese einer überwiegend T_H1-gesteuerten Pathogenität dieses Hepatitis-Modells unterstreicht. Unklar blieb jedoch, welche quantitativen Anteile in den Infiltraten aus SepSecS-spezifischen T-Zellen und welche lediglich aus ungerichteten Bystander-Zellen gebildet werden.

In dieser Arbeit beschreiben wir einige neue Aspekte zur Rolle der T-Zellen in der Autoimmunantwort bei SepSecS-induzierter Leberentzündung im Mausmodell. Anschlussarbeiten mit der Frage nach Wirkungsweise und Verteilung der SepSecS-spezifischen T-Zellen könnten einen weiteren Beitrag zum tieferen Verständnis der AIH liefern.

VI. Summary

The aim of this doctoral thesis was the further characterisation of a SepSecS-induced liver inflammation in IL-10-deficient mice. Pathognomonic antibodies against soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) in the blood of SepSecS-immunized mice indicate a specific interaction of the immune system with the injected autoantigen SepSecS. However, there was no proof of antinuclear antibodies (ANA).

Histological examinations on liver tissue of SepSecS-immunized IL-10^{-/-} mice revealed a characteristic liver inflammation in terms of periportal interface hepatitis, portal and focal inflammation as well as confluent necrosis. Inflamed liver tissue using the modified histological activity index (mHAI) showed similar characteristics to human AIH, emphasizing the autoimmune constitution of the SepSecS-induced hepatitis. Immunized wildtype (WT), with fully functional IL-10, showed only an unspecific hepatitis in histology. This demonstrates the anti-inflammatory capacity of IL-10 in our model of a SepSecS-induced liver inflammation. IL-10-deficiency caused a significant higher level of IFN- γ in our experiments with both murine lymphocytes of the liver and lymph nodes, while there was a substantially lower influence on the secretion of IL-17. Furthermore, within IL-10-deficient mice, we found a shift in CD4/CD8-ratio towards CD4⁺ T-cells. The hypothesis of a mainly T_H1-driven pathogenicity of this mouse model was supported by our data, showing an increased infiltration of CD4⁺IFN- γ ⁺ T-cells in livers of immunized IL-10^{-/-} mice. It remained unclear which percentage of the infiltrate is formed by SepSecS-specific T-cells among undirected bystander cells.

Our mouse data provide new insight into the T-cell reactivity in the autoimmune response due to SepSecS-induced liver inflammation in IL-10-deficient mice. Further research with a focus on the distribution and function of SepSecS-specific T-cells is needed for a deeper understanding of autoimmune hepatitis.

VII. Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout
°C	Grad Celsius
AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Antigen-presenting cell = Antigen-präsentierende Zelle
AP	Alkalische Phosphatase
ASGPR	Asialoglykoprotein-Rezeptor
AST	Aspartat-Aminotransferase
BL6	Black 6
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CFA	Complete Freund's Adjuvant = Komplettes Freund'sches Adjuvans
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
DNA	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäuren
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay = Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting = Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum = Fetales Kälberserum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC-H	Forward Side Scatter-Hight = Vorwärtsstreulicht-Höhe
FSC-A	Forward Side Scatter-Area = Vorwärtsstreulicht-Fläche
h	Hour = Stunde
HBV	Hepatitis-B Virus
HCV	Hepatitis-C Virus
HCC	Hepatocelluläres Carcinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN- γ	Interferon-gamma

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
LIL	Leber-infiltrierenden Lymphozyten
LKM	Liver Kidney Microsomes = Leber- und Nierenmikrosomen
LPS	Lipopolysaccharid
LSP	Leber-spezifisches Lipoprotein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ns	Nicht signifikant
PBC	Primär Biliäre Zirrhose
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells = periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
P/S	Penicillin/Streptomycin
Q	Quadrant
RE/ml	Relative Einheiten/Milliliter
RNA	Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäuren
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SepSecS	O-Phosphoseryl-tRNA:SelencocysteinyI-tRNA-Synthase
SLA/LP	Soluble Liver Antigen/Liver Pancreas Antigen = lösliches Leberantigen/Leber-Pankreas-Antigen
SMA	Smooth Muscle Antibody = Glatte Muskulatur Antikörper
SSC-A	Side Light Scatter-Area = Seitwärtsstreulicht-Fläche
TCR	T cell receptor = T-Zell Rezeptor
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp

VIII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Differenzierungspfade der T _H 0-Zellen.....	13
Abbildung 2	Nachweis des SepSecS-Proteins mittels der Coomassie-Färbung.....	31
Abbildung 3	SepSecS-induzierte Immunreaktion im murinen Lymphknoten.....	32
Abbildung 4	Immunisierungsschema für die SepSecS-induzierte Hepatitis.....	35
Abbildung 5	Beispielhafte Darstellung von FACS-Analysen der gefärbten Leberlymphozyten.....	39
Abbildung 6	SLA/LP-Antikörperbildung bei WT und IL-10 ^{-/-} Mäusen auf zweifache SepSecS-Immunsierung im Abstand von mehreren Wochen.....	45
Abbildung 7	Histologie einer entzündeten Leber einer Wildtypmaus nach SepSecS-Immunsierung.....	47
Abbildung 8	Periportale Infiltration einer SepSecS-immunisierten IL-10 ^{-/-} Maus.....	48
Abbildung 9	Versuchsaufbau 1 - IFN- γ -Konzentrationen (ELISA).....	50
Abbildung 10	Versuchsaufbau 1 - IL-17-Konzentrationen (ELISA).....	51
Abbildung 11	Versuchsaufbau 2 - IFN- γ -Konzentrationen (ELISA).....	52
Abbildung 12	Versuchsaufbau 2 - IL-17-Konzentrationen (ELISA).....	53
Abbildung 13	Versuchsaufbau 2 - Anteile der CD3 ⁺ Subpopulationen	55
Abbildung 14	Versuchsaufbau 2 - Zytokinproduktion der CD3 ⁺ Zellen.....	57
Abbildung 15	Versuchsaufbau 2 - Zytokinproduktion der CD4 ⁺ Zellen.....	58
Abbildung 16	Versuchsaufbau 2 - Zytokinproduktion der CD8 ⁺ Zellen.....	59
Abbildung 17	Versuchsaufbau 2 - Zytokinproduktion der CD4-CD8 ⁻ Zellen.....	61
Abbildung 18	Versuchsaufbau 2 - IL-17+IFN- γ - Zellen unterschiedlicher Populationen.....	62
Tabelle 1	Vereinfachte Diagnosekriterien der AIH.....	12
Tabelle 2	Kriterien zum Grading der chronischen Hepatitis mittels mHAI.....	41
Tabelle 3	Histologische Auswertung mittels mHAI.....	46

IX. Literaturverzeichnis

Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med 204(8): 1849-61.

Baeres, M., J. Herkel, A. J. Czaja, I. Wies, S. Kanzler, E. L. Cancado, G. Porta, M. Nishioka, T. Simon, C. Daehnrich, W. Schlumberger, P. R. Galle and A. W. Lohse (2002). "Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics." Gut 51(2): 259-64.

Betelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature 441(7090): 235-8.

Bogdanos, D. P. (2008). "Autoimmune Hepatitis: An Update on Current Animal Models." The Open Pathology Journal: 39-45.

Bowen, D. G., A. Warren, T. Davis, M. W. Hoffmann, G. W. McCaughan, B. Fazekas de St Groth and P. Bertolino (2002). "Cytokine-dependent bystander hepatitis due to intrahepatic murine CD8 T-cell activation by bone marrow-derived cells." Gastroenterology 123(4): 1252-64.

Brooks, D. G., K. B. Walsh, H. Elsaesser and M. B. Oldstone (2009). "IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A 107(7): 3018-23.

Czaja, A. J. (1997). "Associations between alleles of the Major Histocompatibility Complex and Type 1 Autoimmune Hepatitis."

Czaja, A. J. (1999). "Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis." J Hepatol 30(3): 394-401.

Czaja, A. J., F. Cassani, M. Cataleta, P. Valentini and F. B. Bianchi (1997). "Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis." Dig Dis Sci 42(8): 1688-96.

Czaja, A. J., M. Nishioka, S. A. Morshed and T. Hachiya (1994). "Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis." Gastroenterology 107(1): 200-7.

de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." J Exp Med 174(4): 915-24.

Desmet, V. J., M. Gerber, J. H. Hoofnagle, M. Manns and P. J. Scheuer (1994). "Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging." Hepatology 19(6): 1513-20.

Donaldson, P. T., D. G. Doherty, K. M. Hayllar, I. G. McFarlane, P. J. Johnson and R. Williams (1991). "Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors." Hepatology 13(4): 701-6.

Duclos-Vallee, J. C. and M. Sebagh (2009). "Recurrence of autoimmune disease, primary sclerosing cholangitis, primary biliary cirrhosis, and autoimmune hepatitis after liver transplantation." Liver Transpl 15 Suppl 2: S25-34.

Feng, T., H. Qin, L. Wang, E. N. Benveniste, C. O. Elson and Y. Cong (2011). "Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production." J Immunol 186(11): 6313-8.

Ferri, S., M. S. Longhi, C. De Molo, C. Lalanne, P. Muratori, A. Granito, M. J. Hussain, Y. Ma, M. Lenzi, G. Mieli-Vergani, F. B. Bianchi, D. Vergani and L. Muratori (2010). "A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis." Hepatology 52(3): 999-1007.

Frenzel, C., J. Herkel, S. Luth, P. R. Galle, C. Schramm and A. W. Lohse (2006). "Evaluation of F-actin ELISA for the diagnosis of autoimmune hepatitis." Am J Gastroenterol 101(12): 2731-6.

Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth and A. G. Baxter (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." Immunol Today 21(11): 573-83.

Gomes-Santos, A. C., T. G. Moreira, A. B. Castro-Junior, B. C. Horta, L. Lemos, D. N. Cruz, M. A. Guimaraes, D. C. Cara, D. M. McCafferty and A. M. Faria (2012). "New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa." Clin Dev Immunol 2012: 560817.

Grant, A. J., S. Goddard, J. Ahmed-Choudhury, G. Reynolds, D. G. Jackson, M. Briskin, L. Wu, S. G. Hubscher and D. H. Adams (2002). "Hepatic expression of secondary lymphoid chemokine (CCL21) promotes the development of portal-associated lymphoid tissue in chronic inflammatory liver disease." Am J Pathol 160(4): 1445-55.

Grutz, G. (2005). "New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression." J Leukoc Biol 77(1): 3-15.

Hennes, E. M., M. Zeniya, A. J. Czaja, A. Pares, G. N. Dalekos, E. L. Krawitt, P. L. Bittencourt, G. Porta, K. M. Boberg, H. Hofer, F. B. Bianchi, M. Shibata, C. Schramm, B. Eisenmann de Torres, P. R. Galle, I. McFarlane, H. P. Dienes and A. W. Lohse (2008). "Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis." Hepatology 48(1): 169-76.

- Herkel, J., B. Heidrich, N. Nieraad, I. Wies, M. Rother and A. W. Lohse** (2002). "Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas." Hepatology 35(2): 403-8.
- Ishak, K., A. Baptista, L. Bianchi, F. Callea, J. De Groote, F. Gudat, H. Denk, V. Desmet, G. Korb, R. N. MacSween and et al.** (1995). "Histological grading and staging of chronic hepatitis." J Hepatol 22(6): 696-9.
- Jensen, K. D., X. Su, S. Shin, L. Li, S. Youssef, S. Yamasaki, L. Steinman, T. Saito, R. M. Locksley, M. M. Davis, N. Baumgarth and Y. H. Chien** (2008). "Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma." Immunity 29(1): 90-100.
- Kanzler, S., H. Lohr, G. Gerken, P. R. Galle and A. W. Lohse** (2001). "Long-term management and prognosis of autoimmune hepatitis (AIH): a single center experience." Z Gastroenterol 39(5): 339-41, 344-8.
- Kido, M., N. Watanabe, T. Okazaki, T. Akamatsu, J. Tanaka, K. Saga, A. Nishio, T. Honjo and T. Chiba** (2008). "Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling." Gastroenterology 135(4): 1333-43.
- Klugewitz, K., D. H. Adams, M. Emoto, K. Eulenburg and A. Hamann** (2004). "The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?" Trends Immunol 25(11): 590-4.
- Klugewitz, K., S. A. Topp, U. Dahmen, T. Kaiser, S. Sommer, E. Kury and A. Hamann** (2002). "Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into murine liver." Hepatology 35(3): 568-78.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo** (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol 27: 485-517.
- Krawitt, E. L.** (2006). "Autoimmune hepatitis." N Engl J Med 354(1): 54-66.
- Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky and W. Muller** (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell 75(2): 263-74.
- Kuriki, J., H. Murakami, S. Kakumu, N. Sakamoto, T. Yokochi, I. Nakashima and N. Kato** (1983). "Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*." Gastroenterology 84(3): 596-603.
- Liberal, R., M. S. Longhi, G. Mieli-Vergani and D. Vergani** (2011). "Pathogenesis of autoimmune hepatitis." Best Pract Res Clin Gastroenterol 25(6): 653-64.
- Lohse, A. W., G. Gerken, H. Mohr, H. F. Lohr, U. Treichel, H. P. Dienes and K. H. Meyer zum Buschenfelde** (1995). "Relation between autoimmune liver diseases and viral hepatitis: clinical and serological characteristics in 859 patients." Z Gastroenterol 33(9): 527-33.

Lohse, A. W., M. Manns, H. P. Dienes, K. H. Meyer zum Buschenfelde and I. R. Cohen (1990). "Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity." Hepatology 11(1): 24-30.

Lohse, A. W. and G. Mieli-Vergani (2011). "Autoimmune hepatitis." J Hepatol 55(1): 171-82.

Longhi, M. S., Y. Ma, G. Mieli-Vergani and D. Vergani (2009). "Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis." J Autoimmun 34(1): 7-14.

Manns (1990). "Discordant manifestation of LKM-1 Antibody positive autoimmune hepatitis." Hepatology (Abstract).

Manns, M., G. Gerken, A. Kyriatsoulis, M. Staritz and K. H. Meyer zum Buschenfelde (1987). "Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen." Lancet 1(8528): 292-4.

Marwaha, A. K., N. J. Leung, A. N. McMurphy and M. K. Levings (2012). "TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic?" Front Immunol 3: 129.

McFarlane, I. G. (2002). "Definition and classification of autoimmune hepatitis." Semin Liver Dis 22(4): 317-24.

Mix, H., C. Weiler-Normann, R. Thimme, G. Ahlenstiel, E. C. Shin, J. Herkel, C. S. David, A. W. Lohse, B.-E. Rehermann, -. (Linking), C. Study, J. Article, N. I. H. Research Support, Intramural and N.-U. S. G. t. Research Support (2008). "Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis." Gastroenterology 135(6): 2107-18.

Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol 19: 683-765.

Mori, Y., T. Mori, H. Yoshida, S. Ueda, K. Iesato, Y. Wakashin, M. Wakashin and K. Okuda (1984). "Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice." Clin Exp Immunol 57(1): 85-92.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol 136(7): 2348-57.

Muratori, L., M. Parola, A. Ripalti, G. Robino, P. Muratori, G. Bellomo, R. Carini, M. Lenzi, M. P. Landini, E. Albano and F. B. Bianchi (2000). "Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane." Gut 46(4): 553-61.

Nolte, W., F. Polzien, B. Sattler, G. Ramadori and H. Hartmann (1995). "Recurrent episodes of acute hepatitis associated with LKM-1 (cytochrome P450 2D6) antibodies in identical twin brothers." J Hepatol 23(6): 734-9.

Ogura, H., M. Murakami, Y. Okuyama, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, M. Kanamoto, M. Nishihara, Y. Iwakura and T. Hirano (2008). "Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction." Immunity 29(4): 628-36.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol 6(11): 1133-41.

Peiseler, M., M. Sebode, B. Franke, F. Wortmann, D. Schwinge, A. Quaas, U. Baron, S. Olek, C. Wiegand, A. W. Lohse, C. Weiler-Normann, C. Schramm and J. Herkel (2012). "FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency." J Hepatol 57(1): 125-32.

Rennick, D., N. Davidson and D. Berg (1995). "Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation." Clin Immunol Immunopathol 76(3 Pt 2): S174-8.

Rosloniec, E. F., K. Latham and Y. B. Guedez (2002). "Paradoxical roles of IFN-gamma in models of Th1-mediated autoimmunity." Arthritis Res 4(6): 333-6.

Rowbottom, A. W., M. A. Lepper, R. J. Garland, C. V. Cox and E. G. Corley (1999). "Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation." Immunology 98(1): 80-9.

Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol 22: 531-62.

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell 133(5): 775-87.

Santodomingo-Garzon, T. and M. G. Swain (2011). "Role of NKT cells in autoimmune liver disease." Autoimmun Rev 10(12): 793-800.

Saraiva, M. and A. O'Garra (2010). "The regulation of IL-10 production by immune cells." Nat Rev Immunol 10(3): 170-81.

Scheiffarth, F., H. Warnatz and K. Mayer (1967). "Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis." J Immunol 98(2): 396-401.

Scheiffarth, F., H. Warnatz and W. Niederer (1965). "[Animal experiment studies on the pathogenesis of chronic hepatitis. I. Morphological liver studies following sensitization with homologous liver cell fractions]." Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 339(4): 358-63.

Senaldi, G., B. Portmann, A. P. Mowat, G. Mieli-Vergani and D. Vergani (1992). "Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis." Arch Dis Child 67(12): 1447-53.

Smeenk, R. J. (2000). "Antinuclear antibodies: cause of disease or caused by disease?" Rheumatology (Oxford) 39(6): 581-4.

Stechemesser, E., R. Klein and P. A. Berg (1993). "Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis." Hepatology 18(1): 1-9.

Steinman, L. (2007). "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." Nat Med 13(2): 139-45.

Stellon, A. J., J. J. Keating, P. J. Johnson, I. G. McFarlane and R. Williams (1988). "Maintenance of remission in autoimmune chronic active hepatitis with azathioprine after corticosteroid withdrawal." Hepatology 8(4): 781-4.

Strettell, M. D., P. T. Donaldson, L. J. Thomson, P. J. Santrach, S. B. Moore, A. J. Czaja and R. Williams (1997). "Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis." Gastroenterology 112(6): 2028-35.

Vergani, D. and G. Mieli-Vergani (2008). "Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis." World J Gastroenterol 14(21): 3306-12.

Vergani, D., G. Mieli-Vergani, M. Mondelli, B. Portmann and A. L. Eddleston (1987). "Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage." Liver 7(6): 307-15.

Vergani, G. M., D. Vergani, P. J. Jenkins, B. Portmann, A. P. Mowat, A. L. Eddleston and R. Williams (1979). "Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in HBsAg-negative chronic active hepatitis." Clin Exp Immunol 38(1): 16-21.

Wen, L., Y. Ma, D. P. Bogdanos, F. S. Wong, A. Demaine, G. Mieli-Vergani and D. Vergani (2001). "Pediatric autoimmune liver diseases: the molecular basis of humoral and cellular immunity." Curr Mol Med 1(3): 379-89.

Wen, L., M. Peakman, A. Lobo-Yeo, B. M. McFarlane, A. P. Mowat, G. Mieli-Vergani and D. Vergani (1990). "T-cell-directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis." Lancet 336(8730): 1527-30.

Werner, M., H. Prytz, B. Ohlsson, S. Almer, E. Bjornsson, A. Bergquist, S. Wallerstedt, H. Sandberg-Gertzen, R. Hultcrantz, P. Sangfelt, O. Weiland and A. Danielsson (2008). "Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study." Scand J Gastroenterol 43(10): 1232-40.

Wies, I., S. Brunner, J. Henninger, J. Herkel, S. Kanzler, K. H. Meyer zum Buschenfelde and A. W. Lohse (2000). "Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis." Lancet 355(9214): 1510-5.

Wucherpfennig, K. W., I. Catz, S. Hausmann, J. L. Strominger, L. Steinman and K. G. Warren (1997). "Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes." J Clin Invest 100(5): 1114-22.

Yoshizawa, K., A. Matsumoto, T. Ichijo, T. Umemura, S. Joshita, M. Komatsu, N. Tanaka, E. Tanaka, M. Ota, Y. Katsuyama, K. Kiyosawa, M. Abe and M. Onji (2012). "Long-term outcome of Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis." Hepatology 56(2): 668-76.

Yuan, J., S. Palioura, J. C. Salazar, D. Su, P. O'Donoghue, M. J. Hohn, A. M. Cardoso, W. B. Whitman and D. Soll (2006). "RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea." Proc Natl Acad Sci U S A 103(50): 18923-7.

Zhang, J. (2007). "Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease." J Clin Invest 117(4): 871-3.

Zhao, L., Y. Tang, Z. You, Q. Wang, S. Liang, X. Han, D. Qiu, J. Wei, Y. Liu, L. Shen, X. Chen, Y. Peng, Z. Li and X. Ma (2011). "Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression." PLoS One 6(4): e18909.

X. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Dissertationsschrift begleitet, unterstützt und gefördert haben. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Lohse, der mir im Rahmen des Graduiertenkollegs 841 „Entzündung und Regeneration“ die Möglichkeit geboten hat in den Laboren seiner Klinik diese Dissertation anfertigen zu können.

Mein Doktorvater Herr Prof. Dr. Johannes Herkel stand während der gesamten Zeit als stetiger Ansprechpartner für Fragen und Ergebnisdiskussionen zur Verfügung. Ihm gilt mein aufrichtiger Dank für sein offenes Ohr und die konstruktiven Gespräche. Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Christina Weiler-Normann herzlich bedanken. Ihr klinisch-wissenschaftlicher Blick auf das Thema dieser Dissertation hat die Durchführung der Experimente und die Diskussion der Ergebnisse maßgebend bereichert. Die anfängliche Einarbeitung am Laborarbeitsplatz, die wissenschaftlich-praktische Unterstützung am Durchflusszytometer, sowie die begleitenden Gespräche erleichterten die Arbeit im Labor. Bei Herrn Dr. Alexander Quaas bedanke ich mich für die stets zeitnahe Beurteilung der Histologien.

Auf die intensive Zeit im Graduiertenkolleg und die gemeinschaftliche Arbeit im Labor blicke ich gerne zurück und bedanke mich für die fruchtbaren Gespräche und wissenschaftlichen Anstöße meiner Kondoktoranden. Ein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Jan-Hendrik Kozik, Dr. Moritz Peiseler und Dr. Till Bornscheuer, sowie Dr. Antonella Carambia und Dr. Dorothee Schwinge. Der „Ski-Kongress“ und so manches After-Work im Labor bleiben unvergessen.

Unsere medizinisch-technischen Assistenten Marko Hilken, Agnes Malotta und Gerlinde Apitzsch haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zu guter Letzt gilt ein herzlicher Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die durchhaltende Unterstützung während meiner Promotionszeit.

XI. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

XII. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: