

Charakterisierung der CD4⁺ T-Zell-Antwort in der autoimmunen Hepatitis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Miriam Schakat

aus Paderborn

Hamburg, 2020

1. Gutachter Prof. Dr. Johannes Herkel
 I. Medizinische Klinik und Poliklinik
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Gutachter Prof. Dr. Stefan Hoth
 Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie
 Universität Hamburg

Tag der Disputation: 08.05.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die autoimmune Hepatitis	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese	3
1.1.3 Therapie	5
1.2 Das Immunsystem	6
1.2.1 Das angeborene Immunsystem	6
1.2.2 Das adaptive Immunsystem	7
1.2.3 Zytokine und Chemokine	11
1.3 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.2 Antikörper	27
2.1.3 Medien und Puffer	28
2.1.4 Humanes Probenmaterial.....	30
2.2 Methoden	35
2.2.1 Zellisolation.....	35
2.2.2 Durchflusszytometrie.....	37
2.2.3 <i>In vitro</i> anti-TNF Behandlung von PBMC.....	40
2.2.4 ELISA.....	41
2.2.5 ADAM-17-abhängige TNF Freisetzung durch PBMC.....	41
2.2.6 Genexpressionsanalyse	42
2.2.7 Proteinnachweis.....	45
2.2.8 Statistische Auswertung.....	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Anti-TNF Therapie in der AIH.....	50

3.1.1 Zytokinproduktion und klinischer Verlauf unter Infliximab-Therapie	50
3.1.2 <i>In vitro</i> Behandlung von PBMC mit Infliximab	52
3.2 Zytokinproduktion durch CD4 ⁺ T-Zellen in AIH Patienten	53
3.2.1 TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 produzierende CD4 ⁺ T-Zellen in PBMC.....	54
3.2.2 Produktion von TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 durch LIL.....	55
3.2.3 RNAscope® - TNF Expression in der Leber.....	57
3.2.4 Koproduktion von TNF und IFN γ	59
3.3 Produktion von Liganden der TNF Superfamilie durch CD4 ⁺ T-Zellen in AIH Patienten.....	61
3.4 Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften von Lymphozyten in AIH Patienten	62
3.4.1 Produktion von zytotoxischen Proteinen durch CD4 ⁺ T-Zellen	62
3.4.2 Proteinproduktion durch zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen.....	64
3.5 Produktion von koloniestimulierenden Faktoren in der AIH	65
3.5.1 M-CSF, GM-CSF und G-CSF produzierende Zellen in PBMC.....	66
3.5.2 Produktion von koloniestimulierenden Faktoren durch LIL.....	68
3.5.3 Differentielle Produktion von M-CSF und TNF in der AIH.....	69
3.6 Aktivität, Expression und Präsenz von ADAM-17 in der AIH.....	71
3.6.1 Produktion und Freisetzung von ADAM-17 Substraten in PBMC.....	71
3.6.2 ADAM-17-abhängige TNF Freisetzung durch PBMC.....	73
3.6.3 Expression von <i>ADAM17</i> durch PBMC und LIL.....	74
3.6.4 Präsenz und Aktivität von ADAM-17 in PBMC	74
4. Diskussion.....	77
4.1 Infliximab Therapie in der AIH.....	77
4.2 Zytokinproduktion durch CD4 ⁺ T-Zellen in der AIH	80
4.3 Zytotoxische T-Zellen in der AIH	85
4.4 Koloniestimulierende Faktoren in der AIH	87

4.5 ADAM-17 in der AIH.....	89
4.6 Ausblick	92
5. Zusammenfassung.....	94
5.1 Summary	96
Literaturverzeichnis.....	98
Anhang.....	A
Abkürzungsverzeichnis	A
Abbildungsverzeichnis.....	G
Tabellenverzeichnis	K
Publikationen und Kongressbeiträge.....	L
Danksagung.....	M
Eidesstattliche Erklärung.....	N

1. Einleitung

1.1 Die autoimmune Hepatitis

Bei der autoimmunen Hepatitis (AIH) handelt es sich um eine seltene chronisch-entzündliche Lebererkrankung [1]. Bei einem Teil der Patienten präsentiert sich die AIH als akute, zum Teil schwere Hepatitis, während andere keine Symptome und wieder andere Patienten schleichend auftretende unspezifische Beschwerden wie Erschöpfung, allgemeines Unwohlsein, Appetitlosigkeit, Übelkeit, rechtsseitige Oberbauchschmerzen oder Juckreiz zeigen. Charakteristisch für die Erkrankung sind selektiv erhöhte Immunglobulin G (IgG)-Werte, erhöhte Serum-Aminotransferasen (Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT)), sowie erhöhte Titer von Autoantikörpern [2, 3]. Eine histologische Untersuchung des Lebergewebes zeigt in der Regel ein lymphozytär-plasmazelluläres Infiltrat im Portalfeld mit Ausdehnung ins Leberläppchen, die sogenannte Interface-Hepatitis. Ferner gehören zu den histologischen Besonderheiten der AIH die Emperipolesen, bei der Lymphozyten von Hepatozyten aufgenommen werden, sowie eine sogenannte Rosettierung der Hepatozyten, wobei sich diese Zellen räumlich um einen Hohlraum gruppieren. Im Verlauf der Erkrankung kann es zu Narbenbildungen kommen, welche in fibrotischen oder zirrhotischen Veränderungen des Lebergewebes resultieren [4, 5]. Die Diagnose ist eine Ausschlussdiagnose, die Diagnosestellung erfolgt heute meist anhand eines vereinfachten Punktesystems der „Internationalen Autoimmunen Hepatitis Gruppe“ bei dem mehrere klinische Parameter wie ein typisches histologisches Erscheinungsbild, der Ausschluss einer virusbedingten Hepatitis, erhöhte IgG- und / oder γ -Globulin-Werte und der Nachweis von Autoantikörpern berücksichtigt werden [6, 7]. Wird eine AIH nicht oder nur unzureichend therapiert, kann dies zu einer Leberzirrhose bis hin zum Leberversagen und Tod führen [7]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt unbehandelt bei unter 50 % [8, 9].

1.1.1 Epidemiologie

Die AIH kommt in allen Teilen der Welt und in allen Ethnien vor, wobei nur wenige Daten für Afrika vorliegen [3, 10]. Eine systematische Metaanalyse von Publikationen im Zeitraum von 1990 bis Mitte 2019 ergab eine weltweite Prävalenz der AIH von 17,44 pro 100.000 Personen und eine Inzidenz von 1,37 pro 100.000 Personen pro Jahr. Hierbei war die Inzidenz in Asien, Europa und Amerika ähnlich (1,31; 1,37 bzw. 1,00 pro 100.000 Personen pro Jahr). Die Prävalenz bei Asiaten war mit 12,99 pro 100.000 Personen

hingegen niedriger als bei Europäern oder Amerikanern (19,44 bzw. 22,80 pro 100.000 Personen) [11]. In älteren Übersichtsarbeiten ging man von einer etwas niedrigeren Prävalenz in Europa aus (16 bis 18 pro 100.000 Personen) [3, 7]. Die Daten einer Kohortenstudie von 2014 in Dänemark zeigte annähernd eine Verdoppelung der Inzidenz in einem Zeitraum von 1994 bis 2012 und auch in Japan stieg die Prävalenz zwischen 2004 und 2016 ebenfalls deutlich [12, 13]. Interessanterweise ist die Prävalenz in Gegenden mit einer stabilen Population, welche sich durch eine geringe Zu- bzw. Abwanderung kennzeichnen, höher. So lag sie im Zeitraum von 1984 bis 2000 bei den indigenen Völkern Alaskas bei 42,9 pro 100.000 Personen und 2008 in Neuseeland bei 24,5 pro 100.000 Personen mit einer Inzidenz von 2,00 bei 100.000 Personen [14, 15]. Nicht nur für die Prävalenz, sondern auch für den klinischen Verlauf der Erkrankung wird ein ethnischer Zusammenhang diskutiert: Der Krankheitsverlauf in der schwarzen, hispanischen und asiatischen Bevölkerung der USA sowie der schwarzen Bevölkerung in Europa ist häufig schwerer als bei der weißen Bevölkerung [16-19]. Auch der Krankheitsverlauf zwischen Brasilianern und US-Amerikanern unterscheidet sich, so sind brasilianische AIH Typ I Patienten bei Diagnosestellung durchschnittlich jünger und weisen höhere Serum-Aminotransferasen und γ -Globulin-Werte auf als Patienten mit einer Typ I AIH in den USA [20].

Eine mögliche Erklärung für die Heterogenität der Erkrankungsprävalenz und des Krankheitsverlaufes sind unterschiedliche genetische Prädispositionen. So ist die AIH bei Europäern und Nordamerikanern mit bestimmten Haplotypen des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (MHC-II), dem Humanen Leukozytenantigen (HLA)-DRB1*03:01 und HLA-DRB1*04:01 assoziiert [21-23]. Hingegen gibt es bei japanischen und argentinischen Erwachsenen eine Assoziation mit dem Haplotyp HLA-DRB1*04:05, währenddessen argentinische Kinder mit AIH vorwiegend positiv für den Haplotyp HLA-DRB1*13:03 sind [24, 25]. Auch bei brasilianischen Patienten ist eine genetische Assoziation vor allem bei jüngeren Erkrankten mit dem Haplotyp HLA-DRB1*13 beschrieben [20, 26].

Neben der ethnischen Assoziation besteht ferner ein geschlechtsspezifischer Zusammenhang. So zeigten viele Studien zur AIH, dass weibliche Patienten überwiegen (2:3 bis 3:4 weibliche Patienten) [12, 13, 15, 16, 18, 25]. Dies spiegelt sich auch im älteren Punktesystem der „Internationalen Autoimmunen Hepatitis Gruppe“ zur Diagnose der AIH wieder, bei dem die Wahrscheinlichkeit einer Diagnose bei weiblichem Geschlecht

steigt [2]. Bei männlichen Patienten gibt es hingegen Hinweise auf einen schwereren Krankheitsverlauf, ein höheres Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom und eine höhere Mortalitätsrate [8, 12].

Die AIH kann in jedem Alter auftreten. Eine Diagnosestellung erfolgt meistens im mittleren Alter mit 40 bis 60 Jahren, allerdings gibt es zwei weitere Altersgipfel in der Kindheit bzw. Jugend und im höheren Alter über 65 Jahren [12, 27-30].

Etwa 30 – 40 % der Patienten leiden neben der AIH außerdem unter einer oder mehreren weiteren autoimmunen Erkrankungen wie z. B. Thyreoiditis (meist vom Typ der Hashimoto-Thyreoiditis), Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose (MS) oder systemischer Lupus erythematoses (SLE) [3, 31]. Hinzu kommen so genannte Überlappungssyndrome, bei denen neben der AIH zusätzlich eine primär biliäre Cholangitis (PBC) oder primär sklerosierende Cholangitis (PSC) auftritt. Bei diesen beiden Erkrankungen handelt es sich ebenfalls um seltene autoimmune Lebererkrankungen, die sich histologisch zusätzlich durch entzündliche Veränderungen der kleinsten bzw. mittleren und großen Gallengänge in der Leber auszeichnen [3, 7, 31].

1.1.2 Pathogenese

Die genaue Pathogenese der AIH ist bis heute ungeklärt [32]. Einiges deutet aber darauf hin, dass hierbei CD4⁺ T-Zellen in besonderer Weise beteiligt sind. So machen sie im intrahepatischen Entzündungszellinfiltrat die größte Subpopulation aus [33-35], dies ist in Abbildung 1 gezeigt, welche einen repräsentativen Ausschnitt eines Portalfeldes mit dem Entzündungszellinfiltrat, sowie dem immunhistochemisch angefärbten Anteil der CD4⁺ T-Zellen darin in 10x (A und B) und 20x (C und D) Vergrößerung dargestellt. Neben den CD4⁺ T-Zellen sind vor allem Plasmazellen, aber auch Makrophagen, Eosinophile und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) Teil des Zellinfiltrats [4, 36].

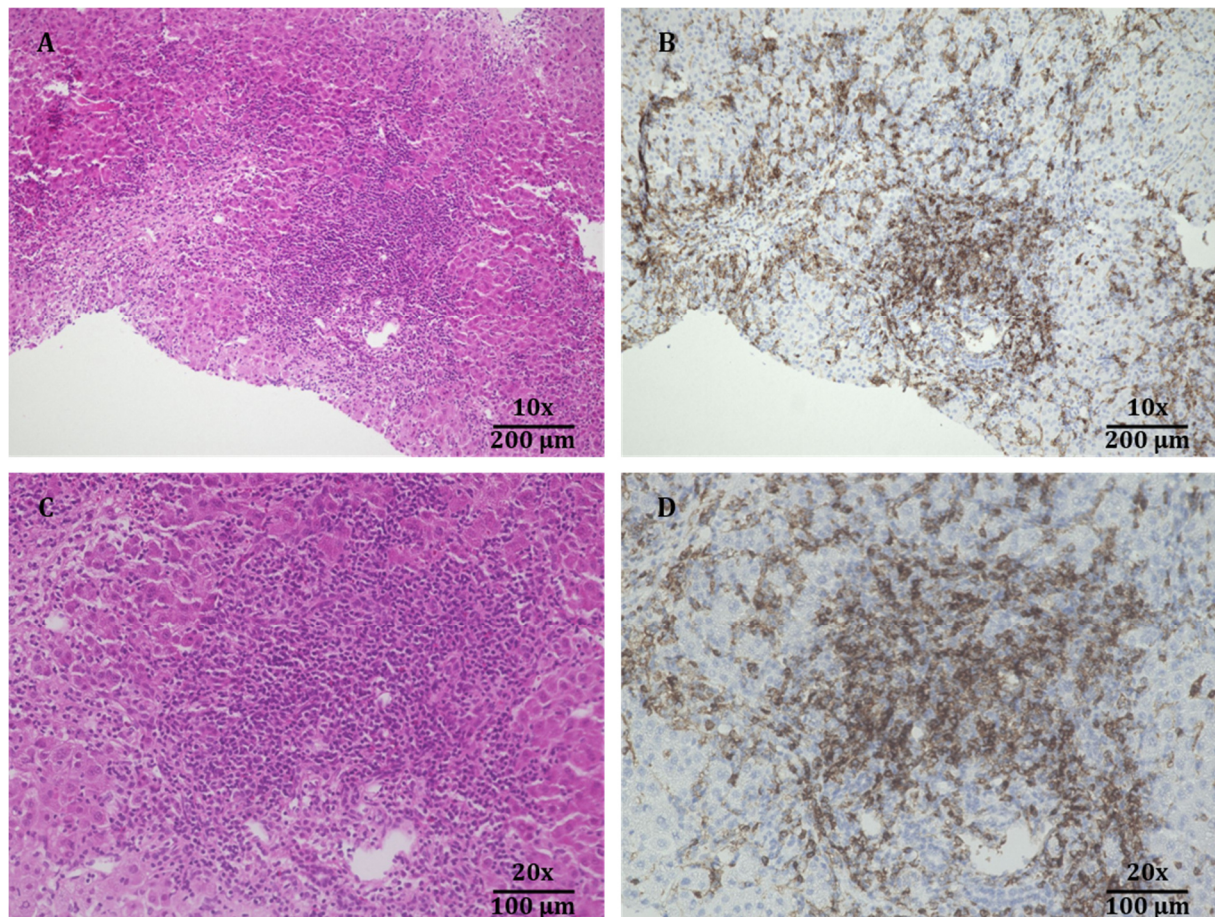


Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung und einer immunhistochemischen CD4-Färbung an einer Leberbiopsie einer exemplarischen Patientin mit einer unbehandelten, hochfloriden AIH. Dargestellt ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Entzündungszellinfiltrats an einem Portalfeld in A) 10x Vergrößerung (Maßstab: 200 µm) und C) 20x Vergrößerung (Maßstab: 100 µm), sowie die CD4⁺ T-Zellen (braunes Signal) in diesem Zellinfiltrat in B) 10x Vergrößerung (Maßstab: 200 µm) und D) 20x Vergrößerung (Maßstab: 100 µm) (gefärbte Gewebeschnitte bereitgestellt vom Institut für Pathologie)

Ein weiterer Hinweis für die zentrale Rolle der CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese der AIH ist die enge Assoziation mit bestimmten MHC-II Komplexen, über die Antigene von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) den CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden (vgl. Abs. 1.1.1 und 1.2) [20-26, 37, 38]. Des Weiteren konnten zwei CD4-restringierte Autoantigen-Epitope in der AIH, zugehörig zu den Autoantigenen lösliches Leberantigen / Leber-Pankreas-Antigen (SLA/LP) bzw. Leber-Nieren-Mikrosomen (LKM), identifiziert werden [39-41]. In Analogie zu diesen T-Zell-Epitopen sind auch B-Zell-Epitope von den entsprechenden Autoantigenen bekannt, die einen zentralen Teil in der Diagnostik der AIH ausmachen [6, 42]. Außerdem wird die Erkrankung anhand des jeweilig vorliegenden Autoantikörper-Profiles in zwei, historisch auch in drei Subtypen aufgeteilt. Die AIH vom Typ I kennzeichnet sich durch das Vorliegen von antinukleären Antikörpern (ANA) und / oder Autoantikörpern gegen glatte Muskulatur (SMA).

Charakteristisch für die AIH Typ II sind hingegen Antikörper gegen LKM oder Leber-Zytosol-Antigen Typ 1 (LC-1). Bei der historisch differenten AIH Typ III liegen Antikörper gegen SLA/LP vor [42, 43]. Diese wird allerdings nunmehr aufgrund des ähnlichen klinischen Verlaufes in Typ I subsummiert. Die Typ II AIH macht nur etwa 5 - 10 % aller Krankheitsfälle aus, tritt häufiger im Kindesalter auf und ist mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert [44-46]. Anti-SLA/LP Antikörper werden bei bis zu 10 % der AIH Patienten als einzige Autoantikörper und bei 5 – 10 % der AIH Typ I Patienten zusammen mit ANA und SMA nachgewiesen. Weitere 10 – 15 % der Patienten sind „seronegativ“, weisen also keine nachweisbaren Autoantikörper gegen die bekannten Antigene auf [46].

Neben CD4⁺ T-Zellen selbst werden auch einige der von diesem Zelltyp produzierten Zytokine mit der Pathogenese der AIH in Verbindung gebracht. So konnte eine vermehrte Produktion für viele sehr unterschiedliche Zytokine gezeigt werden: LKM-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut und der Leber von AIH Typ II Patienten sezernierten nach einer spezifischen Stimulation im Besonderen Interferon γ (IFN γ), aber auch Interleukin 4 (IL-4), IL-10 und Tumornekrosefaktor (TNF) [47, 48]. Auch CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut von AIH Patienten, welche mit SLA/LP stimuliert wurden, sezernierten IFN γ [49]. Darüber hinaus wurden im Serum von Patienten erhöhte Spiegel an IL-6, IL-8, IL-10, IL-17F, IL-21, IL-23 und TNF gemessen [50-52]. Bei an AIH erkrankten Kindern konnte gezeigt werden, dass der Serum-IL-2-Spiegel mit der Krankheitsaktivität korreliert [53]. In einer älteren Studie mit asiatischen Patienten zeigten sich sowohl im peripheren Blut als auch intrahepatisch erhöhte Frequenzen von Typ 17 T-Helferzellen (Th17 Zellen), einer Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen, welche vor allem IL-17 produzieren. [54]. Eine Kollegin zeigte in einer vorangegangenen Arbeit außerdem für TNF, IFN γ und IL-2 eine erhöhte Genexpression in leberinfiltrierenden Lymphozyten (LIL) von AIH Patienten im Vergleich zu Kontrollen [55].

1.1.3 Therapie

Ziel der Therapie bei der AIH ist eine vollständige und dauerhafte biochemische Remission mit normalisierten Serum-Aminotransferasen und IgG-Werten, sowie eine histologische Remission, die durch das Fehlen einer intrahepatischen Inflammation, d. h. den kompletten Rückgang der oben genannten Interface-Hepatitis, gekennzeichnet ist [7, 56]. Eine immunsuppressive Therapie ist in der Regel dauerhaft notwendig; da aufgrund der bisher ungeklärten genauen Pathogenese eine gezieltere Behandlung derzeit nicht

möglich ist, wird eine systemische Immunsuppression gewählt [32]. Üblicherweise wird eine Therapie mit einem Corticosteroid begonnen, und nach Wirkeintritt durch Azathioprin, einem immunsuppressiv wirkenden Antimetaboliten, ergänzt oder ersetzt [7, 56, 57]. Meist ist eine dauerhafte d. h. lebenslange Therapie notwendig [7, 58, 59]. Bei 10 – 15 % der Patienten führt die Standardtherapie zu keiner oder nur einer unvollständigen Remission und bei weiteren 10 -15 % treten therapielimitierende Nebenwirkungen auf. In diesen Fällen kann eine Zweitlinientherapie mit anderen Immunsuppressiva wie z. B. Mycophenolat-Mofetil oder Calcineurin-Inhibitoren außerhalb des eigentlichen Zulassungsbereichs indiziert sein [7, 60-63]. Außerdem ist für einige Fälle mit schwer zu behandelnder AIH eine erfolgreiche Therapie außerhalb des behördlich zugelassenen Indikationsbereichs mit dem monoklonalen anti-TNF Antikörper Infliximab beschrieben [64-66].

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem umfasst eine Vielzahl von Effektorzellen und Molekülen, welche den Organismus vor den Schäden durch Pathogene wie infektiöse Bakterien und Viren sowie schädliche Substanzen schützen soll. Klassischerweise wird es in das angeborene und das adaptive Immunsystem aufgeteilt [67].

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet den ersten Abwehrmechanismus des Organismus gegen Infektionen. Es besteht aus verschiedenen Zellen wie den Granulozyten, zu denen Neutrophile, Basophile und Eosinophile gehören und den Mastzellen, dendritischen Zellen (DCs), NK-Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen, sowie löslichen Faktoren wie dem Komplementsystem [68]. Auf ihren Zelloberflächen oder in intrazellulären Kompartimenten besitzen diese Zellen spezielle Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), welche außerdem sezerniert werden können. Mit diesen erkennen sie körperfremde Moleküle und Strukturen, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs). Binden solche PAMPs an PRRs, führt dies zu einer Aktivierung der Zellen. Als Folge wird unter anderem das Komplementsystem aktiviert oder die Apoptose von infizierten Zellen induziert. Des Weiteren kommt es zur Hochregulation von MHC Komplexen und kostimulierenden Faktoren auf den Zelloberflächen der Immunzellen und zur verstärkten Sezernierung von antimikrobiellen Peptiden, sowie proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Zytokine und Chemokine aktivieren wiederum weitere Immunzellen und

leiten sie zum Ort der Entzündung. Von Neutrophilen und anderen APCs wie DCs und Makrophagen werden dort Pathogene, Zellfragmente, beschädigte und tote Zellen phagozytiert und abgebaut [69-72]. Im Anschluss präsentieren APCs abgebaute Proteinfragmente als Antigen über MHC Komplexe den T-Zellen des adaptiven Immunsystems [37].

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem setzt erst in einer späteren Phase des Entzündungsprozesses bei der Bekämpfung von Pathogenen ein und bildet außerdem das immunologische Gedächtnis [71]. Es besteht vor allem aus CD3⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen. Anhand der Präsenz von bestimmten Oberflächenmolekülen werden die T-Zellen in CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen eingeteilt [67, 73]. Ihnen werden von APCs Antigene über MHC Moleküle präsentiert, wobei CD4⁺ T-Zellen mit MHC-II und CD8⁺ T-Zellen mit MHC-I interagieren, wofür jeweils direkter Zellkontakt nötig ist [37, 38]. Die präsentierten Antigene werden von naiven T-Zellen über antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren erkannt. Für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen werden zusätzlich zu diesem ersten Aktivierungssignal noch weitere Signale über kostimulierende Faktoren und ausgeschüttete Zytokine benötigt. Dies führt zur Proliferation, Expansion und Differenzierung der T-Zellen [74].

Anders als T-Zellen erkennen naive B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor lösliche und membrangebundene Antigene. Neben der spezifischen Antigenbindung benötigen B-Zellen für eine vollständige Aktivierung ein Kostimulationssignal von follikulären T-Helferzellen (Tfh). Hierzu nehmen die B-Zellen das Antigen auf, prozessieren und präsentieren es über MHC-II den Tfh Zellen, welche diesen Antigen-MHC-II-Komplex über ihren T-Zell-Rezeptor erkennen. In der Folge erhöht sich die Dichte von kostimulierenden Oberflächenmolekülen auf der Zellmembran der Tfh Zellen, welche wiederum die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen induzieren. Dieser Prozess wird durch die Sezernierung von speziellen Zytokinen unterstützt. Neben dieser T-Zell gestützten Aktivierung können B-Zellen außerdem über ihre PRRs und Kostimulationssignale von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophile oder DCs stimuliert werden [74, 75].

1.2.2.1 T-Helferzellen

Bei den CD4⁺ T-Helferzellen handelt es sich um eine hochspezialisierte Zellpopulation, die bei einer Aktivierung bestimmte Zytokine sezernieren, wodurch sie unter anderem die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen unterstützen, die zytotoxische T-Zellantwort durch CD8⁺ T-Zellen steuern und die Aktivität der Makrophagen regulieren [76, 77]. Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgt durch die Bindung des passenden Antigens an den T-Zell-Rezeptor, wodurch es zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren kommt und sich die T-Zellen in verschiedene Th-Zellsubpopulationen differenzieren. Diese lassen sich anhand ihres sezernierten Zytokinprofils und unterschiedliche Oberflächenmoleküle unterscheiden. Welcher Phänotyp angenommen wird hängt hierbei nicht nur vom umgebenden Zytokinmilieu, sondern auch von der Art der APCs und der Kostimulation ab [76, 78]. Anfangs wurde nur zwischen Th1 und Th2 Zellen unterschieden. Heute werden die Th-Zellen in Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Th25, regulatorische T-Zellen (Treg) und Tfh unterteilt [79-81].

Th1 Zellen spielen vor allem bei der Bekämpfung von intrazellulären Viren und Bakterien, sowie der Eliminierung von tumorös veränderten Zellen eine Rolle, indem sie durch die Sezernierung ihres charakteristischen Zytokins IFN γ Makrophagen aktivieren [76, 81]. Außerdem können sie Lymphotoxin, IL-2 und TNF produzieren [77]. Die Differenzierung wird über die Signalwege IL-12/STAT4 (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 4), IFN γ /STAT1 bzw. IL-2/STAT5 angeregt, was den T-Box Transkriptionsfaktor 21 (T-bet) aktiviert [82].

Charakteristisch für Th2 Zellen ist die Sezernierung von IL-4, IL-5 und IL-13. Einige Th2 Zellen können aber vermutlich auch TNF, IL-9 und IL-2 produzieren [77, 83]. Sie induzieren den Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zellen hin zur IgE-Antikörper Produktion, aktivieren Eosinophile, Mastzellen und Makrophagen und sind somit insbesondere für die Bekämpfung von extrazellulären Parasiten wichtig. Die Differenzierung erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-Bindeprotein-3 und wird durch die IL-4/STAT6 und IL-2/STAT5 Signalwege induziert [83].

Eine Differenzierung zu Th17 Zellen erfolgt durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t (RAR-related orphan receptor γ -t), der über die Signalwege IL-6/STAT3 bzw. IL-21/STAT3 und den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) aktiviert

wird [84]. Th17 Zellen sind essentiell für die Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Pilzen, indem sie über die für sie typischen Zytokine IL-17A und IL-17F Neutrophile aktivieren. Zusätzlich können sie auch IL-22 sezernieren [76].

Th9, Th22 und Th25 Zellen wurden jeweils nach ihrem charakteristischen Zytokin benannt und werden mit der Pathogenabwehr der Schleimhaut bzw. Haut assoziiert [80].

Treg regulieren Entzündungsreaktionen, indem sie anti-inflammatorische Zytokine wie z. B. IL-10 oder TGF- β und inhibierende, membrangebundene Oberflächenmoleküle produzieren, wodurch sie die Aktivierung bzw. Proliferation von Immunzellen inhibieren und deren Funktion hemmen. Hierdurch wird eine überschießende Immunreaktion verhindert bzw. eine Entzündungsreaktion beendet und eine immunologische Selbsttoleranz aufrechterhalten. Zu Treg differenzieren naïve T-Zellen durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3), welcher mittels des Signalwegs IL2/STAT5 zusammen mit TGF- β induziert wird. TGF- β wird unter anderem von Treg selbst sezerniert [76, 82, 85].

Tfh Zellen unterstützen B-Zellen bei der Reifung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (vgl. Abs. 1.2.2) [74, 75]. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors B-Zell Lymphom 6 Protein (Bcl6) durch die Signalwege IL-6/STAT3 bzw. IL-21/STAT3 erfolgt die Differenzierung zu Tfh Zellen. Charakteristischerweise sezernieren sie unter anderem IL-21 [86].

1.2.2.2 Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen und Tumoren, indem sie den Zelltod von infizierten oder entarteten Zellen induzieren [87, 88]. Hierbei kann die Apoptose der Zielzelle entweder durch die Interaktion von Fas Ligand (FasL, CD178) auf der Zelloberfläche von aktivierten zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen mit dem Fas-Rezeptor (CD95) auf den Zielzellen oder durch die Ausschüttung von zytotoxischen Proteinen ausgelöst werden [89, 90]. Bei diesen zytotoxischen Proteinen handelt es sich hauptsächlich um Perforin, Serinproteasen, Calreticulin, und antimikrobielle Proteine, welche in designierten zytoplasmatischen Granula der CD8⁺ T-Zellen gespeichert sind und per Exozytose freigesetzt werden [88]. Insbesondere Perforin ist für die Abtötung von Zellen über diesen Weg von Bedeutung, da es mit der Plasmamembran der Zielzelle interagiert und dort Poren bildet, durch die andere zytotoxische Proteine in die Zelle gelangen können [89-91].

Perforin wird als inaktives Vorläuferprotein von der Zelle synthetisiert, im sauren Milieu der Granula durch Abspaltung einer C-terminalen Sequenz aktiviert und dort gespeichert. Nach der Sezernierung bindet das aktivierte Protein Kalzium (Ca^{2+})-abhängig über eine C2-Domäne an die hydrophile Kopfgruppe der Phospholipide der Plasmamembran der Zielzelle und bildet dort durch Polymerisation Poren in der Zellmembran. Dies führt entweder durch den Verlust der Zellintegrität zur osmotischen Lyse der Zielzelle oder es kommt zur Induktion einer Apoptose indem andere zytotoxische Moleküle, insbesondere Granzym B, durch die Poren in die Zellen eindringen [91].

Bei den Serinproteasen in den Granula handelt es sich vor allem um Granzyme. Auch diese werden als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert und erst in den Granula durch Abspaltung einer N-terminalen Sequenz aktiviert und gespeichert. Beim Menschen kommen fünf verschiedene Subtypen vor (Granzym A, B, H, K und M), wobei aber Granzym A und B überwiegen. Gelangt Granzym B z. B. durch eine Perforin-Pore in die Zielzelle, induziert es dort durch die Aktivierung von Caspasen die Apoptose der Zelle. Außerdem spaltet es in der Kernmembran Lamin B, was durch den Verlust der Integrität des Nukleus ebenfalls zur Induktion der Apoptose führt [92].

Granulysin ist ein antimikrobielles Peptid, welches zu der Saposin-ähnlichen Proteinfamilie gehört. Es wird als 15 kDa Protein synthetisiert, welches entweder direkt von den Zellen konstitutiv sezerniert oder durch Abspaltung einer C- und N-terminalen Sequenz als 9 kDa Form in den Granula gespeichert wird. Nach der Exozytose kommt es zur Wechselwirkung des positiv geladenen 9 kDa Protein mit negativ geladenen Lipiden der Zellmembran der Zielzelle, was zum Verlust der Zellintegrität führt. In Folge kommt es zum verstärkten Ca^{2+} -Influx, wodurch Mitochondrien beschädigt, Caspasen aktiviert und die Apoptose induziert werden [93, 94].

An der Differenzierung von CD8^+ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen ist unter anderem der zur Familie der T-Box Faktoren gehörende Transkriptionsfaktor Eomesodermin (EOMES) beteiligt. Er kontrolliert hierbei die Genexpression von *PRF1* (Perforin) und *GZMB* (Granzym B), aber auch von *IFNG* ($\text{IFN}\gamma$). Des Weiteren weist EOMES eine strukturelle Homologie zu T-bet, einem anderen T-Box Transkriptionsfaktor, welcher entscheidend für die Differenzierung von naiven Th-Zellen zu $\text{IFN}\gamma$ produzierenden Th1 Zellen ist, auf (vgl. Abs. 1.2.2.1). In T-bet defizienten CD4^+ Zellen konnte daher durch EOMES die *IFNG* Expression induziert werden [95]. Außerdem ist die

T-Zell-Rezeptor-vermittelte Expression von *IFNG* in bestimmten pathogenen Th1 Zellen unter der Kontrolle von EOMES [96].

Neben den klassischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen können auch CD4⁺ T-Zellen einen zytotoxischen Phänotyp annehmen und zytotoxische Proteine sezernieren. Interessanterweise scheinen diese Zellen die beiden kostimulierenden Faktoren CD27 und CD28, anders als naive und klassische Th-Zellen nicht mehr zu produzieren [97]. Wie bei den CD8⁺ T-Zellen ist auch bei der Annahme des zytotoxischen Phänotyps durch CD4⁺ T-Zellen der Transkriptionsfaktor EOMES involviert [98, 99].

1.2.3 Zytokine und Chemokine

1.2.3.1 Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um sezernierte oder membrangebundene kleine Signalproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 8 bis 30 kDa welche die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Zellen insbesondere des Immunsystems steuern. Außerdem regulieren sie zytotoxische Prozesse und die Synthese bzw. Sezernierung von weiteren Zytokinen oder anderen Proteinen [68, 100]. Sie können von verschiedensten Zellen produziert werden, so auch von Zellen, die nicht zum Immunsystem gezählt werden. Die Hauptproduzenten von Zytokinen im menschlichen Körper sind aber Th-Zellen und Makrophagen [101]. Durch Bindung der Zytokine an ihren jeweiligen Rezeptor können sie sowohl autokrin auf die sezernierende Zelle, sowie parakrin auf benachbarte Zellen oder endokrin auf weiter entfernte Zellen wirken. Hierbei können verschiedene Zytokine ähnliche Wirkungen erzielen, aber auch dasselbe Zytokin unterschiedliche Effekte pleiotrop hervorrufen. Zytokine werden entweder aufgrund von Sequenzhomologien, ihrer Wirkungsweise, anhand ihrer exprimierenden Zellen oder ihres Rezeptors zusammengefasst [102].

1.2.3.1.1 TNF Superfamilie

TNF ist das namensgebende Zytokin der TNF Superfamilie. Diese Gruppe besteht aus 19 bekannten Liganden, darunter z. B. Lymphotoxin α , CD40L, FasL, Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), A proliferation-inducing Ligand (APRIL) und B-Zell Aktivierungsfaktor (BAFF), welche alle zu den Typ II Transmembranproteinen gehören und eine Sequenzhomologie aufweisen. So besitzen alle eine konservierte C-terminale Sequenz, welche die sogenannte TNF Homologie Domäne beinhaltet. Durch diese Domäne können sich Homotrimere bilden, die für diese Zytokine typisch sind und eine Bindung

der Liganden an ihre jeweiligen Rezeptoren ermöglicht. Die 29 Rezeptoren werden zu der TNF Rezeptor Superfamilie zusammengefasst und kommen genau wie die Liganden überwiegend auf der Zelloberfläche von Immunzellen vor. Durch die Interaktion der Liganden mit ihren jeweiligen Rezeptoren werden unter anderem die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung und die Aktivierung von diesen Zellen reguliert [103-105].

1.2.3.1.1.1 TNF

TNF gehört zu den Zytokinen der TNF Superfamilie (vgl. Abs. 1.2.3.1.1) [103]. Es wird als 26 kDa membrangebundenes Vorläuferprotein synthetisiert, welches zu den Typ II Transmembranproteinen zählt. Es besteht aus einer N-terminalen intrazellulären Domäne, einer konservierten transmembranen Domäne und einer C-terminalen extrazellulären Domäne. Membrangebundene TNF (mTNF) Monomere lagern sich zu Homotrimeren zusammen und können durch die Metalloproteinase „A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 17“ (ADAM-17) als lösliches TNF, bestehend aus drei je 17 kDa Monomeren, freigesetzt werden (vgl. Abbildung 2 A und Abs. 1.2.3.1.1.2) [106-108]. TNF wird hauptsächlich von Makrophagen und anderen Immunzellen, aber auch von Zellen wie z. B. Endothelzellen oder Fibroblasten produziert [102, 107]. Bei TNF handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, welches neben der Induktion des Zelltods auch die Proliferation und Differenzierung von Zellen reguliert und hierbei nicht nur proinflammatorisch, sondern auch antiinflammatorisch wirken kann [109]. Für die Signalvermittlung von TNF sind Interaktionen mit zwei unterschiedlichen Rezeptoren möglich: (1) dem TNF-Rezeptor-I (TNF-RI) und (2) dem TNF-RII. Der TNF-RI kommt ubiquitär als Transmembranrezeptor vor, während sich der TNF-RII nur auf der Zelloberfläche weniger Zellarten wie z. B. Lymphozyten, Endothelzellen oder mesenchymalen Stammzellen befindet [110, 111]. Beide Rezeptoren können mit mTNF interagieren, wohingegen lösliches TNF nur den TNF-RI aktivieren kann (vgl. Abbildung 2 A) [112]. Die intrazelluläre Domäne des TNF-RI enthält anders als die von TNF-RII eine sogenannte Todesdomäne. Kommt es zur Aktivierung des TNF-RI wird über verschiedene Signalkaskaden die Nekroptose oder Apoptose der Zelle eingeleitet oder die Expression von proliferativen oder inflammatorischen Genen induziert. Hingegen generiert die Aktivierung des TNF-RII Signale zum Überleben der Zelle und zur Proliferation, sowie der Expression von inflammatorischen Genen (vgl. Abbildung 2 B) [109, 111].

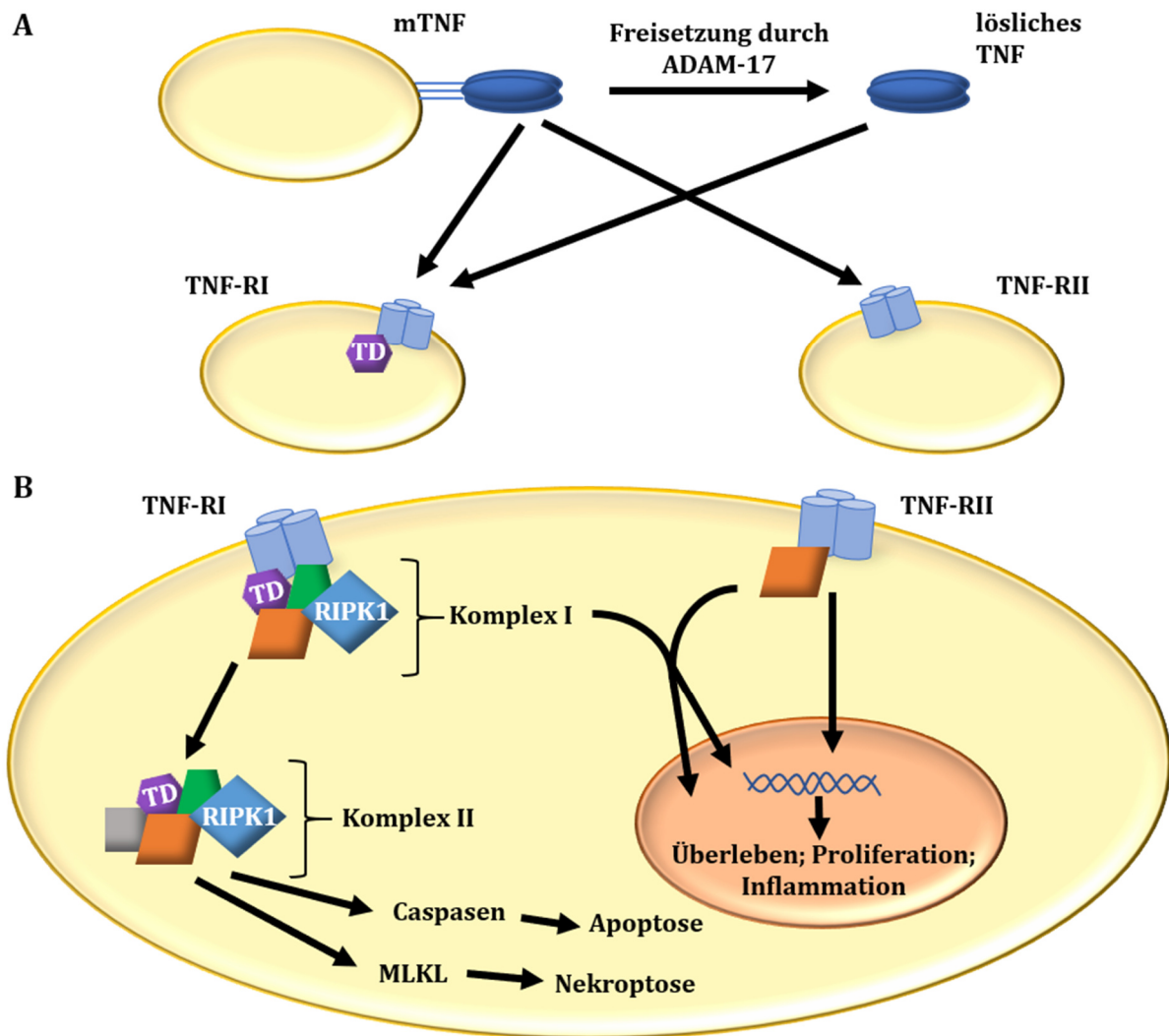


Abbildung 2: Bindungsaffinität und Signalvermittlung der TNF-Rezeptoren. Dargestellt ist in A) die Interaktion von membranboundem TNF (mTNF) mit den TNF-Rezeptoren (TNF-R) I und II, die Freisetzung von TNF durch das Enzym ADAM-17 und die Interaktion von löslichem TNF mit dem TNF-RI. B) veranschaulicht die Signalwege der Rezeptoren. Der TNF-RI enthält eine intrazelluläre Todesdomäne (TD) und interagiert mit dem Signalkomplex I (bestehend aus mehreren Signalmolekülen, wie z. B. die Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 1 (RIPK1)). Dieser Komplex induziert über verschiedene Signalkaskaden die Expression von proliferativen, inflammatorischen und pro-Überlebens-induzierenden Genen. Alternativ entsteht durch die Bindung weiterer Signalproteine der Signalkomplex II, welcher entweder über Caspasen die Apoptose oder über MLKL (Mixed lineage kinase domain-like protein) die Nekroptose der Zelle induziert. Der TNF-II interagiert aufgrund der fehlenden TD nur mit einzelnen Signalmolekülen des Komplexes I und induziert die Expression von proliferativen, inflammatorischen und pro-Überlebens-induzierenden Genen. (Abbildung adaptiert nach Bryde und Grunwald *et al.* 2005; Al-Lamki und Mayadas 2015 und Faustman und Davis 2010 [108, 110, 111])

1.2.3.1.2 ADAM-17: TNF konvertierendes Enzym

ADAM-17 ist eine Zink-abhängige, membranboundene Metalloproteinase, die zu der ADAM Proteinfamilie gehört. Da es ursprünglich als das Enzym, welches TNF von der Zelloberfläche freisetzt, beschrieben wurde, wird es auch als TNF konvertierendes Enzym (TACE) bezeichnet (vgl. Abs. 1.2.3.1.1) [113-115]. ADAM-17 ist allerdings auch an der

Freisetzung vieler anderer Transmembranproteine wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle beteiligt. So gehören z. B. M-CSF, TGF α , IL-6R α , CSF1R, TNF-RI und II und CD62L zu dessen Substraten [116, 117]. ADAM-17 kann von nahezu allen Zellen produziert werden, wobei es zunächst als Vorläuferprotein,

bestehend aus einer zytoplasmatischen Domäne, transmembranen Domäne, „Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence“-Domäne, Membran-proximalen Domäne, Disintegrin-Domäne, katalytischen Domäne und



Pro-Domäne

katalytische Domäne

Disintegrin-Domäne

Membran-proximale Domäne

Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence-Domäne

Zytoplasmatische und transmembrane Domäne

Pro-Domäne synthetisiert wird (vgl. Abbildung 3) [118, 119]. Eine Regulierung der Enzymaktivität erfolgt hierbei nicht nur über die Transkription, sondern auch über

Abbildung 3: Aufbau des Vorläuferproteins von ADAM-17. Es setzt sich aus einer zytoplasmatischen und transmembranen Domäne, „Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence“-Domäne, Membran-proximalen Domäne, Disintegrin-Domäne, katalytischen Domäne und Pro-Domäne zusammen (Abbildung nach Vorlage von Zunke und Rose-John 2017 [118])

posttranslationale Modifikationen des Proteins. Die Pro-Domäne hat eine inhibierende Wirkung auf das Enzym, sodass ADAM-17 erst nach Abspaltung dieser Domäne in seiner aktiven Form vorliegt [120]. Diese Abspaltung erfolgt erst im späten trans-Golgi-Komplex, wo ein kleiner Teil des Enzyms in seiner aktiven Form gespeichert wird. Außerdem kommt ein geringer Teil an aktivem ADAM-17 auf der Zelloberfläche vor. Die größte Menge an ADAM-17 wird als inaktives Vorläuferprotein nach der Transkription im endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichert. In Folge einer Stimulation der Zelle wird die aktive Form schnell zur Zellmembran transportiert, wo es seine Substrate freisetzt. Im Anschluss wird das Enzym internalisiert und degradiert (vgl. Abbildung 4) [113, 121-123]. Neben dem Vorläufermolekül mit einer Molekülmasse von 110 bis 120 kDa und dem reifen Protein mit einer Molekülmasse von 80 bis 100 kDa kann das Enzym außerdem in glykosylierter Form mit einer Molekülmasse von 130 kDa und ohne die zytoplasmatische Domäne (60 kDa) vorliegen [123, 124]. Ob es sich bei dem 60 kDa Protein um ein Abbauprodukt oder um eine aktive lösliche Form handelt, ist bisher noch nicht abschließend geklärt [123, 125].

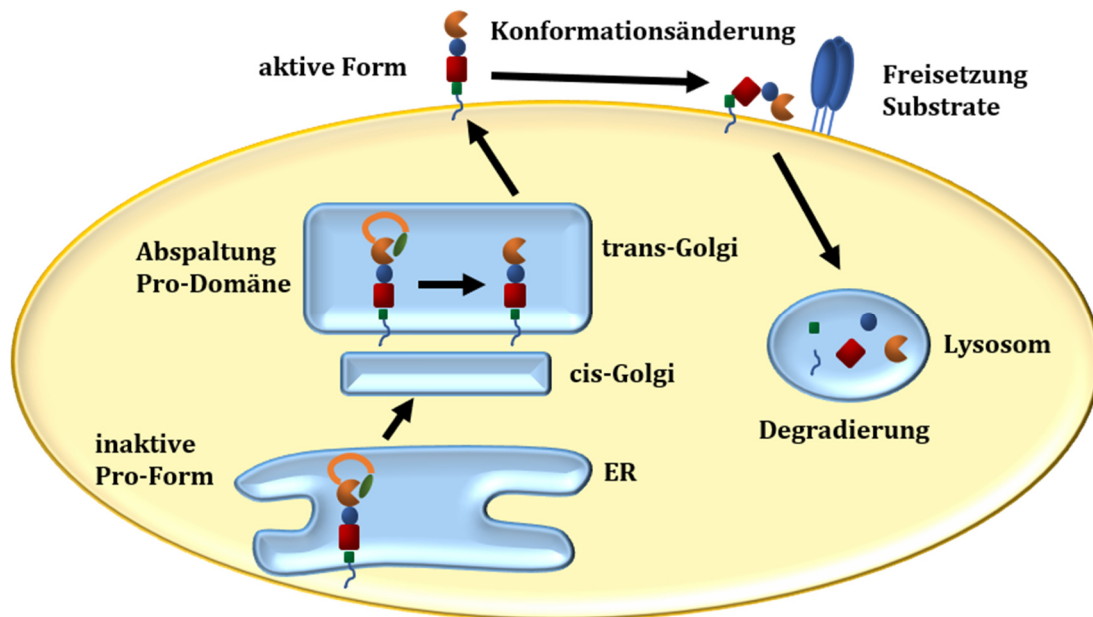


Abbildung 4: Aktivierung des Enzyms ADAM-17. Nach der Transkription wird die inaktive Pro-Form des Enzyms im endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichert. Erst im späten trans-Golgi-Komplex kommt es durch Abspaltung der Pro-Domäne zur Aktivierung von ADAM-17. Nach einem Transport zur Zellmembran und einer Konformationsänderung setzt es dort seine Substrate und wird im Anschluss internalisiert und in Lysosomen degradiert. (Abbildung adaptiert nach Lambrecht, Vanderkerken und Hammad 2018 und Lorenzen und Lokau *et al.* 2016 [112, 120])

1.2.3.1.2 IFN γ

Bei IFN γ handelt es sich um das bisher einzig bekannte Typ II Interferon, welches sich sowohl strukturell, als auch durch die Bindung an einen anderen Rezeptor von den Typ I Interferonen unterscheidet. Es wird hauptsächlich von T-Zellen und NK-Zellen sezerniert, allerdings können auch B-Zellen und APCs IFN γ produzieren [126]. Biologisch aktives IFN γ entsteht durch die Zusammenlagerung von zwei Monomeren zu einem Homodimer [127-129]. Durch die Interaktion mit dem IFN γ -Rezeptor, welcher ubiquitär exprimiert wird, erfolgt die Regulierung der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen, die Aktivierung von Makrophagen sowie eine Induktion des Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zellen. Außerdem wird die Antigenpräsentation über MHC-I und -II Moleküle in den Zielzellen gesteigert [126, 128].

1.2.3.1.3 IL-2

Historisch wurde IL-2 als T-Zell Wachstumsfaktor bezeichnet, da es bei der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Bei der T-Zell-Rezeptor vermittelten Aktivierung von naiven T-Zellen kommt es zur verstärkten Expression von IL-2 und dessen Rezeptor. In vorwiegend autokriner Weise steuert IL-2 die Expansion und Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen, die Differenzierung von CD4⁺

T-Zellen zu Th1 bzw. Th2 Zellen und reguliert die Treg Homöostase. Gleichzeitig inhibiert IL-2 die Differenzierung zu Th17 Zellen [130, 131]. Hauptproduzenten von IL-2 sind Th-Zellen, aber auch CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und DCs können das Zytokin sezernieren [131].

1.2.3.1.4 IL-17

IL-17A ist das charakteristische Zytokin der Th17 Zellen. Zusammen mit IL-17B bis F bildet es die IL-17 Familie, deren Mitglieder eine Sequenzhomologie aufweisen. Mit Ausnahme von IL-17A und IL17F, die zusätzlich zu einem Homodimer auch ein IL-17A-IL-17F Heterodimer bilden können, liegen diese Zytokine jeweils als Homodimer vor. Die Funktion der unterschiedlichen IL-17 Subtypen ist dadurch divers, dass sie jeweils nur an ihren spezifischen IL-17 Rezeptor binden. Eine Ausnahme bilden hierbei erneut die IL-17A- und IL-17F-Homodimere sowie das IL-17A-IL-17F Heterodimer, welche mit demselben Rezeptor interagieren. So induzieren die Letztgenannten die Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen, indem sie Neutrophile rekrutieren und aktivieren. IL-17E hingegen ist an der Abwehr von Parasiten beteiligt, indem es Eosinophile und Th2 Zellen aktiviert. IL-17C ist assoziiert mit der Immunantwort gegen Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt. Die Funktion von IL-17B und IL-17D hingegen sind bisher noch weitgehend unbekannt [132, 133].

1.2.3.1.5 Koloniestimulierende Faktoren

Bei den koloniestimulierenden Faktoren handelt es sich um eine Gruppe von Zytokinen, welche die Proliferation, Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von hämatopoetischen Zellen, insbesondere solcher der myeloischen Linie, regulieren. Zu ihnen zählen unter anderem der Monozyten-Koloniestimulierende Faktor (M-CSF, CSF1), der Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierende Faktor (GM-CSF, CSF2) und der Granulozyten-Koloniestimulierende Faktor (G-CSF, CSF3). Alle drei Glykoproteine gehören strukturell zu den 4- α -Helix-Bündel Zytokinen [134, 135].

M-CSF fördert die Proliferation von myeloischen Vorläuferzellen zu Monozyten bzw. von Monozyten zu Makrophagen. Es kann von einer Vielzahl von Zellen produziert werden, darunter Endothelzellen, Fibroblasten und aktivierte Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen [135, 136]. Aufgrund von alternativem Splicing der mRNA und unterschiedlicher Modifikation der resultierenden Proteine liegt M-CSF in zwei verschiedenen Formen in Zellen vor. Bei beiden Formen handelt es sich um Homodimere,

wobei eines als lösliches Zytokin über sekretorische Vesikel von den Zellen sezerniert wird und das andere als membrangebundenes oder membranassoziiertes Protein auf der Zelloberfläche vorkommt. Letzteres kann durch bestimmte Enzyme, darunter die M-CSF α -Konvertase und ADAM-17 freigesetzt werden [116, 136-138]. Anders als G-CSF und GM-CSF wird M-CSF im gewissen Maße konstitutiv von vielen Zellen produziert [134].

GM-CSF wird während inflammatorischer Prozesse von verschiedenen aktivierten Zellen wie Makrophagen, Mastzellen, T-Zellen, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen sezerniert [139]. Unter anderem reguliert GM-CSF die Proliferation und Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen zu Granulozyten und Makrophagen, sowie deren Aktivierung. Außerdem ist es indirekt an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt, indem es die Proliferation und Differenzierung von DCs fördert [139, 140].

Durch G-CSF wird die Proliferation, die Differenzierung, das Überleben und die Aktivierung insbesondere von Neutrophilen, aber auch anderen Granulozyten reguliert. Hauptsächlich wird G-CSF von aktivierten Monozyten bzw. Makrophagen, aber auch von anderen Zellen wie z. B. Granulozyten, T-Zellen und Endothelzellen sezerniert [135, 136, 141].

1.2.3.2 Chemokine

Eine Untergruppe der Zytokine bilden die Chemokine. Diese geleiten Leukozyten chemotaktisch entlang eines Konzentrationsgefälle zum Zielort, indem sie mit bestimmten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren und führen somit zur Akkumulation der Zellen dortselbst [142, 143]. Dort können sie zur Degranulation der Leukozyten führen, sind aber auch an der Hämatopoese bzw. Angiogenese beteiligt [144]. Chemokine sind hoch konservierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 8 bis 12 kDa, die bis auf wenige Ausnahmen in ihrer Aminosäuresequenz vier Zysteinreste aufweisen, welche eine charakteristische Proteinstruktur durch zwei Disulfidbrücken bilden. Anhand der Position der ersten beiden Zysteine am N-terminalen Ende werden die Chemokine in Gruppen eingeteilt. Bei den CC Chemokinen sind die ersten beiden Zysteine benachbart, während bei den CXC und CX₃C die Zysteine von einer bzw. drei Aminosäuren getrennt werden [143, 144].

1.2.3.2.1 CCL5

Das CC Chemokin C-C Motiv Chemokin Ligand 5 (CCL5, RANTES) wird hauptsächlich von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, aber auch von Epithelzellen, Fibroblasten und Thrombozyten produziert [145]. Interessanterweise wird es nicht wie die meisten anderen Zytokine direkt nach der Synthese sezerniert, sondern in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichert und kurze Zeit nach der Aktivierung der Zelle per Exozytose freigesetzt [146-148]. Wie für Chemokine üblich wirkt CCL5 proinflammatorisch, indem es Leukozyten und T-Zellen chemotaktisch zum Entzündungsort lockt. Gleichzeitig kann es aber auch die Aktivierung von Th1- und zytotoxischen T-Zellen unterstützen, indem es die Ausschüttung von Zytokinen wie z. B. IFN γ und TNF fördert [145, 149].

1.3 Zielsetzung

Bei der AIH handelt es sich um eine autoimmune Lebererkrankung, dessen Pathogenese bisher weitgehend ungeklärt ist. Eine gezielte Behandlung ist bisher nicht möglich. Daher besteht eine Therapie meist aus einer dauerhaften systemischen Immunsuppression. Diese Therapie ist aber nicht immer erfolgreich oder wird aufgrund von Nebenwirkungen nicht vertragen. Für einige Fälle mit einer solchen schwer zu behandelnden AIH ist eine erfolgreiche Therapie außerhalb des eigentlichen Zulassungsbereichs mit dem monoklonalen anti-TNF Antikörper Infliximab beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, die Pathogenese der Erkrankung besser zu verstehen, indem eine differenzierte Untersuchung der Expression von Zytokinen unter einer solchen Therapie erfolgte.

Ferner sollten CD4⁺ T-Zellen im Blut und der Leber von Patienten charakterisiert werden, insbesondere um die Pathogenese dieser Erkrankung besser zu verstehen. In Vorarbeiten wurde deutlich, dass TNF eine zentrale Rolle spielt, daher sollte hier eine tiefergehende Analyse erfolgen.

Abschließend sollte außerdem die Aktivität und Präsenz des Enzyms ADAM-17, welches maßgeblich verantwortlich für die Freisetzung von TNF ist, in der AIH untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage A200S	Satorius AG
Autoklav Systec VX-120	Systec GmbH
Blot-System mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Dispenser Multipette® stream	Eppendorf AG
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences
Färbeküvetten	VWR International LLC.
Flockeneisbereiter AF 103	Scotsman® Ice Systems
Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH
Gefrierschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
Gefrierschrank -80 °C	SANYO Electric Biomedical Co. Ltd.
Gelelektrophorese-System mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Gelkämme mini-PROTEAN® Comb, 10 Taschen, 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories Inc.
Gelplatten mini-PROTEAN® Spacer Plates 1,5 mm mit Deckplatte	Bio-Rad Laboratories Inc.
Gießstand mini-PROTEAN® Casting Stand mit Casting Frame	Bio-Rad Laboratories Inc.
Heizblock Thermomixer C	Eppendorf AG
Hybridisierungssofen HybEZ™ Oven	ACD Advanced Cell Diagnostocs Inc.
Hybridisierungssofen UVP HybriLinker HL2000	Fischer Scientific GmbH
Fusion FX Chemi-, Biolumineszenz und UV Fluoreszenz Bildgebungssystem	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
Inkubator MCO-18 AIC	SANYO Electric Biomedical Co. Ltd.

Geräte	Hersteller
Inkubator MOC-19 AIC (UV)	SANYO Electric Biomedical Co. Ltd.
Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler GmbH
Kühlschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlzentrifuge centrifuge 5417 R	Eppendorf AG
Kühlzentrifuge centrifuge 5427 R	Eppendorf AG
Kühlzentrifuge centrifuge 5810 R	Eppendorf AG
Kühlzentrifuge centrifuge 5920 R	Eppendorf AG
Kühlzentrifuge Rotanta 460S	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mehrkanalpipette Research® plus (10, 100 und 300 µl)	Eppendorf AG
Mikroskop BZ-9000 (Biorevo)	Keyence Deutschland GmbH
Mikroskop Leica DM IRB	Leica Microsystems
Mikrowelle	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific
Neubauer-improved Kammertiefe 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
peqStar Thermocycler	VWR International GmbH
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH
Pipetten Research® plus (2,5, 10, 20, 100, 200 und 1000 µl)	Eppendorf AG
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH
Platten-Lesegerät Infinite® F50 Microplate Reader	Tecan Trading AG
Präzisionswaage EMB 100-3	Kern & Sohn GmbH
Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix Instrument GmbH
Rollenmischer Stuart™ SRT6	Merck KGaA
Rotilabo®-Alu.Rack 1.5 und 2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Schottflaschen (50 ml bis 2 l)	DURAN Group GmbH
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage™	Thermo Scientific

Geräte	Hersteller
Spannungsquelle PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories Inc.
V-3000AB Isothermal LN2 Freezer	Custom BioGenic Systems Inc.
Vakuumpumpe BVC Professional	Vaccubrand GmbH
ViiA 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industrie
Vortexer VV3	VWR International GmbH
Wasserbad GLF 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Zentrifuge MyFuge™ 12 mini Centrifuge	Benchmark Scientific Inc.

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem GmbH
Amphotericin B aus <i>Streptomyces sp.</i>	Sigma-Aldrich Inc.
Biocoll mit 10 mM HEPES (Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom GmbH
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Inc.
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Electrophoresis GmbH
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dithiothreitol (DDT)	Serva Electrophoresis GmbH
Ethanol absolut	ChemSolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG
Ethanol vergällt ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACSFlow Sheath Fluid	BD Biosciences
FACSRinse Solution	BD Biosciences
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Flixabi® (Infliximab) 100 mg Pulver für ein Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung	Samsung Bioepis NL B.V.
Flüssiger Stickstoff	Linde AG

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
GI254023X (ADAM-10 Inhibitor)	Sigma-Aldrich Inc.
Glycerin wasserfrei reinst	Merck KGaA
Glycin Pufferan® ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
GolgiPlug™	BD Biosciences
GW280264X (ADAM-17 / ADAM-10 Inhibitor)	Iris Biotech GmbH
H ₂ O _{dest.} Aqua B. Braun Ecotainer	B. Braun Medical AG
H ₂ O _{dest.} Vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)	Hauseigene Entsalzungsanlage
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG
HEPES Pufferan® ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
Human Serum „off the clot“, Type AB	PAA Laboratories GmbH
Human Type AB Serum	MP Biomedicals Germany GmbH
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
Ionomycin calcium salt aus <i>Streptomyces conglobatus</i>	Sigma-Aldrich Inc.
Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9 % (NaCl-Lösung)	B. Braun Medical AG
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH
Methanol ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories Inc.
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Inc.
Natriumlaurylsulfat (SDS) Pellets ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
OneComp eBeads™ Compensation Beads	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc.
Pacific Orange™ Succinimidyl Ester (PacO-NHS)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 zu 250 kDa	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Gibco®/Life Technologies
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Inc.
Proleukin® S (rekombinantes IL-2)	Novartis Pharma GmbH
RNAscope® 2-plex Negative Control Probe	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
RNAscope® 2-plex Positive Control Probe-Human	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
RNAscope® H ₂ O ₂ & Protease Plus Reagents	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
RNAscope® Probe – Hs-CD4	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
RNAscope® Probe – Hs-TNFA-C2	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
RNAscope® Target Retrieval Reagents	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
RNAscope® Wash Buffer Reagents	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Gibco®/Life Technologies
Roti®-Free Stripping-Puffer 2.2 plus	Carl Roth GmbH & Co. KG
Rotiphorese® Gel 40 (37, 5:1) Gebrauchsfertige 40 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure rauchend 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
TaqMan® Sonde ADAM17: Hs01041915_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
TaqMan® Sonde HPRT1: Hs02800695_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Inc.
Trizma® Base (Tris Base) ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich Inc.
Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco®/Life Technologies
Tween® 20	Sigma-Aldrich Inc.
Vector Labs Vectamount	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
Xylol (Isomerengemisch, min 99 %)	ChemSolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Inc.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amersham™ Protran® Western blotting membrane, Nitrocellulose, Porengröße 0,45 µm	GE Healthcare
Auffanggefäß 500 ml	Sarstedt AG & Co
Combitips advanced® (0,1, 0,2, 1, 5 und 10 ml)	Eppendorf AG
CryoPure Gefäß 1,6 ml	Sarstedt AG & Co
Deckgläschen	Sarstedt AG & Co
Filtropur BT50, 500 ml, 0,2 µm Flaschenaufsatzfilter	Sarstedt AG & Co
Injekt® Solo 2 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG
MicroAmp™ Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 ml	Applied Biosystems
Mikropistille für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co. KG
Mikroreaktionsgefäße (0,2, 1,5 und 2 ml)	Sarstedt AG & Co
Multiply®-µStrip Pro 8-strip	Sarstedt AG & Co
Objekträger SuperFrost Plus™	Fischer Scientific GmbH
Pipettenspitzen (20, 200, 300, 1200 µl)	Sarstedt AG & Co
Pipettenspitzen Biosphere® mit Filter (20, 200, 300 und 1200 µl)	Sarstedt AG & Co
Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH
Röhre 5 ml, 75x13 mm, PS	Sarstedt AG & Co
Safety-Multifly®-Kanüle 21G, 200 mm lang	Sarstedt AG & Co
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 und 100 ml)	Sarstedt AG & Co
S-Monovette® 7,5 ml Kalium-EDTA Blutentnahmesystem	Sarstedt AG & Co
Sterican® Standardkanüle Gr.2	B. Braun Melsungen AG
TC-Platte mit Flach- und Rundboden; 6- und 96-Well	Sarstedt AG & Co
Transferpipetten	Sarstedt AG & Co

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Whatman® Gel Blot Papier	GE Healthcare
Whatman® Glass Microfiber filters GF/D 90 mm	GE Healthcare
Zellsieb 100 µm	Sarstedt AG & Co

Tabelle 4: Kits

Kits	Hersteller
Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Biosciences
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Human TNF RI/TNFRSF1A Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems Inc.
Human TNF-alpha DuoSet ELISA Kit	R&D Systems Inc.
KAPA Probe Fast qPCR Kit	Sigma-Aldrich Inc.
M-CSF (CSF-1) Human ELISA Kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc.
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
RNAscope® 2.5 HD Duplex Reagent Kit	ACD Advanced Cell Diagnostics Inc.
SuperSignal™ West Dura	Thermo Fisher Scientific Inc.
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	BioLegend Inc.

Tabelle 5: Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva™ 8	BD Biosciences
BZ-II Analyzer	Keyence Deutschland GmbH
BZ-II Viewer	Keyence Deutschland GmbH
EndNote™ X8	Alfasoft GmbH
FlowJo 10	FlowJo LLC 2006-2018
Fusion FX EvolutionCapt	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
GIMP 2.10	The GIMP Team
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software Inc.

Software	Hersteller
NanoDrop™ 2000/2000c; 1.6.198	Thermo Scientific
Tecan i-control™ 2.01	Tecan Trading AG
ViiA™ 7 Software 1.2.4	Applied Biosystems

2.1.2 Antikörper

Wenn nichts anderes angegeben ist, sind alle Antikörper ausschließlich gegen die humane Form des Antigens gerichtet. Eine Kreuzaktivität in Schimpansen oder anderen Primatenarten kann aber nicht immer vom Hersteller ausgeschlossen werden.

Tabelle 6: Antikörper

Antigen	Konjugat	Klon	Hersteller
ADAM17	-	polyklonal	Millipore by Merck KGaA
CD3	APC/Fire™ 750	UCHT1	BioLegend Inc.
CD3	AF700	UCHT1	BioLegend Inc.
CD4	Pacific Blue™	RPA-T4	BioLegend Inc.
CD8	AF700	RPA-T8	BioLegend Inc.
CD11b	Pacific Blue™	ICRF44	BioLegend Inc.
CD14	AF488	M5E2	BD Biosciences
CD16	APC/Fire™ 750	3G8	BioLegend Inc.
CD56 (NCAM)	APC	CMSSB	eBioscience by Thermo Fisher Scientific Inc.
CD62L (L-Selektin)	PE	DREG-56	BioLegend Inc.
CD68	PerCP/Cy5.5	Y1/82A	BioLegend Inc.
CD178 (FasL)	PE	NOK-1	BioLegend Inc.
CD254 (RANKL)	APC	MIH24	BioLegend Inc.
EOMES	PE	WD1928	eBioscience by Thermo Fisher Scientific Inc.
G-CSF	eFluor® 660	8F5CSF	eBioscience by Thermo Fisher Scientific Inc.
GM-CSF	APC	BVD2-21C11	BioLegend Inc.

Antigen	Konjugat	Klon	Hersteller
GM-CSF	PE	BVD2-21C11	BioLegend Inc.
Granulysin	AF488	RB1	BD Biosciences
Granzym B	AF647	GB11	BioLegend Inc.
IFN γ	APC	B27	BD Biosciences
IFN γ	FITC	B27	BioLegend Inc.
IFN γ	PerCP/Cy5.5	B27	BioLegend Inc.
IL-17A	AF488	N49-653	BD Biosciences
IL-2	FITC	MQ1-17H12	BioLegend Inc.
Kaninchen IgG	HRP	polyklonal	Cell Signaling Technology Inc.
M-CSF	PE	26786	R&D Systems Inc.
Perforin	FITC	B-D48	BioLegend Inc.
RANTES (CCL5)	AF647	VL1	BioLegend Inc.
TNF	PE	MAb11	BD Biosciences und BioLegend Inc.
TNF	PE/Cy7	MAb11	BioLegend Inc.
TNF	FITC	MAb11	BioLegend Inc.
β -Aktin (I-19)	HRP	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc.

2.1.3 Medien und Puffer

Tabelle 7: Zusammensetzung der Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung
T-Zell Kulturmedium	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium
	5 % Human Type AB Serum
	1 % Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml
	1,25 mg/l Amphotericin B

Das T-Zell Kulturmedium wurde vor dem Gebrauch mittels Sterilfiltration (Porengröße 0,2 μ m) sterilisiert. Da in dem humanen AB Serum sehr viele Schwebstoffe enthalten sind,

wurde zusätzlich ein Glasmikrofaser Filter als Vorfilter eingesetzt, um ein Verstopfen des Sterilfilters zu verhindern.

Tabelle 8: Zusammensetzung allgemeiner Puffer

Puffer	Zusammensetzung (1 l)
10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; Phosphate Buffered Saline)	2 g Kaliumchlorid (KCl)
	11,5 g di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)
	2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
	50 g Natriumchlorid (NaCl)

Das 10x PBS wurde bei 121 °C und 2 bar Überdruck 20 min sterilisiert. Einfach konzentriertes PBS wurde durch Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ hergestellt und anschließend auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer zum Proteinnachweis

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
	150 mM Natriumchlorid (NaCl)
	1 % Triton™ X-100
	50 mM Natriumfluorid (NaF)
	2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
	10 % Glycerin
	Pro 2,5 ml Lysepuffer: ¼ Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail
5x Lämmli-Puffer	250 mM Tris Base
	10 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
	0,5 % Bromphenolblau
	50 % Glycerin
	0,5 M Dithiothreitol (DDT)

Puffer	Zusammensetzung
10x Laufpuffer	35 mM Natriumlaurylsulfat (SDS)
	1,92 M Glycin
	250 mM Tris Base
10x Blotpuffer	1,92 M Glycin
	250 mM Tris Base
1x Blotpuffer	10 % 10x Blotpuffer
	20 % Methanol
10x TBS	100 mM Tris Base
	1,5 M Natriumchlorid (NaCl)
TBS-T	10 % 10x TBS
	0,05 % Tween® 20

Der 10x TBS Puffer wurde mit 13 M Salzsäure auf einen pH von 7,6 eingestellt.

2.1.4 Humanes Probenmaterial

In den Versuchen dieser Arbeit wurden Blutproben von AIH Patienten und gesunden Personen sowie Leberbiopsien von AIH Patienten und Kontrollpersonen (Fettlebererkrankung bzw. Tumorrangewebe) eingesetzt. Hierbei wurden ausschließlich Proben von Patienten mit einer gesicherten Diagnose einer AIH eingeschlossen, wobei die Diagnosestellung anhand des vereinfachten Punktesystems der „Internationalen Autoimmunen Hepatitis Gruppe“ erfolgte [6, 7]. Die Probeentnahme erfolgte im Rahmen der ambulanten oder stationären Behandlung der Patienten in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Alle Probanden wurden zuvor aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Analyse der Proben wurde durch das regionale Ethikkomitee genehmigt (PV 3233). In Tabelle 10 sind die klinischen Daten zu den Patienten und Kontrollpersonen jeweils innerhalb der einzelnen Versuche zusammengefasst dargestellt. Zum Teil wurden dieselben Proben oder unterschiedliche Proben derselben Person in mehreren verschiedenen Analysen verwendet, wobei gleichzeitig der Einsatz mehrerer Proben eines Probanden innerhalb einer Untersuchung ausgeschlossen wurde.

Tabelle 10: Klinische Daten zu den Patienten und Kontrollpersonen. N = Gesamtanzahl; w = weiblich; m = männlich; Immunsup. = Immunsuppressive; DZ = Durchflusszytometrie; PBMC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; Beh. = Behandlung; IFX = Infliximab; n. v. = nicht verfügbar; LIL = leberinfiltrierende Lymphozyten; GNLY = Granulysin; PRF = Perforin; GZMB = Granzym B. Normalwerte AST und ALT bei Frauen 10 – 35 IU/l, bei Männern 10 – 50 IU/l; IgG 7 – 16 g/l; γ-Globulin 10,3 – 18,2 %. Remission ist als normale AST-, ALT-, IgG- und γ-Globulin-Werte definiert. Das Alter, sowie die AST-, ALT-, IgG- und γ-Globulin-Werte sind als Median mit den Extremwerten (in Klammern) angegeben. Nicht verfügbare Daten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. So fehlen in den Angaben Daten von ¹ 1, ² 2, ³ 3, ⁴ 4, ⁵ 5, ⁶ 6 Personen

	Gruppe	N, Geschlecht (w / m)	Median Alter bei Proben- entnahme	Median AST [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median ALT [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median IgG [g/l] 7-16	Median γ-Globulin [%] 10,3-18,2	Remission (- / +)	Immunsup. Therapie (- / +)	Andere autoimmune Erkrankung (- / +)
DZ PBMC (Beh. mit IFX)	Gesund	3 (2 / 1)	23 (19-24)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	3 / 0	3 / 0
DZ PBMC (TNF, IFN _γ , IL-17A)	AIH	9 (6 / 3)	53 (35-67)	96 (15-949)	147 (18-2387)	13,2 (9,25-25,8)	17 ² (13,6-29,7)	6 / 3	3 / 6	6 / 3
	Gesund	9 (6 / 3)	54 (38-62)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	9 / 0	8 / 1
DZ LIL (TNF, IFN _γ , IL-17A)	AIH	6 (4 / 2)	40 (24-61)	221,5 (77-2207)	411 (95-2592)	16,9 (13,7-35,1)	27,3 (16,2-38,2)	6 / 0	4 / 2	5 / 1
	Kontrolle	7 (7 / 0)	50 (18-61)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	n. v.	n. v.
DZ PBMC (IL-2, CCL5, GM-CSF)	AIH	11 (9 / 2)	50 (20-76)	37 (11-457)	35 (10-832)	11,4 (9,25-17,1)	16,85 ³ (14,7-26)	8 / 3	1 / 10	7 / 3 ¹
	Gesund	9 (5 / 4)	28 (24-51)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	9 / 0	9 / 0

	Gruppe	N, Geschlecht (w / m)	Median Alter bei Proben- entnahme	Median AST [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median ALT [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median IgG [g/l] 7-16	Median γ-Globulin [%] 10,3-18,2	Remission (- / +)	Immunsup. Therapie (- / +)	Andere autoimmune Erkrankung (- / +)
DZ LIL (IL-2)	AIH	4 (4 / 0)	39,5 (22-65)	89 (47-360)	122 (52-560)	15,2 ¹ (12,4-32,3)	20,8 ¹ (18,2-33,4)	4 / 0	2 / 2	2 / 2
	Kontrolle	8 (6 / 2)	45 (20-72)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	n. v.	n. v.
DZ PBMC (FasL, RANKL)	AIH	12 (8 / 4)	54,5 (35-74)	65 (17-949)	50 (17-2387)	12,5 (7,49-25,8)	15,25 ² (10,8-29,7)	8 / 4	3 / 9	9 / 3
	Gesund	10 (7 / 3)	29,5 (23-53)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	10 / 0	10 / 0
DZ PBMC (GNLY, PRF, GZMB, EOMES)	AIH	7 (6 / 1)	37 (19-76)	56 ¹ (16-457)	34,5 ¹ (20-832)	13,9 ¹ (9,25-19,4)	18,9 ³ (14,9-24,1)	4 / 2 ¹	1 / 6	7 / 0
	Gesund	7 (6 / 1)	24 (22-37)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	7 / 0	7 / 0
DZ PBMC (M-CSF)	AIH	9 (7 / 2)	49 (32-69)	26 (15-47)	32 (20-73)	11,1 (8,6-15,6)	15,75 ¹ (12-19,8)	4 / 5	0 / 9	3 / 6
	Gesund	9 (7 / 2)	26 (21-53)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	9 / 0	9 / 0

	Gruppe	N, Geschlecht (w / m)	Median Alter bei Proben- entnahme	Median AST [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median ALT [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median IgG [g/l] 7-16	Median γ-Globulin [%] 10,3-18,2	Remission (- / +)	Immunsup. Therapie (- / +)	Andere autoimmune Erkrankung (- / +)
DZ PBMC (G-CSF, CD62L)	AIH	10 (8 / 2)	68 (26-77)	23,5 (10-610)	31 (8-666)	13,4 (8,68-27,1)	18,25 (13,1-29,5)	6 / 4	1 / 9	9 / 1
	Gesund	10 (9 / 1)	27,5 (21-53)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	10 / 0	10 / 0
DZ LIL (M-CSF, GM-CSF)	AIH	4 (3 / 1)	41 (24-74)	62 (31-313)	83 (67-178)	16,8 ¹ (11,8-17,4)	n. v.	4 / 0	3 / 1	4 / 0
	Kontrolle	6 (4 / 1) ¹	56 ¹ (24-58)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	n. v.	n. v.
ELISA (TNF-RI)	AIH	7 (4 / 3)	48 (34-59)	96 (31-1043)	147 (29-1629)	15,8 (11,3-33)	20,1 ² (16,4-38,3)	7 / 0	5 / 2	6 / 1
	Gesund	6 (6 / 0)	34 (21-53)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	6 / 0	6 / 0
ELISA (M-CSF)	AIH	16 (14 / 2)	45,5 (19-76)	44 (22-410)	57 (26-816)	16,8 ¹ (8,7-28,5)	21,95 ⁶ (16,5-36,7)	14 / 2	3 / 13	11 / 5
	Gesund	16 (9 / 7)	29 (22-55)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	16 / 0	16 / 0

	Gruppe	N, Geschlecht (w / m)	Median Alter bei Proben- entnahme	Median AST [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median ALT [IU/l] w: 10-35 m: 10-50	Median IgG [g/l] 7-16	Median γ-Globulin [%] 10,3-18,2	Remission (- / +)	Immunsup. Therapie (- / +)	Andere autoimmune Erkrankung (- / +)
qRT-PCR PBMC (ADAM-17)	AIH	9 (6 / 3)	53 (35-67)	96 (15-949)	147 (18-2387)	13,2 (9,25-25,8)	17 ² (13,6-29,7)	6 / 3	3 / 6	6 / 3
	Gesund	8 (6 / 2)	55 (38-62)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	8 / 0	7 / 1
qRT-PCR LIL (ADAM-17)	AIH	8 (8 / 0)	49,5 (28-78)	336 ⁴ (59-663)	307 ⁴ (112-815)	28,9 ⁴ (22,6-51,6)	33,1 ⁵ (30,7-47,9)	4 / 0 ⁴	4 / 4	7 / 1
	Kontrolle	11 (11 / 0)	48 (18-60)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	n. v.	n. v.
ELISA PBMC (ADAM Inhibitoren)	AIH	3 (3 / 0)	56 (20-68)	21 (19-36)	23 (22-27)	11 (10,8-16,6)	19,7 (14,5-20,6)	2 / 1	1 / 2	3 / 0
Western Blot PBMC (ADAM-17)	AIH	3 (2 / 1)	68 (34-72)	16 (16-24)	21 (15-25)	15,3 (13,8-17,5)	23,05 ¹ (23- 23,1)	2 / 1	0 / 3	3 / 0
	Gesund	3 (3 / 0)	27 (21-34)	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	/	3 / 0	3 / 0

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

2.2.1.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Für die Aufreinigung von PBMC wurde mit EDTA versetztes Vollblut von Patienten oder Kontrollpersonen verwendet. Vor der eigentlichen Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde zunächst EDTA-Plasma durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 400 g gewonnen. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -80°C . Anschließend wurde das Blut eines Spenders aus 3 Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette®) mit 1x PBS auf 35 ml aufgefüllt. Nachdem 15 ml des Trennmittels Biocoll, ein Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, mit einer Dichte von $1,077\text{ g/ml}$ mit diesem Blut-PBS Gemisch überschichtet wurde, folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 600 g mit wenig Beschleunigung (Stufe 3) und ohne Bremse. Bei diesem Schritt teilten sich die einzelnen Blutbestandteile anhand ihrer Dichte auf. Die Erythrozyten sedimentierten am Boden des Röhrchens, da diese mit einem spezifischen Gewicht von $1,093 - 1,096\text{ g/cm}^3$ eine deutlich höhere Dichte als das Biocoll aufweisen. Hingegen haben die Lymphozyten (spezifisches Gewicht $1,050 - 1,061\text{ g/cm}^3$), Monozyten (spezifisches Gewicht $1,065 - 1,070\text{ g/cm}^3$) und Thrombozyten (spezifisches Gewicht $1,040\text{ g/cm}^3$) eine geringere Dichte als das Trennmittel und sammelten sich an der Grenzschicht zwischen dem deutlich leichteren Blutplasma (spezifisches Gewicht $1,025 - 1,029\text{ g/cm}^3$) und dem Biocoll [150]. Die PBMC an der Grenzschicht wurden vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und zweimal mit je 50 ml 1x PBS für 5 min bei 400 g gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (vgl. Abs. 2.2.1.3).

2.2.1.2 Leberinfiltrierende Lymphozyten (LIL)

Die Isolierung der LIL aus Leberbiopsien erfolgte je nach Versuch mit zwei unterschiedlichen Methoden:

1. Die Biopsien wurden zusammen mit dem Transportmedium (T-Zell Kulturmedium (vgl. Tabelle 7) oder isotonische NaCl-Lösung) mit Hilfe des Stempels einer Spritze durch ein $100\text{ }\mu\text{m}$ Zellsieb gedrückt. Das Sieb wurde anschließend mit 50 ml T-Zell Kulturmedium (vgl. Tabelle 7) gespült und die Zellen 5 min bei 400 g gewaschen. Falls es sich um eine Keilbiopsie handelte, wurden vor dem Waschen die Hepatozyten für 4 min bei 40 g sedimentiert und nur der Überstand weiterverwendet. Nach dem Waschschrift folgte die Bestimmung der Zellzahl (vgl. Abs. 2.2.1.3).

2. Die Biopsien wurden mit einigen μl des Transportmediums (T-Zell Kulturmedium (vgl. Tabelle 7) oder isotonische NaCl-Lösung) in eine 6 Well Flachbodenplatte überführt und mit zwei Kanülen zerkleinert. Das verbliebene Transportmedium wurde bei 400 g 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 2 – 3 ml T-Zell Kulturmedium, versetzt mit 100 U/ml rekombinantem IL-2, aufgenommen. Hiermit wurde die zerkleinerte Biopsie überschichtet und für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das IL-2 im Medium ließ die Lymphozyten aus dem Gewebe ins Medium auswandern. Im Anschluss wurde das Medium, sowie die verbliebenen Gewebestückchen mit dem Stempel einer Spritze durch ein 100 μl Zellsieb gedrückt. Das Well wurde mehrfach mit einigen ml frischem T-Zell Kulturmedium gespült und dieses ebenfalls durch das Sieb gegeben. Nachdem das Sieb mit 50 ml Medium gespült wurde, folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 400 g und die Zellzahlbestimmung (vgl. Abs. 2.2.1.3).

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauerzählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm. Diese ist aufgeteilt in 3 x 3 Großquadrate, wovon die 4 Eckquadrate wiederum in je 4 x 4 Kleinquadrate aufgeteilt sind. Die Eckquadrate haben eine Kantenlänge von 1 mm x 1 mm, woraus sich bei einer Kammertiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 mm³ oder 0,1 μl (10⁻⁴ ml) ergibt. Dies entspricht dem Kammerfaktor von 10⁻⁴.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die zentrifugierten Zellen in 1 ml bzw. 10 ml 1x PBS aufgenommen. 10 μl dieser Zellsuspension wurden mit 90 μl des Farbstoffes Trypanblau, welcher zuvor 1 zu 10 mit 1x PBS verdünnt wurde, vermischt und in die Neubauerzählkammer gegeben. Das Trypanblau wird von Zellen, die keine intakte Zellmembran mehr haben, aufgenommen, wodurch diese unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran weisen diese Färbung hingegen nicht auf. Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 40x Vergrößerung alle lebenden Zellen in 2 bzw. 4 der Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt. Anhand der folgenden Formel konnte nun die Gesamtzellzahl in der Zellsuspension berechnet werden:

$$\text{Zellzahl in } x \text{ ml} = \frac{\text{Zellen in } y \text{ Eckquadraten}}{y} * KF * VF TP * x$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl in einem bestimmten Volumen; x = ml Zellsuspension; y = Anzahl ausgezählter Eckquadrate; KF = Kammerfaktor; VF TP = Verdünnungsfaktor Trypanblau

2.2.1.4 Gefrierkonservierung

Gefrierkonserven dienen zur Langzeitlagerung von isolierten lebenden Blut- und Leberzellen. Dazu wurden nach einer Zentrifugation (5 min bei 400 g) die Zellpellets mit der gewünschten Zellzahl in 1 ml Fetalem Kälberserum (FCS) / 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Das DMSO verhindert hierbei die Entstehung von Eiskristallen, die die Zellen zerstören können [151]. Um einen möglichst langsamen Gefrierprozess zu ermöglichen, wurden die Zellen zunächst für mindestens 24 Stunden in einer Box, welche mit Watte ausgekleidet war, bei -80 °C eingefroren. Erst im Anschluss wurden diese für die Langzeitlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz bei Raumtemperatur angetaut. Anschließend wurden die angetauten Zellen in etwa 1 ml T-Zell Kulturmedium (vgl. Tabelle 7) aufgenommen und zügig in 10 ml bereitgestelltes Medium überführt, bis die gesamte Gefrierkonserve aufgetaut und verdünnt war. Nach einem Waschschrift (5 min bei 400 g) folgte eine erneute Zellzahlbestimmung (vgl. Abs. 2.2.1.3).

2.2.2 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden in einem Flüssigkeitsstrahl vereinzelte Zellen an verschiedenen Lasern vorbeigeleitet. Anhand der durch die Zelle erzeugten Streuung des Lichts kann auf die Größe und Granularität der betreffenden Zellen geschlossen werden. Zusätzlich werden Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszenzmarkierte Antikörper (vgl. Tabelle 6) eingesetzt, um oberflächliche und intrazelluläre Proteine zur spezifischen Charakterisierung der Zellen zu markieren. Hierbei werden die Farbstoffe durch die Laser angeregt und das spezifisch emittierte Fluoreszenzsignal detektiert. Mit diesen Informationen kann auf die jeweiligen Eigenschaften jeder vereinzelter Zelle geschlossen werden.

Mittels der Durchflusszytometrie wurden PBMC oder LIL analysiert (vgl. Abs. 2.2.1). Vor der Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen bzw. markierten Antikörpern wurden die T-Zellen zunächst mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin unspezifisch stimuliert. PMA ist ein Äquivalent des intrazellulären sekundären Botenstoff

Diacylglycerin (DAG), welcher unter anderem an der T-Zell-Rezeptor vermittelten Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) beteiligt ist. PKC wiederum ist ein zentrales Enzym in vielen intrazellulären Signalkaskaden zur T-Zell Aktivierung. Bei der Stimulation umgeht PMA den T-Zell-Rezeptor, indem es direkt intrazellulär DAG bei der PKC Aktivierung ersetzt [152-154]. Auch Ionomycin, ein Ca^{2+} -Ionophor, stimuliert Zellen unabhängig von einer T-Zell-Rezeptor Aktivierung, indem es mittels Ca^{2+} -Transport über Membranen die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration erhöht, wodurch Ca^{2+} -sensitive Enzyme aktiviert werden. Da auch die PKC Ca^{2+} zur Aktivierung benötigt, wirken PMA und Ionomycin synergistisch bei der T-Zell Stimulation [152, 155]. Für die Stimulation wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen in 200 μl T-Zell Kulturmedium (vgl. Tabelle 7) mit 16 ng/ml PMA und 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ionomycin sowie 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ GolgiPlug™ für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Beim GolgiPlug™ handelt es sich um einen intrazellulären Proteintransportinhibitor auf Brefeldin A Basis, wodurch es zur Anreicherung von Zytokinen und anderen Proteinen im ER kommt [156]. Zusätzlich zu den stimulierten Proben wurden außerdem zur Kontrolle jeweils von jeder Probe auch $1 \cdot 10^6$ Zellen nur in Medium mit GolgiPlug™ inkubiert.

Nach einem Waschschrift (5 min bei 400 g) mit jeweils 1 ml 1x PBS folgte eine 20-minütige Färbung der nicht-vitalen Zellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pacific Orange™ Succinimidyl Ester (PacO-NHS) in 1x PBS im Dunklen auf Eis. Dieser Farbstoff dringt in Zellen ohne intakte Zellmembran ein und bindet dort freie Amine, wodurch vitale Zellen als ungefärbt detektiert werden. Anschließend wurden die Zellen erneut mit je 1 ml 1x PBS für 5 min bei 400 g gewaschen.

Nun folgte in einigen Versuchen eine extrazelluläre Färbung von Oberflächenantigenen der Zellen. Dazu wurden die Zellen für 30 min in je 50 μl Färbeansatz, bestehend aus der jeweils spezifischen Antikörperkonzentration und 1x PBS, im Dunkeln auf Eis inkubiert. In welcher Konzentration die einzelnen Antikörper einzusetzen sind, wurde zuvor separat ausgetestet. Die Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 wurden in der Regel nicht extrazellulär, sondern zusammen mit den anderen Antigenen intrazellulär gefärbt, da CD3 und CD4 durch die PMA Stimulation internalisiert werden können [157].

Für die intrazelluläre Färbung mussten die Zellen zunächst nach einem weiteren Waschschrift (je 1 ml 1x PBS, 5 min bei 400 g) fixiert und permeabilisiert werden. Dies erfolgte mit dem Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit nach dem Standardprotokoll des Herstellers BD. Im Anschluss folgte eine 30-minütige Inkubation der

Zellen im Dunkeln auf Eis in je 50 µl Färbeansatz, welcher sich aus dem Permeabilisierungspuffer des Kits und der jeweils spezifischen Antikörperkonzentration zusammensetzte. Nach einem letzten Waschschrift (5 min bei 400 g) mit jeweils 1 ml 1x PBS wurden die Zellen in 300 µl 1x PBS aufgenommen.

Falls nicht nur intrazelluläre Marker, sondern auch Transkriptionsfaktoren gefärbt werden sollten, entfiel der obere Schritt und wurde durch eine intranukleäre Färbung ersetzt. Dazu wurde das True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set verwendet. Die Zellen wurden nach der Vital- bzw. extrazellulären Färbung in 200 µl des Transcription Factor 1x Fix Puffer aufgenommen, gevortext und 50 min im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit je 1 ml Transcription Factor 1x Perm Puffer 5 min bei 400 g gewaschen. Die Zellen wurden dann in je 50 µl des Perm Puffers mit der spezifischen Antikörperkonzentration aufgenommen und 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (5 min bei 400 g) mit jeweils 1 ml des Perm Puffers wurden die Zellen in 300 µl 1x PBS aufgenommen.

Die Proben wurden bis zur Durchflusszytometrie, welche in der Regel am nächsten Tag stattfand, im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Gemessen wurden die Proben mit dem Durchflusszytometer LSR II, die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo 10. Um die spektrale Überlappung der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe der Auswertsoftware rechnerisch korrigieren zu können, wurden Kompensationsproben aus OneComp eBeads™ und den jeweils eingesetzten Antikörpern verwendet. Für die Kompensation von PacO-NHS wurden einige übrige Zellen für 30 min bei 56 °C abgetötet und anschließend mit einigen vitalen Zellen vermischt. Diese wurden für 20 min mit 1 µg/ml PacO-NHS in 1x PBS im Dunklen auf Eis gefärbt und im Anschluss 5 min bei 400 g gewaschen.

2.2.2.1 Gating-Strategie

Bei der Auswertung von durchflusszytometrischen Analysen (vgl. Abs. 2.2.2) werden stets zwei gemessene Marker in einem zweidimensionalen Diagramm gegeneinander aufgetragen. Jeder Punkt spiegelt hierbei eine spezifische Zelle wider. Durch eine immer feiner werdende Auswahl von Zellgruppen anhand der Größe, Granularität bzw. der Bindung von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Fluoreszenzfarbstoffen kann auf verschiedene Subpopulationen und ihre Eigenschaften geschlossen werden.

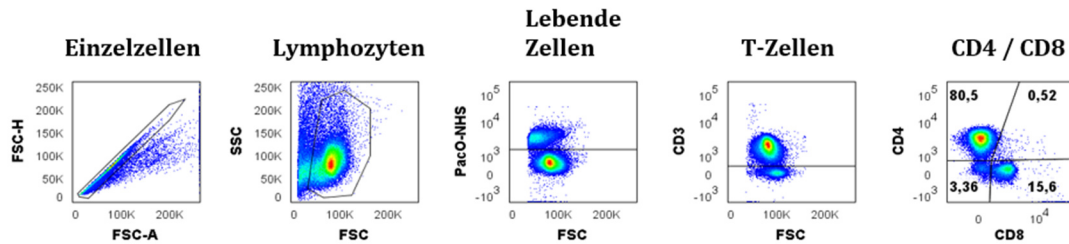


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie zur Eingrenzung einzelner, lebender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten

Zunächst wurden bei allen durchgeführten Messungen Dubletten ausgeschlossen und die weitere Auswertung auf Lymphozyten begrenzt, welche anhand ihrer spezifischen Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) des Lichts, die auf die Größe und Granularität der Zellen schließen lässt, identifiziert wurden (vgl. Abbildung 5). Zellen welche sich im nächsten Gating-Schritt als negativ für PacO-NHS darstellten, konnten als lebende Zellen ausgewählt werden, da PacO-NHS ein Farbstoff ist, der sich in toten Zellen anlagert. Anschließend folgte die Auftrennung der verbliebenen Zellen in CD3⁺ T-Zellen und CD3⁻ andere Zellen. Diese beiden Subpopulationen wurden im Folgenden entweder direkt auf die Produktion von zu untersuchenden Markern analysiert, oder die CD3⁺ Zellen zunächst weiter in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgegliedert. Bei den CD4⁺ T-Zellen handelte es sich in den meisten Untersuchungen um die Zielpopulation.

2.2.3 *In vitro* anti-TNF Behandlung von PBMC

Um den Einfluss des anti-TNF Medikaments Flixabi® (Infliximab) auf Lymphozyten zu untersuchen, wurden aufgetaute PBMC *in vitro* damit behandelt (vgl. Abs. 2.2.1). In Anlehnung an die Therapie im Menschen mit 3 - 5 mg/kg Körpergewicht, wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 2,5 ng/ml Infliximab in T-Zell Kulturmedium (vgl. Tabelle 7) für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medikament wurde hierzu in einer Verdünnungsreihe mit H₂O_{dest.} verdünnt. Gleichzeitig zur Behandlung wurden die Zellen unspezifisch mit 16 ng/ml PMA und 1,6 µg/ml Ionomycin stimuliert. 1 µl/ml GolgiPlug™ wurde wie bei der Durchflusszytometrie (vgl. Abs. 2.2.2) zur Inhibition des intrazellulären Proteintransports eingesetzt. Um am Ende genügend Zellen für die Auswertung zu haben, wurden alle Proben doppelt angesetzt und die Zellen nach der Stimulation vereinigt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 400 g mit je 1 ml 1x PBS folgte eine Färbung der toten Zellen, sowie eine intrazelluläre Färbung, wie sie unter Absatz 2.2.2 beschrieben ist.

2.2.4 ELISA

Mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kann die Konzentration von verschiedenen löslichen Antigenen in Körperflüssigkeiten wie z. B. Blutplasma oder Serum, aber auch Zellkulturüberständen quantitativ bestimmt werden. Dazu wird beim Sandwich-ELISA-Verfahren eine Zellkulturplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu messende Antigen beschichtet. Werden Proben auf die Platte aufgetragen, bindet das enthaltene Zielantigen spezifisch an den Antikörper und wird so ebenfalls an der Platte gebunden. Der Nachweis der gebundenen Antigenmenge erfolgt mittels Zugabe eines weiteren Antikörpers gegen das Antigen, welcher mit einem Enzym gekoppelt ist. Wird ein Substrat für das gekoppelte Enzym hinzugegeben, kommt es bei dessen Umsetzung zu einer Farbreaktion, die photometrisch gemessen werden kann. Diese ist proportional zur Enzymaktivität und somit auch zur Menge des gebundenen Enzyms und damit auch zu der Antigenkonzentration der Probe, sodass anhand einer Standardreihe mit definierter Konzentration des Antigens für jede Probe aus der gemessenen optischen Dichte (OD) die Antigenkonzentration errechnet werden kann.

Für den M-CSF ELISA wurden gefrorene EDTA-Plasmaproben (vgl. Abs. 2.2.1.1) und für den TNF RI ELISA zusätzlich gefrorene Serumproben eingesetzt. Beim M-CSF ELISA wurden die Proben unverdünnt eingesetzt und beim TNF RI ELISA 1:10 verdünnt. Die Durchführung erfolgte bei beiden Kits in Doppelbestimmungen nach Herstellerangaben. Gemessen wurden die ELISA mit dem Infinite® F50 Platten-Lesegerät.

2.2.5 ADAM-17-abhängige TNF Freisetzung durch PBMC

Um die Rolle des Enzyms ADAM-17 bei der TNF Freisetzung durch PBMC zu untersuchen, wurden PBMC mit dem ADAM-17 / ADAM-10 Inhibitor GW280264X und zur Kontrolle mit dem ADAM-10 Inhibitor GI254023X behandelt. Diese Analyse erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Schmidt-Arras vom Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die auch die Inhibitoren und das ELISA Kit zur Verfügung stellten.

Es wurden frisch isolierte, über Nacht in T-Zell Kulturmedium (vgl. Tabelle 7) bei 4 °C gelagerte PBMC (vgl. Abs. 2.2.1) eingesetzt. Je $1 \cdot 10^6$ Zellen inkubierten mit 3 μ M (Endkonzentration) GW280264X bzw. GI254023X bei gleichzeitiger unspezifisch Stimulation mit 16 ng/ml PMA und 1,6 μ g/ml Ionomycin in T-Zell Kulturmedium für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Parallel wurden außerdem Zellen zur Kontrolle ohne die

Zugabe eines Inhibitors stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen erfolgte die Analyse mittels TNF ELISA in Doppelbestimmungen nach Herstellerangaben (vgl. Abs. 2.2.4). Hierbei wurden die Proben 1:3 verdünnt eingesetzt.

2.2.6 Genexpressionsanalyse

2.2.6.1 RNAscope®

RNAscope® ist eine Methode, bei der mittels *in situ* Hybridisierung RNA Moleküle auf Zellebene in gefrorenen oder Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten visualisiert werden können. Dazu werden spezifische Sonden für die Ziel-RNA eingesetzt, die mit Hilfe einer Kaskade von signalverstärkenden Molekülen Licht- oder Fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden können.

Es wurden Schnitte von Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten humanen Leberbiopsien vom Institut für Pathologie und das RNAscope® 2.5 HD Duplex Reagent Kit, welches die Detektion von zwei Ziel-RNA Molekülen ermöglicht, verwendet. Bei diesem Kit erscheint die Sonde 1 rot und die Sonde 2 blau-grün bei der Lichtmikroskopie. Mit der Sonde 1 sollte humane CD4-RNA und mit der Sonde 2 die RNA für humanes TNF detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten Sonden gegen Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase B (*PPIB*) als Sonde 1 und RNA Polymerase II Subunit A (*POLR2A*) als Sonde 2.

Die Schnitte wurden abweichend von den Herstellerangaben über 2 Stunden bei 60 °C inkubiert. Auch bei der Deparaffinierung wurden die im Nutzerhandbuch angegebenen Zeiten jeweils verdoppelt. Anschließend folgte ein zusätzlicher 30-minütiger Inkubationsschritt bei 60 °C. Die Wasserstoffperoxid-Behandlung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Behandlung mit dem RNAscope® Target Retrieval Reagent wurde nicht auf einer Heizplatte, sondern in einer Mikrowelle durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte in eine Kunststoff-Färbeküvette mit dem RNAscope® Target Retrieval Reagent überführt. Erst nach dem Aufkochen der Lösung bei 900 Watt wurde die 15-minütige Inkubationszeit gestartet und die Mikrowelle auf 360 Watt reduziert. Etwa nach der Hälfte der Zeit wurde RNAscope® Target Retrieval Reagent nachgefüllt und die Inkubationszeit solange gestoppt, bis die Lösung wieder aufkochte. Im Anschluss wurden die Schnitte umgehend 3 – 5-mal in H₂O_{dest.} getaucht und dann, abweichend von den Herstellerangaben, für 15 Minuten in absolutem Ethanol inkubiert. Nach dem Lufttrocknen der Schnitte folgte ein weiterer zusätzlicher Inkubationsschritt für 30 min bei 60 °C. Nachdem die hydrophobe

Barriere aufgetragen wurde, folgte eine 30-minütige Protease Plus Behandlung nach Herstellerangaben. Auch die nachfolgenden Schritte wurden wie im Nutzerhandbuch beschrieben durchgeführt. Nach der Hybridisierung der Probensonden wurde der Versuch über Nacht pausiert. Zum Eindeckeln wurde das Vector Labs Vectamount Eindeckelmedium verwendet. Die Schnitte wurden bei 10x, 20x und 40x Vergrößerung mit dem Mikroskop BZ-9000 (Biorevo) lichtmikroskopisch ausgewertet und dokumentiert. Mit dem Programm GIMP 2.10 erfolgte der Weißabgleich des Hintergrundes, sowie die automatisierte Anpassung des Kontrastes und der Helligkeit.

2.2.6.2 RNA-Isolierung

Um RNA aus PBMC (vgl. Abs. 2.2.1.1) oder Leberbiopsien zu isolieren, wurde das NucleoSpin® RNA Kit verwendet. Dazu wurden zunächst bis zu 30 mg Gewebe oder $5 \cdot 10^6$ Zellen in 350 µl Lysepuffer aufgenommen und gegebenenfalls mit einer Mikropistille homogenisiert. Für den Lysepuffer wurde β -Mercaptoethanol 1:100 in dem Puffer RA1 des Kits verdünnt. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Eluiert wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser. Im Anschluss wurde die RNA Konzentration mit Hilfe des NanoDrop™ gemessen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.6.3 cDNA-Synthese

Tabelle 11: Zusammensetzung des Mastermixes zur cDNA-Synthese

Zusammensetzung (pro Ansatz)	
10x Reaktionspuffer	2 µl
dNTPs (100 mM)	0,8 µl
10x Random Primer	2 µl
Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
Σ	5,8 µl

Tabelle 12: Programm zur Umschreibung von RNA in cDNA

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
37 °C	2 h
85 °C	5 min
4 °C	5 min und Lagerung

Bei der cDNA-Synthese wird RNA mittels reverser Transkription in ihre komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurden 0,5 oder 1 µg RNA (vgl. Abs. 2.2.6.2) und das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit eingesetzt. Das für jede Probe jeweils errechnete einzusetzende RNA Volumen wurde mit RNase-freiem Wasser auf je 14,2 µl aufgefüllt und mit je 5,8 µl Mastermix (vgl. Tabelle 11) gemischt. Alle hierfür verwendeten Komponenten waren Bestandteil des Kits. Die Umschreibung erfolgte nach dem in Tabelle 12 beschriebenen Programm im Thermocycler. Gelagert wurde die cDNA bei -20 °C.

2.2.6.4 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Tabelle 13: Zusammensetzung des qPCR Mastermix

Zusammensetzung (pro Ansatz)	
qPCR Mastermix	5 µl
ROX low	0,2 µl
Sonden	0,5 µl
cDNA	4,3 µl
Σ	10 µl

Tabelle 14: qPCR Programm

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95 °C	20 sec	40 – 45-mal
95 °C	1 sec	
60 °C	20 sec	

Die quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist ein spezielles Polymerase-Kettenreaktions Verfahren (PCR), bei dem ein Fluoreszenzsignal während der einzelnen PCR Zyklen in Echtzeit detektiert wird. Dabei lagert sich eine spezifische fluoreszenzmarkierte Nukleotidsonde für das Zielgen (TaqMan® Sonde) ininigem Abstand zu der Primersequenz an die template-DNA an. Diese Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz durch die räumliche Nähe zu einem Quencher-Farbstoff am 3'-Ende gehemmt wird. Kommt es nun zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges durch Bindung und Verlängerung spezifischer Primer, wird gleichzeitig die gebundene Sonde gespalten. Dadurch verliert der Quencher seinen supprimierenden Einfluss auf den Farbstoff, wodurch ein Fluoreszenzsignal messbar wird. Die Fluoreszenz nimmt hierbei

proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte zu, da mit jedem Amplifikationsschritt mehr Reporter-Farbstoffmoleküle freigesetzt werden.

Bei der quantitativen Reversen-Transkriptions-PCR (qRT-PCR) diente die cDNA (vgl. Abs. 2.2.6.3) als Vorlage. Diese wurde mit RNase-freiem Wasser 1:2 oder 1:3 vorverdünnt. Es erfolgte stets eine Doppelbestimmung, wobei sich die Ansätze jeweils wie in Tabelle 13 angegeben zusammensetzten. Alle hierfür verwendeten Bestandteile stammten aus dem KAPA Probe Fast qPCR Kit. Es wurden Sonden gegen das Zielgen *ADAM17* und das Kontrollgen *HPRT1* eingesetzt. Als Nullkontrolle diente jeweils ein Ansatz, in dem die cDNA durch RNase-freies Wasser ersetzt wurde. Außerdem wurde eine reine Wasserprobe als Negativkontrolle verwendet. Die qRT-PCR wurde im ViiA 7 Real-Time PCR System mit dem in Tabelle 14 beschriebenen Programm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der Ct-Werte (Cycle threshold) (Zyklus bei dem das Signal erstmals exponentiell oberhalb der Hintergrundsignale liegt) die durch die ViiA™ 7 Software errechnet wurden. Zunächst wurde hierfür die Differenz (Δ Ct-Wert) zwischen dem Ziel- und Kontrollgen für jede Probe bestimmt, indem der Ct-Wert des Zielgens (*ADAM17*) vom Ct-Wert des Kontrollgens (*HPRT1*) abgezogen wurde. Die relative Expression des Zielgens errechnete sich aus diesen Werten mit der Formel $rel. Expression = 2^{\Delta Ct}$. Um das Verhältnis der Zielgenexpression zweier Probengruppen zu vergleichen, wurden alle errechneten Werte auf den Median der Kontrollgruppe normiert.

2.2.7 Proteinnachweis

2.2.7.1 Proteinisolation

Um bestimmte Proteine in Zellen nachzuweisen, müssen zunächst die Gesamtproteine einer Probe isoliert werden. Dazu wurden jeweils etwa $1 \cdot 10^7$ PBMC (vgl. Abs. 2.2.1.1) in 150 μ l Lysepuffer (vgl. Tabelle 9) aufgenommen und sofort auf Eis gestellt. Falls die Zellzahl deutlich unter $1 \cdot 10^7$ lag, wurden nur 100 μ l Puffer verwendet. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4 °C wurde die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. Abs. 2.2.7.2).

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine (vgl. Abs. 2.2.7.2) erfolgte mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Dieses basiert auf der Bindefähigkeit von zweiwertigen Kupferionen an Peptidbindungen. Unter alkalischen Bedingungen reduzieren diese Ionen zu ihrer einwertigen Form. Diese bilden mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen Farbkomplex, der bei 560 nm photometrisch gemessen werden kann. Da die Menge des Farbkomplexes proportional zur Proteinkonzentration ist, kann anhand einer Standardreihe mit definierter Konzentration für jede Probe die jeweilige Proteinmenge aus der gemessenen OD errechnet werden.

Für diese Standardreihe wurde BSA in absteigenden 500 µg/ml Schritten, beginnend bei 3000 µg/ml verdünnt in H₂O_{dest.} eingesetzt. Die Proben wurden ebenfalls mit H₂O_{dest.} 1 zu 5 vorverdünnt. Durchgeführt wurde die Konzentrationsbestimmung nach Herstellerangaben für die Variante mit einem Probenvolumen von 10 µl in Zellkulturplatten. Die Messung erfolgte mit dem Infinite® F50 Platten-Lesegerät. Zum Nachweis des Zielproteins in den jeweiligen Proben diente im Anschluss eine SDS-Page mit folgendem Western Blot (vgl. Abs. 2.2.7.3 und 2.2.7.4). Dazu, sowie auch für eine stabile Langzeitlagerung der Proteine bei -20 °C, wurde die gewünschte Proteinmenge (i.d.R. 15 µg) mit 5x Lämmli-Puffer (vgl. Tabelle 9) vermischt, sodass dieser 1x vorlag. Das Endvolumen sollte hierbei dem Taschenvolumen des SDS-Gels (i.d.R. 35 µl) entsprechen und wurde mit H₂O_{dest.} eingestellt. Um die Proteine in diesen Proben zu denaturieren, inkubierten sie 5 min bei 95 °C.

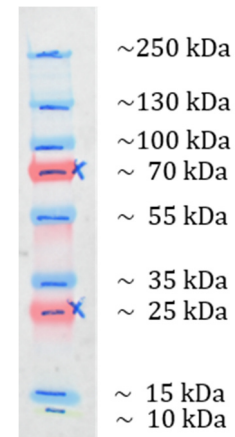
2.2.7.3 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 15: Zusammensetzung des SDS-PAGE Gele

Gele	Zusammensetzung
Trenngel-Stock (10 %)	25 ml 40 % Acrylamid
	25 ml 1,5 M Tris Base pH 8,8
	1 ml 10 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
	20 ml Glycerin
	Ad 100 ml H ₂ O _{dest.}
Trenngel (frisch ansetzen)	10 ml Trenngel-Stock
	12,5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
	25 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Gele	Zusammensetzung
Sammelgel-Stock (5 %)	12,5 ml 40 % Acrylamid
	12,5 ml 1,5 M Tris Base pH 6,8
	1 ml 10 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
	Ad 100 ml H ₂ O _{dest.}
Sammelgel (frisch ansetzten)	5 ml Sammelgel-Stock
	10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
	20 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, bei der denaturierte Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Dazu werden SDS-Gele, bestehend aus einem Trenngel und einem Sammelgel gegossen (vgl. Tabelle 15). Die Gelstärke betrug i.d.R. 1,5 mm und es wurde ein Kamm für 10 Taschen verwendet. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Gele in das Gelelektrophorese-System eingespannt und die Kammer mit 1x Laufpuffer (vgl. Tabelle 9) befüllt. Je Tasche



wurden i.d.R. 35 µl Probe mit einer Proteinkonzentration von 15 µg (vgl. Abs. 2.2.7.2) bzw. 5 µl des Marker PageRuler™ Plus aufgetragen. Das Auftrennungsmuster ist in Abbildung 6

Abbildung 6:
Auftrennungsmuster im
SDS-Gel des PageRuler™
Plus (250 – 10 kDa)

dargestellt. Für die PAGE wurden konstant 100 V angelegt. Um eine möglichst differenzierte Auftrennung der relativ großen Zielproteine zu erreichen, wurde die PAGE erst gestoppt, als die erste rote Markerbande aus dem Gel herauslief. Nach dem Lauf wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und letzteres für einen Western Blot (vgl. Abs. 2.2.7.4) verwendet.

2.2.7.4 Western Blot

Zum Nachweis bestimmter Proteine werden diese im Anschluss an die Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht in der SDS-PAGE (vgl. Abs. 2.2.7.3) mittels Western Blot von dem SDS-Gel auf eine Membran übertragen. Dort können diese mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, welche gegen die Zielproteine gerichtet sind, detektiert werden. Der Blot erfolgte durch nassen Elektrotransfer.

Hierfür wurde das Trenngel zusammen mit einer gleich großen Membran in das Blot-System eingespannt und die Kammer mit 1x Blotpuffer (vgl. Tabelle 9) gefüllt. Geblottet wurde für eine Stunde bei konstanten 300 mA. Nach der Lufttrocknung und einstündiger Absättigung in 5 % Magermilchpulver in TBST (vgl. Tabelle 9) der Membran auf dem Kombischüttler, inkubierte sie über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer in Antikörpergrundlösung. Dazu wurde der Antikörper gegen das Zielprotein (vgl. Tabelle 6) 1:1000 mit 5 % Magermilchpulver in TBST gemischt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBST für je 5 Minuten auf dem Rollenmischer gewaschen. Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dieser war gegen den ersten Antikörper gerichtet und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt (vgl. Tabelle 6). Er wurde 1:2000 in 5 % Magermilchpulver in TBST verdünnt. Nach drei weiteren Waschschritten (5 min mit TBST auf dem Rollenmischer) entwickelte der Blot 5 Minuten auf dem Rollenmischer mit dem SuperSignal™ West Dura Substrat. Die Membran wurde mit dem Fusion FX Chemi-, Biolumineszenz und UV Fluoreszenz Bildgebungssystem fotografiert und gleichzeitig die einzelnen Signalstärken densitometrisch gemessen.

Um ein weiteres Kontrollprotein auf derselben Membran zu detektieren, wurden die bereits spezifisch gebundenen Antikörper abgelöst. Dazu inkubierte die Membran nach einem 5-minütigen Waschschriff in TBST auf dem Rollenmischer für 20 bis 30 Minuten in Roti®-Free Stripping-Puffer 2.2 plus auf dem Kombischüttler. Nach einem weiteren Waschschriff (5 min mit TBST auf dem Kombischüttler) und einer erneuten 30-minütigen Absättigung in 5 % Magermilchpulver in TBST auf dem Kombischüttler, folgte die Bindung des Erstantikörpers gegen das Kontrollprotein wie oben für das Zielprotein beschrieben. Da der verwendete anti- β -Aktin Antikörper bereits mit HRP gekoppelt ist (vgl. Tabelle 6), konnte hier auf einen Sekundärantikörper verzichtet werden und direkt wie oben beschrieben der Blot entwickelt und das Signal detektiert werden.

2.2.7.4.1 Quantitative Auswertung des Western Blot

Damit eine quantitative Auswertung der gemessenen Signale (vgl. Abs. 2.2.7.4) möglich war, musste zunächst der lineare Zusammenhang zwischen der aufgetragenen Proteinmenge und der Signalstärke für das Kontrollprotein nachgewiesen werden. Dazu wurden die Gesamtproteine aus einer PBMC-Probe isoliert (vgl. Abs. 2.2.7.1). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Proben mit absteigender Proteinkonzentration, beginnend bei 50 μ g und sich dann stets halbierend wie in Abschnitt 2.2.7.2 beschrieben angesetzt. Diese wurden für eine SDS-Page mit nachfolgendem Western Blot (vgl. Abs. 2.2.7.3 und

2.2.7.4) eingesetzt, wobei nur das Kontrollprotein β -Aktin detektiert wurde. Der Blot, sowie der lineare Zusammenhang sind in Abbildung 7 dargestellt.

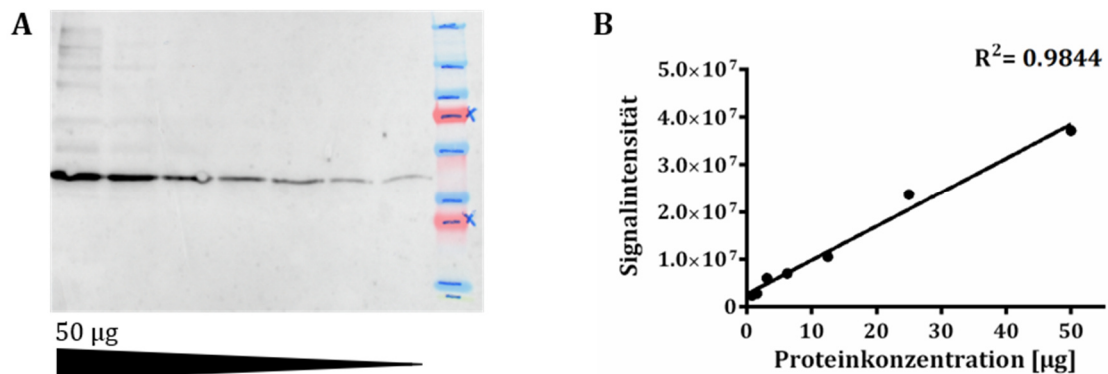


Abbildung 7: Testung des linearen Zusammenhangs der aufgetragenen Proteinkonzentration und der Signalstärke im Western Blot. Dargestellt ist in A) ein β -Aktin Western Blot mit absteigend aufgetragener Proteinkonzentration beginnend bei 50 μg und in B) die für die einzelnen Banden ermittelte Signalintensität aufgetragen gegen die Proteinkonzentration [μg]

Somit können alle Signale eines Zielproteins bei einem Western Blot, bei dem zwischen 50 und 0,78125 μg Protein aus PBMC aufgetragen, sowie β -Aktin als Kontrollprotein eingesetzt wurde, mit folgenden Formeln auf das Kontrollprotein normalisiert werden [158]:

$$\text{Linien NF} = \frac{\text{Signal KP}_{\text{Linie}}}{\text{Stärkste Signal KP}_{\text{Blot}}} \quad \text{Normalisiertes Signal ZP} = \frac{\text{Signal ZP}_{\text{Linie}}}{\text{Linien NF}}$$

Formel 2: Normalisierung der Zielproteinsignale eines Western Blots anhand der Signale eines Kontrollproteins; NF = Normalisierungsfaktor; KP = Kontrollprotein; ZP = Zielprotein

2.2.8 Statistische Auswertung

Für die Erstellung von Graphen, sowie die statistische Analyse der Versuchsergebnisse, wie die Berechnung von Medianen und Standardabweichungen, wurde die Software GraphPad 6.01 verwendet. Zur Berechnung der signifikanten Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Versuchsgruppen diente der Mann-Whitney-Test und bei mehreren Gruppen der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test als Post hoc Test. Hierbei wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ (*) als knapp signifikant, ein p-Wert $\leq 0,01$ (**) als signifikant, ein p-Wert $\leq 0,001$ (***) als hoch signifikant und ein p-Wert $\leq 0,0001$ (****) als extrem signifikant eingestuft. Dargestellt wurden die Ergebnisse i.d.R. als Streudiagramm mit Median.

3. Ergebnisse

3.1 Anti-TNF Therapie in der AIH

Für einige Fälle mit schwer zu behandelnder AIH ist eine erfolgreiche Therapie außerhalb des eigentlichen Zulassungsbereichs mit dem therapeutisch genutzten monoklonalen anti-TNF Antikörper Infliximab beschrieben [64-66]. Um besser zu verstehen, inwieweit die Behandlung mit diesem anti-TNF Antikörper Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung nimmt, wurde die Zytokinproduktion sowie klinische Parameter einer Patientin mit dieser Erkrankung, vor und nach Beginn einer Infliximab-Therapie über einen Gesamtzeitraum von etwa 3 ½ Jahren beobachtet (vgl. Abs. 3.1.1). Der Fokus lag hierbei neben der Bestimmung der Produktion von TNF auch auf den Zytokinen IFN γ und IL-17, da für diese eine Rolle in der Pathogenese der AIH vermutet wird [47, 49, 54]. Um genauer zu untersuchen, inwieweit die anti-TNF Therapie die Zytokinausschüttung beeinflusst, wurden außerdem PBMC unter Stimulationsbedingungen *in vitro* mit dem Medikament behandelt (vgl. Abs. 3.1.2). Hierbei wurde zusammen mit TNF und IFN γ auch die Produktion von IL-2, welches autokrin T-Zellen aktiviert, bestimmt [131].

3.1.1 Zytokinproduktion und klinischer Verlauf unter Infliximab-Therapie

Die TNF, IFN γ und IL-17A Produktion, sowie klinische Parameter (vgl. Abbildung 8) wurden von einer heute 57-jährigen Patientin über einen Zeitraum von etwa 3 ½ Jahren erhoben. Bei ihr wurde vor mehr als 20 Jahren eine AIH diagnostiziert und seither mit einer Kombinationstherapie aus Azathioprin und Prednisolon therapiert. Trotz dieser Behandlung war keine Vollremission zu erzielen, tatsächlich stiegen ihre γ -Globulin- und IgG-Werte vor Initiierung der Drittlinientherapie deutlich an (von 18,5 auf 20,5 % bzw. 10,4 auf 12,8 g/l) (vgl. Abbildung 8 F). Auch bei der Messung der Leberelastizität nahm die Lebersteifigkeit in diesem Zeitraum stark zu (von 22,3 auf maximal 42,2 kPa), welches auf eine zunehmende Fibrosierung des Lebergewebes hindeutet [159]. Im gleichen Zeitraum zeigten sich Hinweise auf eine Abnahme der Lebersynthese, ausgedrückt durch eine Zunahme der International Normalized Ratio (INR) von 1,14 auf 1,2 (Referenzbereich 0,9 – 1,2) (vgl. Abbildung 8 G). Bei diesem Wert handelt es sich um einen globalen Parameter zur Messung der Blutgerinnung, der aber insbesondere hepatisch synthetisierte Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren abbildet [160, 161]. Aufgrund dieser Verschlechterung des Therapieansprechens, sowie der konstant oberhalb der Normalwerte für Frauen von 35 IU/l liegenden AST-Werte und der meist oberhalb dieser Grenze liegenden ALT-Werte (vgl.

Abbildung 8 E), wurde nach einer interdisziplinären Fallbesprechung und ausführlichen Aufklärung der Patientin mit einer Therapie außerhalb des eigentlichen Zulassungsbereichs mit dem anti-TNF Medikament Infliximab als individuellen Heilversuch begonnen.

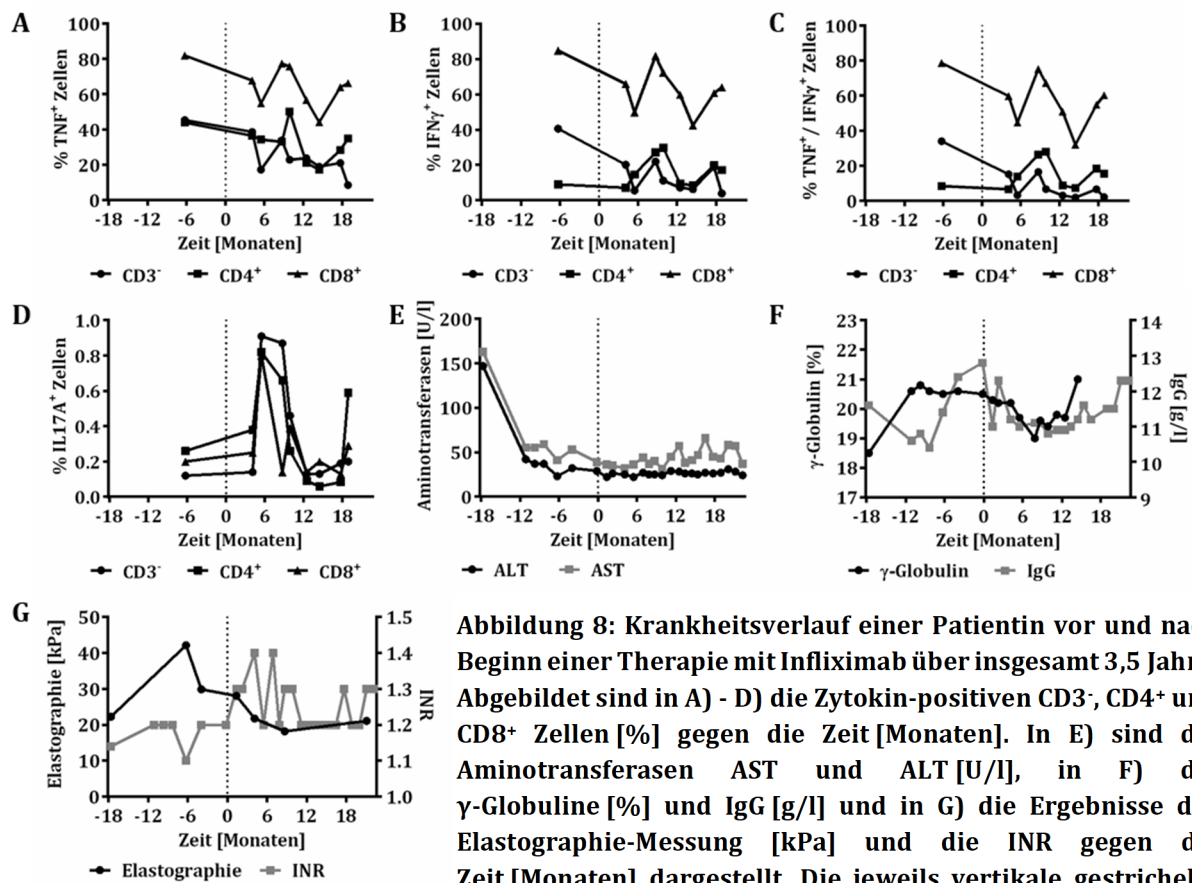


Abbildung 8: Krankheitsverlauf einer Patientin vor und nach Beginn einer Therapie mit Infliximab über insgesamt 3,5 Jahre. Abgebildet sind in A) - D) die Zytokin-positiven CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen [%] gegen die Zeit [Monaten]. In E) sind die Aminotransferasen AST und ALT [U/l], in F) die γ -Globuline [%] und IgG [g/l] und in G) die Ergebnisse der Elastographie-Messung [kPa] und die INR gegen die Zeit [Monaten] dargestellt. Die jeweils vertikale gestrichelte Linie symbolisiert den Therapiebeginn [t = 0]

Nach Beginn der Therapie verbesserten sich binnen eines Jahres sowohl die γ -Globulin- und IgG-Werte auf ein Minimum von 19 % bzw. 10,8 g/l, als auch die Elastizität der Leber auf 18,2 kPa. Auch der Spiegel der Aminotransferasen im Blut normalisierte sich in dieser Zeit. Hierbei lag der ALT-Wert konstant unterhalb der Grenze von 35 IU/l, der AST-Wert hingegen aber meist knapp oberhalb. Im letzten halben Jahr des Untersuchungszeitraums verschlechterten sich allerdings alle Parameter erneut (vgl. Abbildung 8 E - G).

Parallel zum klinischen Verlauf wurden stichprobenhaft auch PBMC aus dem Blut der Patientin isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion der Zytokine TNF, IFN γ und IL-17A durch CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen analysiert (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2). In Korrelation zu den klinischen Werten nahm der prozentuale Anteil der für diese Zytokine positive Zellen aller drei Subpopulationen im ersten Jahr nach Therapiebeginn ab. So waren noch vor Beginn 45,3 % der CD3⁺, 43,9 % der CD4⁺ und 81,9 % der CD8⁺ Zellen positiv für TNF, nach einem Jahr hingegen nur noch 23,7 % bzw. 21 % oder 56,7 % der

jeweiligen Zellen TNF-positiv (vgl. Abbildung 8 A). Die IFN γ Produktion ist in Abbildung 8 B dargestellt. Ebenso wie die TNF Produktion nahm diese im Vergleich zu den Werten vor dem Start der anti-TNF Behandlung binnen eines Jahres von 40,5 % auf 7,15 % (CD3 $^{-}$) und 84,8 % auf 59,8 % (CD8 $^{+}$) ab, während sie bei den CD4 $^{+}$ T-Zellen in etwa konstant blieben (8,98 % bzw. 9,49 %). Der prozentuale Anteil der TNF / IFN γ -doppelt-positiven Zellen war vergleichbar mit der Produktion der jeweils einzelnen Zytokine (vgl. Abbildung 8 C) und zeigte sich ebenfalls rückläufig. Der Anteil an IL-17A produzierenden Zellen war über den gesamten Untersuchungszeitraum in allen drei Zellgruppen vernachlässigbar gering (zwischen 0,059 und 0,91 %), wobei die Schwankung vergleichbar zu den anderen beiden Zytokine war (vgl. Abbildung 8 D). Für alle Zytokine gab es einen kurzen, vorübergehenden Anstieg der Produktion in allen Zellen zwischen dem 6. und 10. Monat nach Beginn der Infliximab Therapie, was sich aber nicht im Krankheitsverlauf widerspiegelte. Hingegen stiegen die Werte, genau wie die klinischen Parameter, ab etwa einem Jahr nach Behandlungsstart erneut an (vgl. Abbildung 8 A - D). Um den Einfluss der Therapie mit Infliximab auf die Zytokinproduktion genauer zu betrachten, wurden im folgenden PBMC unter Stimulationsbedingungen *in vitro* mit dem humanisierten monoklonalen anti-TNF Antikörper behandelt (vgl. Abs. 3.1.2).

3.1.2 *In vitro* Behandlung von PBMC mit Infliximab

In Anlehnung an die Therapie im Menschen mit 3 - 5 mg/kg Körpergewicht wurden exemplarisch PBMC von 3 gesunden Kontrollen mit 2,5 ng/ml Infliximab *in vitro* behandelt (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.3). Hierbei sollte der Einfluss des Medikaments auf die TNF, IFN γ und IL-2 Produktion untersucht werden. Um diese anzuregen, wurden die Zellen gleichzeitig mit 16 ng/ml PMA und 1,6 μ g/ml Ionomycin unspezifisch stimuliert.

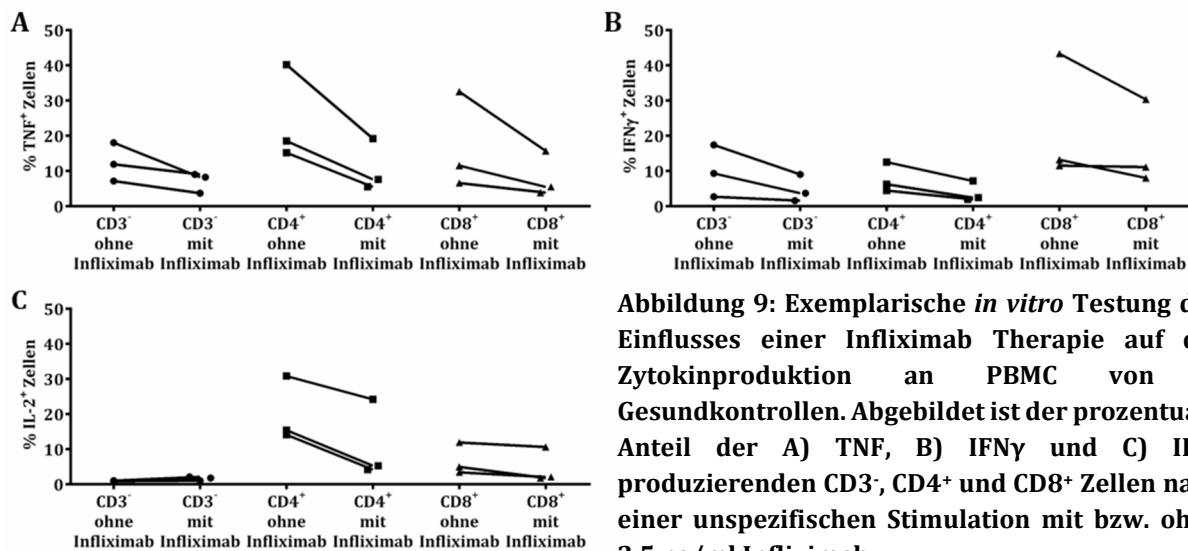


Abbildung 9: Exemplarische *in vitro* Testung des Einflusses einer Infliximab Therapie auf die Zytokinproduktion an PBMC von 3 Gesundkontrollen. Abgebildet ist der prozentuale Anteil der A) TNF, B) IFN γ und C) IL-2 produzierenden CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nach einer unspezifischen Stimulation mit bzw. ohne 2,5 ng/ml Infliximab

Für alle drei Zytokine wurde erwartungsgemäß eine Verringerung der Produktion durch die Gabe von Infliximab deutlich (vgl. Abbildung 9). So waren unter Medikamenteneinfluss im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nur noch etwa halb so viele Zellen aller untersuchten Subpopulationen (CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺) TNF- und IFN γ -positiv (vgl. Abbildung 9 A und B). Bei IL-2 hingegen waren die Unterschiede in der Produktion zwischen den beiden Gruppen bei den CD3⁺ und CD8⁺ Zellen deutlich geringer, wobei gleichzeitig der Anteil an IL-2-positiven CD3⁺ Zellen erwartungsgemäß vernachlässigbar gering war. In den CD4⁺ Lymphozyten wiederum war eine ähnlich verminderte Produktion dieses Zytokins wie für TNF und IFN γ erkennbar (vgl. Abbildung 9 C).

3.2 Zytokinproduktion durch CD4⁺ T-Zellen in AIH Patienten

Neben der Untersuchung zum besseren Verständnis der Wirkungsweise einer anti-TNF Therapie in der AIH (vgl. Abs. 3.1), sollten auch die CD4⁺ T-Zellen näher charakterisiert werden, die mutmaßlich in der Pathogenese der Krankheit eine besondere Rolle spielen. Darauf deutet nicht nur hin, dass diese Zellen die größte Subpopulation im intrahepatischen Entzündungszellinfiltrat ausmachen [33-35], sondern auch die Tatsache, dass die AIH sehr eng mit der Expression von bestimmten MHC-II Haplotypen assoziiert ist, welche mit CD4⁺ T-Zellen interagieren [20-26]. Des Weiteren sind zwei der bekannten Autoantigen-Epitope in der AIH CD4-restringiert [39-41].

Zur Charakterisierung wurde die Zytokinproduktion dieser Zellen im Blut (vgl. Abs. 3.2.1), sowie in der Leber (vgl. Abs. 3.2.2) von Patienten und Kontrollpersonen analysiert. Hierbei lag zunächst der Fokus auf TNF, da sich eine Therapie außerhalb des eigentlichen

Zulassungsbereichs mit dem anti-TNF Medikament Infliximab bei schwer zu behandelnden Patienten als wirksam erwies (vgl. Abs. 3.1) [64-66]. Neben der TNF Produktion wurde zusätzlich die Produktion von IFN γ , IL-17A und IL-2 untersucht, da diese Zytokine ebenfalls mit der Pathogenese der AIH in Verbindung gebracht werden und in einer vorangegangenen Arbeit einer Kollegin eine erhöhte Genexpression in LIL von AIH Patienten im Vergleich zu Kontrollen gezeigt wurde [47, 49, 53-55].

3.2.1 TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 produzierende CD4⁺ T-Zellen in PBMC

Um Unterschiede in der TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen im Blut von AIH Patienten und Gesundkontrollen festzustellen, wurden unspezifisch stimulierte PBMC von 9 bzw. 11 Patienten und 9 Kontrollen durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2).

In Abbildung 10 A ist die repräsentative TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit AIH und Gesundkontrollen exemplarisch dargestellt. Insgesamt wurde TNF durch CD4⁺ T-Zellen im Blut beider Untersuchungsgruppen mit einem medianen Anteil von 64,3 % bei AIH Patienten bzw. 41,8 % bei Gesunden im Vergleich zu den anderen untersuchten Zytokinen am stärksten produziert. Dabei war der prozentuale Anteil an TNF-positiven CD4⁺ T-Zellen im Blut von AIH Patienten, verglichen mit denen im Blut gesunder Personen, signifikant ($p = 0,0012$) erhöht (vgl. Abbildung 10 B). Auch der Anteil an IFN γ bzw. IL-2 produzierenden Zellen war bei Erkrankten signifikant ($p = 0,0244$ bzw. $0,0309$) höher (vgl. Abbildung 10 C und E). Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied zwischen den Patienten und den gesunden Probanden hinsichtlich der IL-17A Produktion festgestellt werden. Insgesamt lag diese mit einem Median von 0,5 bzw. 0,35 %, deutlich unterhalb der Produktion der anderen getesteten Zytokine (vgl. Abbildung 10 D).

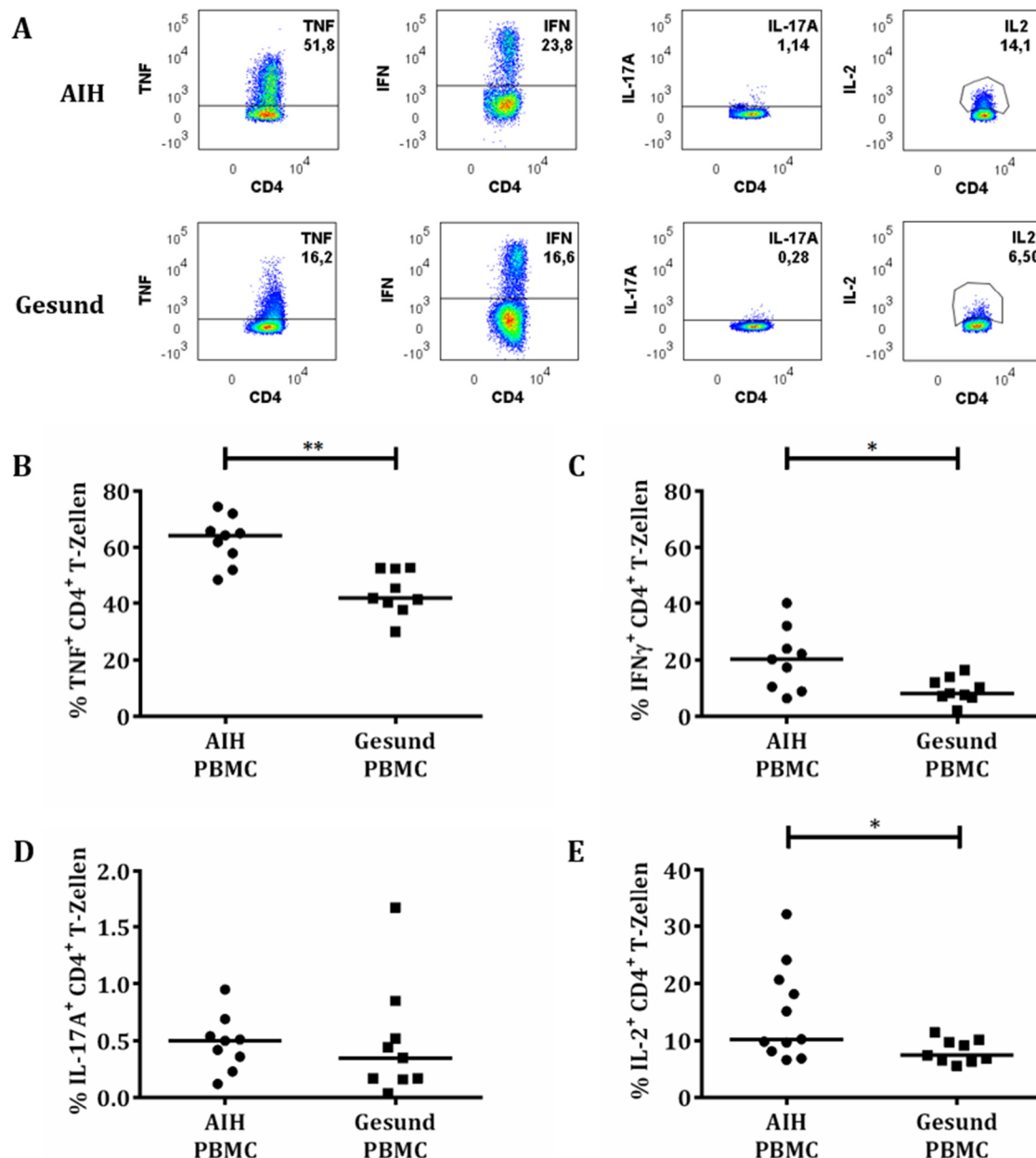


Abbildung 10: TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 produzierende CD4⁺ T-Zellen im Blut von AIH Patienten und Gesunden. In A) ist exemplarisch die Zytokinproduktion durch CD4⁺ Zellen von repräsentativen AIH Patienten bzw. Gesunden dargestellt. Die Anzahl der B) TNF-, C) IFN γ -, D) IL-17A- und E) IL-2-positiven CD4⁺ Zellen ist in % dargestellt. (Median aus B) - D) n = 9; E) n = 11 bzw. 9; * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01)

3.2.2 Produktion von TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 durch LIL

Da es sich bei der AIH um eine Lebererkrankung handelt, die mit einem Entzündungszellinfiltrat in diesem Organ einhergeht, sollten neben den Blutzellen (vgl. Abs. 3.2.1) ebenfalls die leberinfiltrierenden Lymphozyten auf ihre TNF, IFN γ , IL-2 und IL-17A Produktion untersucht werden. Insgesamt wurden jeweils LIL aus 6 Biopsien (TNF, IFN γ , IL-17A) bzw. 4 Biopsien (IL-2) von AIH Patienten, sowie 7 Biopsien (TNF, IFN γ , IL-17A) bzw. 8 Biopsien (IL-2) von Kontrollpersonen (Fettlebererkrankung bzw. Tumorrangewebe)

nach einer unspezifischen Stimulation per Durchflusszytometrie auf ihre jeweilige Zytokinproduktion analysiert (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2).

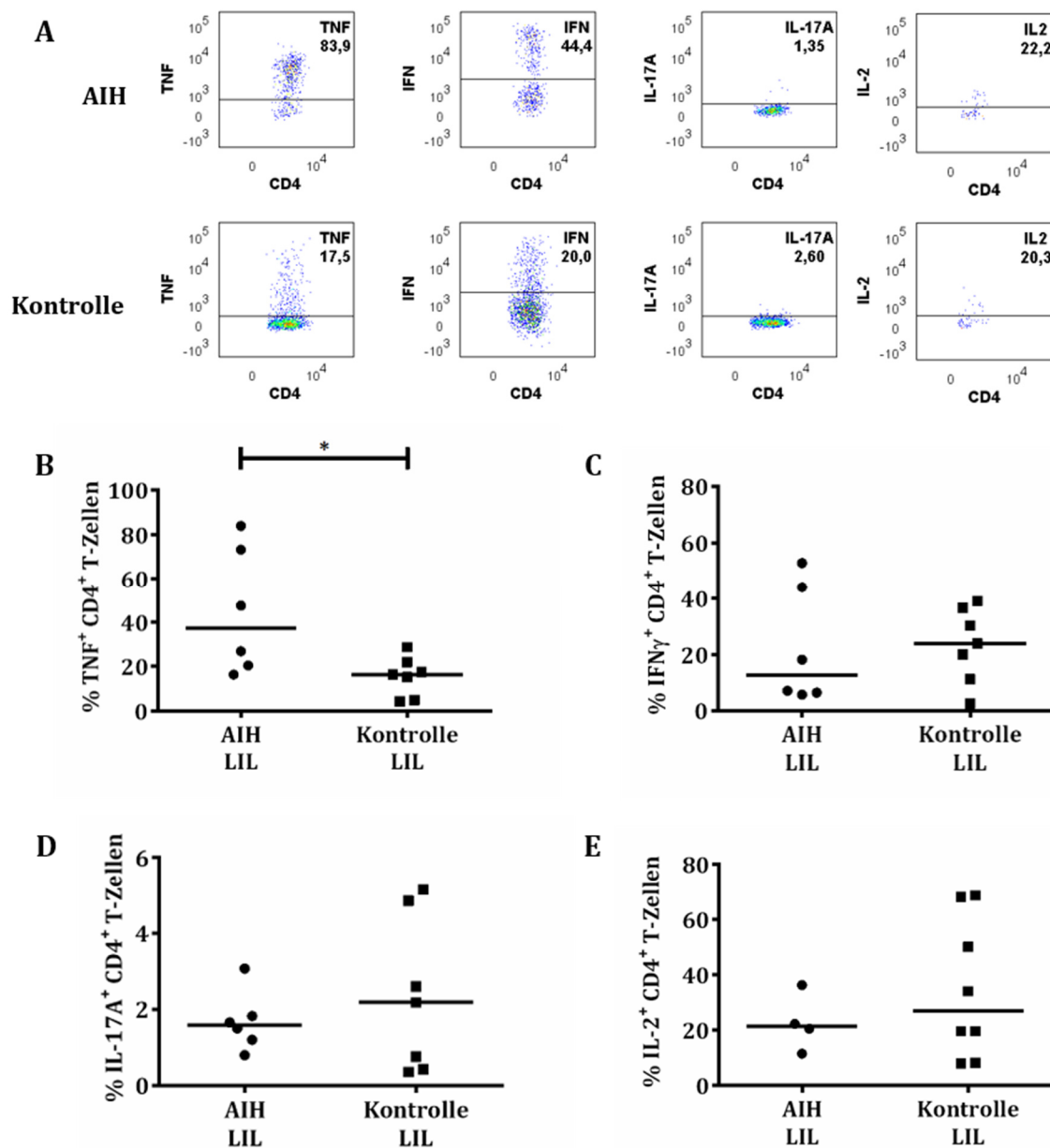


Abbildung 11: Produktion von TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 durch CD4⁺ T-Zellen in der Leber. A) zeigt die Zytokinproduktion durch CD4⁺ Zellen exemplarisch an repräsentativen AIH Patienten bzw. Kontrollen mit einer Fettlebererkrankung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der B) TNF-, C) IFN γ -, D) IL-17A- und E) IL-2-positiven CD4⁺ Zellen (Median aus B) - D) n = 6 bzw. 7; E) n = 4 bzw. 8; * p \leq 0,05)

Die repräsentative TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen der Leber von Patienten mit AIH und Kontrollpersonen mit einer Fettlebererkrankung ist exemplarisch in Abbildung 11 A dargestellt. In Analogie zu den Ergebnissen aus PBMC (vgl. Abs. 3.2.1), wurde auch durch die CD4⁺ T-Zellen in der Leber TNF im Vergleich zu den anderen untersuchten Zytokinen am stärksten produziert (Median: 37,25 bzw. 16,4 %).

Hierbei war der Anteil in den Zellen der AIH Patienten erneut signifikant höher als in denen der Kontrollgruppe ($p = 0,0385$) (vgl. Abbildung 11 B). In den LIL war die IL-17A Produktion ebenso wie im Blut mit einem Median von 1,575 bzw. 2,180 % vernachlässigbar gering und unterschied sich nicht zwischen den AIH Patienten und den Kontrollen (vgl. Abbildung 11 D). Anders als im Blut gab es in der Leber keine signifikanten Unterschiede in der Produktion von IFN γ und IL-2 zwischen den beiden Untersuchungsgruppen ($p = 0,7984$ bzw. $0,8990$) (vgl. Abbildung 11 C und E). Zusammenfassend schien TNF in den CD4 $^{+}$ T-Zellen in der Leber, aber auch im Blut von Patienten mit einer AIH eine relevante Rolle zu spielen.

3.2.3 RNAscope® - TNF Expression in der Leber

In der AIH machen die CD4 $^{+}$ T-Zellen die größte Subpopulation im intrahepatischen Zellinfiltrat am Ort der Inflammation aus [33-35]. Um die durchflusszytometrisch gefundene Produktion von TNF durch LIL zu überprüfen (vgl. Abs. 3.2.2), wurde eine *in situ* Hybridisierung mittels RNAscope® exemplarisch an einer Leberbiopsie einer Patientin mit neu diagnostizierter AIH durchgeführt (vgl. Abs. 2.2.6.1).

In Abbildung 12 ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Portalfeldes in 20x (A) und 40x (B) Vergrößerung dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass vor allem die Zellen rund um dieses Portalfeld innerhalb des Entzündungsbereiches TNF-RNA (blau-grünes Signal) exprimierten, aber auch innerhalb des Leberparenchyms waren TNF-positive Zellen präsent. Bei vielen dieser TNF-exprimierenden Zellen handelte es sich um CD4 $^{+}$ T-Zellen, da diese zusätzlich das rote Signal für CD4-RNA zeigten. Darüber hinaus war erkennbar, dass zahlreiche Zellen TNF exprimierten, bei denen es sich nicht um CD4 $^{+}$ T-Zellen handelte. Hingegen waren fast keine CD4 $^{+}$ T-Zellen präsent, die nicht TNF Produzenten waren.

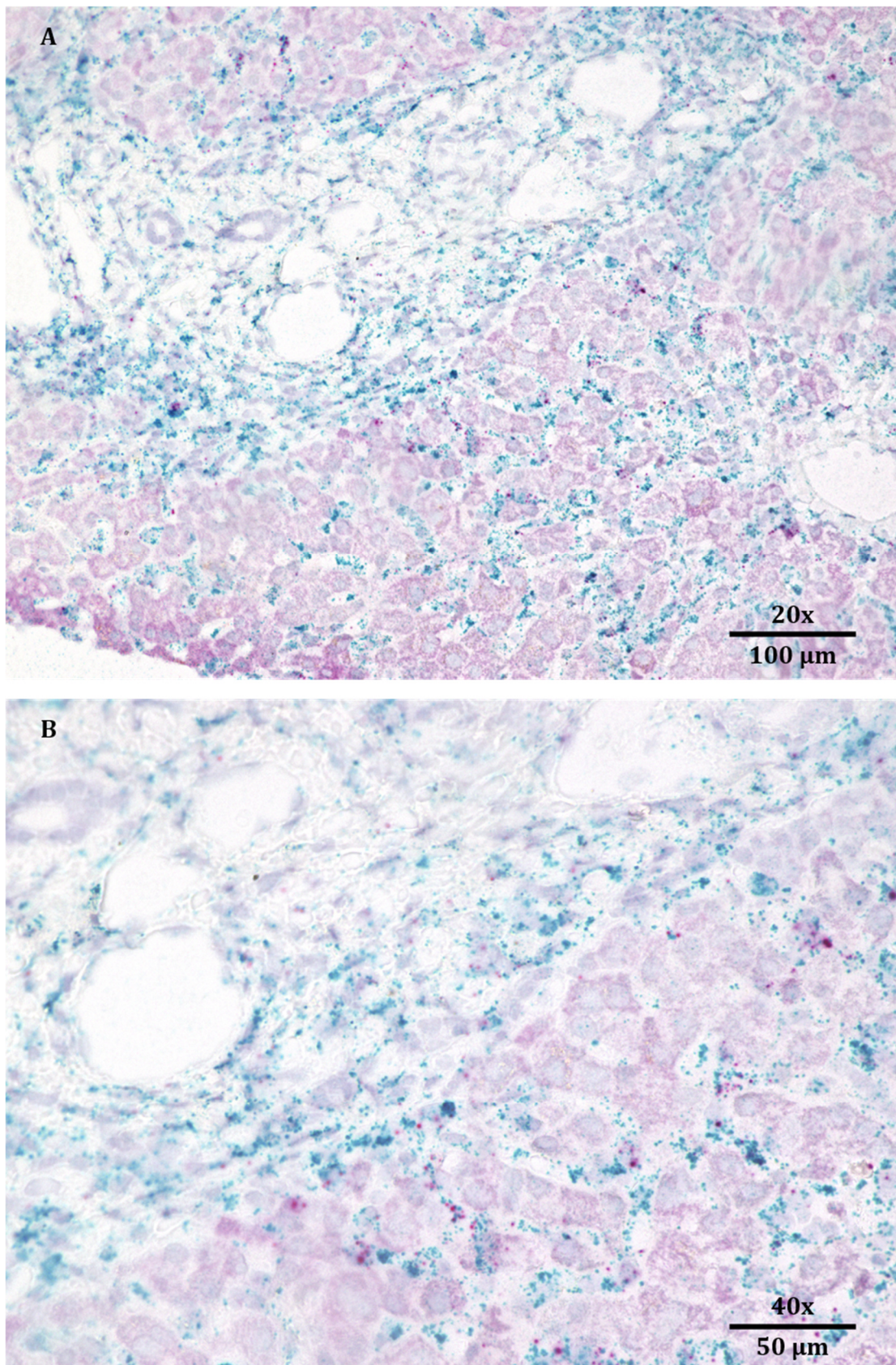


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme eines RNAscops® an einer Leberbiopsie einer exemplarischen Patientin mit AIH. Dargestellt ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Entzündungsherds um eine Portalfeld in A) 20x Vergrößerung (Maßstab: 100 µm) und B) 40x Vergrößerung (Maßstab: 50 µm). Die roten Signale entsprechen der Sonde 1 gegen CD4-RNA und die blau-grünen der Sonde 2 gegen TNF-RNA. Hintergrundfärbung: Hämalaun

3.2.4 Koproduktion von TNF und IFN γ

Neben IFN γ ist auch TNF ein Zytokin, welches von Th1 Zellen, einer Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen, produziert wird [82]. TNF / IFN γ -doppelt-positive T-Zellen sind hochfunktionale, aktivierte Zellen, für die eine zentrale Rolle in der Pathogenabwehr beschrieben ist [162-164]. Da die CD4⁺ T-Zellen im Blut von AIH Patienten neben TNF ebenfalls vermehrt IFN γ produzierten (vgl. Abs. 3.2.1) und durch eine Kollegin in einer vorangegangenen Arbeit eine gesteigerte Genexpression für dieses Zytokin gezeigt werden konnte [55], wurde die Koproduktion von TNF und IFN γ ebenfalls untersucht. Dazu wurden unspezifisch stimulierte PBMC von je 9 Patienten und Gesundkontrollen, sowie LIL aus 7 Leberbiopsien von AIH Patienten und 5 Biopsien von Kontrollpersonen (Fettlebererkrankung bzw. Tumorrandgewebe) durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2).

Abbildung 13 A und B zeigen exemplarisch die TNF / IFN γ Koproduktion durch CD4⁺ T-Zellen im Blut bzw. der Leber von repräsentativen AIH Patienten und Kontrollpersonen, sowie jeweils die TNF Produktion durch IFN γ -positiven CD4⁺ T-Zellen bzw. die IFN γ Produktion durch TNF-positiven CD4⁺ T-Zellen. Sowohl im Blut als auch in der Leber waren bei den AIH Patienten signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen doppelt positiv für TNF und IFN γ als in den Kontrollen ($p = 0,0244$ bzw. $0,0480$). Gleichzeitig war der prozentuale Anteil dieser Zellen mit einem Median von 38,8 % in der Leber von AIH Patienten fast doppelt so hoch, wie der im Blut (Median: 18,8 %) (vgl. Abbildung 13 C und D). Dies deutete darauf hin, dass es sich bei den TNF Produzenten um Th1 Zellen handelte, welche vermehrt TNF produzierten.

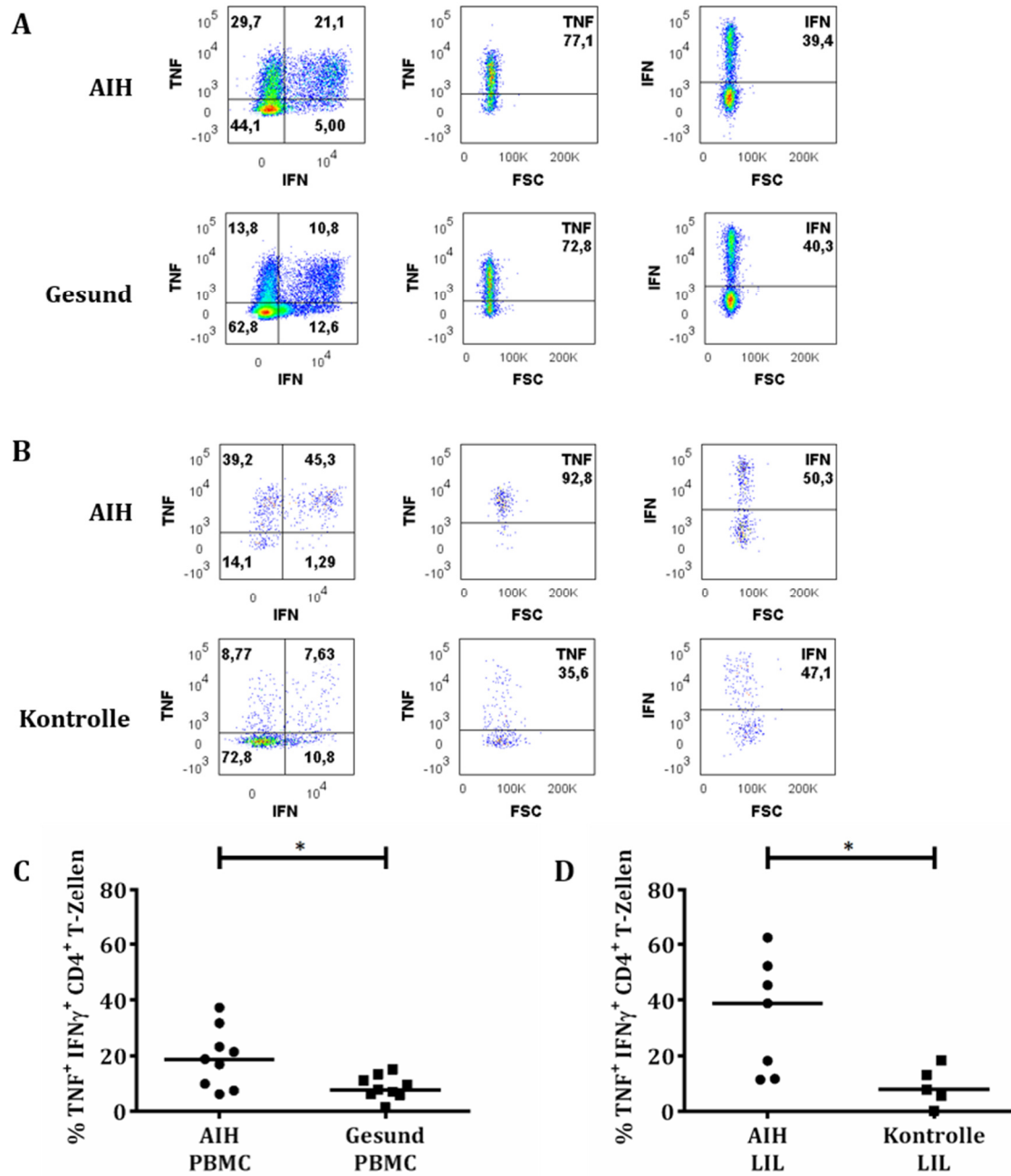


Abbildung 13: TNF und IFN γ Koproduktion durch CD4 $^{+}$ T-Zellen im Blut und der Leber von AIH Patienten und Gesundkontrollen. Exemplarisch sind die TNF / IFN γ -doppelt-positiven CD4 $^{+}$ Zellen, sowie die TNF Produktion durch IFN γ -positive bzw. die IFN γ Produktion durch TNF-positive CD4 $^{+}$ Zellen A) im Blut und B) in der Leber von repräsentativen AIH Patienten bzw. Kontrollpersonen dargestellt. C) zeigt den prozentualen Anteil der TNF / IFN γ -doppelt-positiven CD4 $^{+}$ Zellen im Blut und D) in der Leber. (Median aus C) n = 9; D) n = 7 bzw. 5; * p \leq 0,05)

3.3 Produktion von Liganden der TNF Superfamilie durch CD4⁺ T-Zellen in AIH Patienten

Die Analyse der Zytokinproduktion durch CD4⁺ T-Zellen zeigte in AIH Patienten einen deutlich erhöhten Anteil an TNF-positiven Zellen (vgl. Abs. 3.2). Da TNF das namensgebende Zytokin der TNF Superfamilie ist, sollte überprüft werden, ob neben TNF noch andere Liganden dieser Superfamilie in der AIH von CD4⁺ T-Zellen verstärkt produziert werden. Dazu sollte exemplarisch die Produktion von FasL (CD178) und RANKL (CD254) untersucht werden [103]. Analysiert wurden hierzu mittels Durchflusszytometrie unspezifisch stimulierte PBMC von 12 AIH Patienten und 10 Gesundkontrollen (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2).

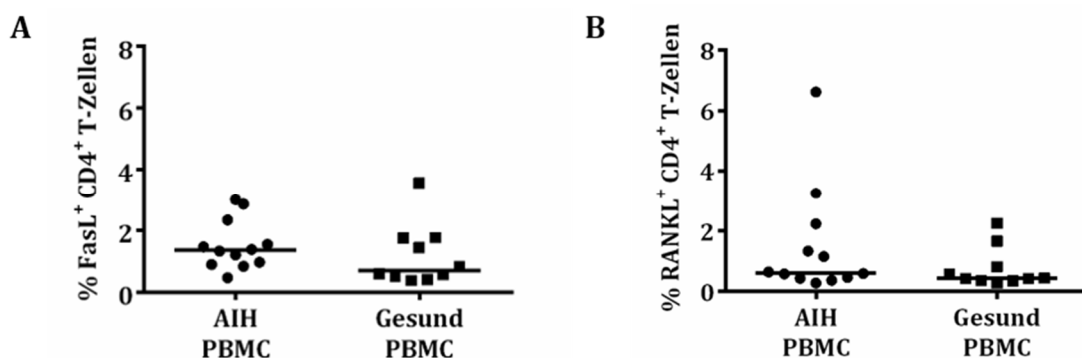


Abbildung 14: Produktion von FasL und RANKL durch CD4⁺ T-Zellen im Blut. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der A) FasL- und B) RANKL-positiven Zellen (Median aus n = 12 bzw. 10)

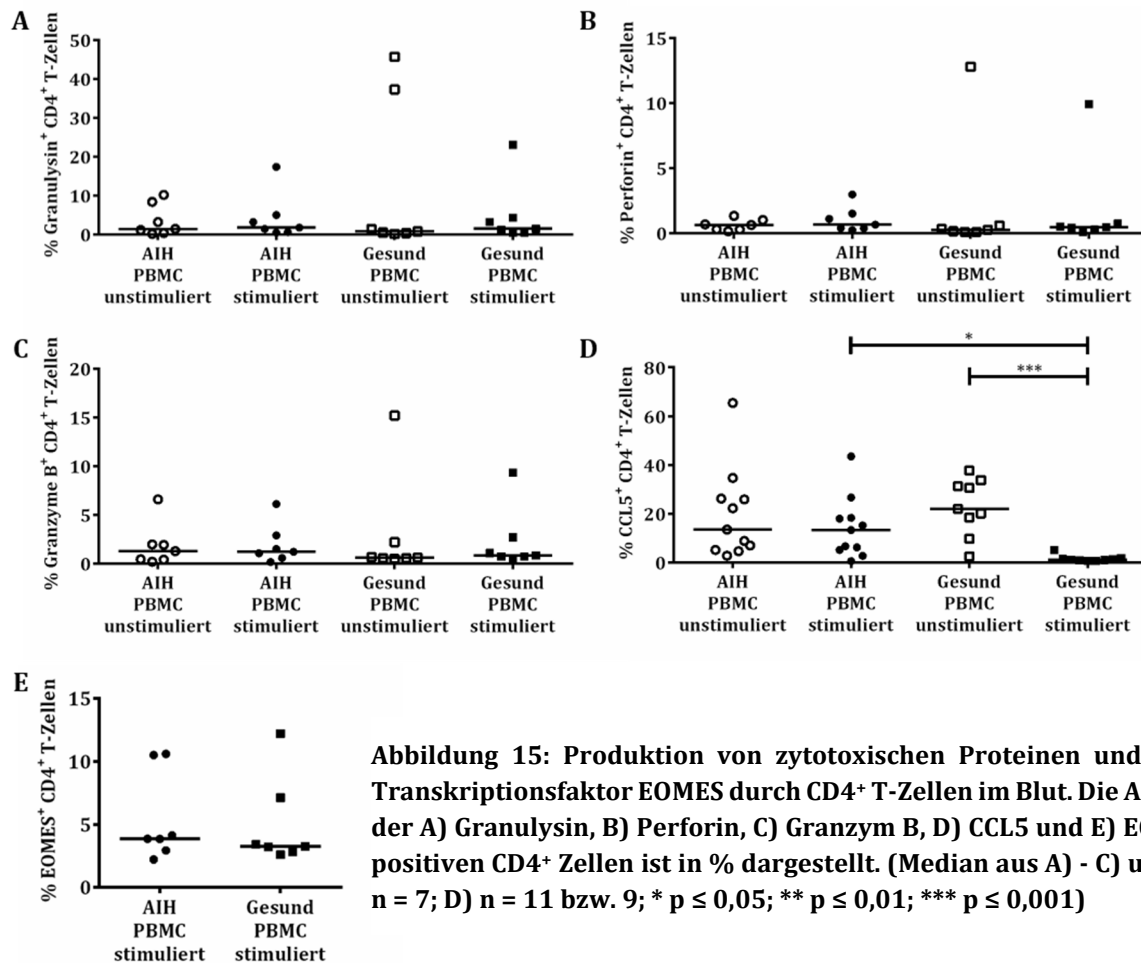
FasL und RANKL wurden beide nur im geringen Maße von CD4⁺ T-Zellen produziert, wie die Mediane von 1,355 bzw. 0,71 % und 0,615 bzw. 0,435 % verdeutlichen. Gleichzeitig unterschied sich der jeweilige prozentuale Anteil der FasL- bzw. RANKL-positiven Zellen nicht signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p = 0,2238$ bzw. $0,2083$) (vgl. Abbildung 14). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch ein APRIL und BAFF ELISA. Auch für diese beiden Liganden der TNF-Superfamilie zeigten sich nur sehr geringe Mengen im Serum, die sich jeweils zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen nicht unterschied (ohne Abbildung). Zusammengefasst deutet dies nicht auf eine generell gesteigerte Produktion von Liganden der TNF Superfamilie hin.

3.4 Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften von Lymphozyten in AIH Patienten

Ein qRT-PCR basiertes Testverfahren einer Kollegin zeigte neben der verstärkten *TNF* und *IFNG* Expression in LIL von AIH Patienten außerdem eine veränderte Genexpression für verschiedene zytotoxische Proteine [unveröffentlichte Daten]. Zur Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften der Lymphozyten sollte daher zunächst die Produktion der zytotoxischen Moleküle Granulysin, Perforin und Granzym B im Blut von AIH Patienten und gesunden Probanden bestimmt werden [88]. Zusätzlich sollte die Produktion von CCL5, einem Chemokin, welches ebenfalls von zytotoxischen T-Zellen sezerniert wird, untersucht werden [145]. Da es sich bei den zytotoxischen T-Zellen klassischerweise um CD8⁺ Lymphozyten handelt, aber auch CD4⁺ T-Zellen einen zytotoxischen Phänotyp annehmen können [97], sollte die Produktion dieser Proteine in beiden T-Zellgruppen analysiert werden (vgl. Abs. 3.4.1 und 3.4.2). Weiterhin sollte die Produktion des Transkriptionsfaktors EOMES untersucht werden, der an der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen beteiligt ist [95]. Ein Fokus lag außerdem auf diesem Transkriptionsfaktor, da er auch an der Kontrolle der *IFNG* Expression in bestimmten pathogenen Th1 Zellen, sowie der Annahme des zytotoxischen Phänotyps durch CD4⁺ T-Zellen involviert ist [96, 98, 99].

3.4.1 Produktion von zytotoxischen Proteinen durch CD4⁺ T-Zellen

Um die Produktion von Granulysin, Perforin, Granzym B, CCL5 und dem Transkriptionsfaktor EOMES durch potentiell zytotoxische CD4⁺ T-Zellen zu bestimmen, wurden PBMC von insgesamt 7 bzw. 11 AIH Patienten und 7 bzw. 9 gesunden Probanden durchflusszytometrisch untersucht (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2). Da der Proteintransportinhibitor Brefeldin A den Proteintransport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat hemmt, nicht aber in spätere Sekretionsmechanismen eingreift, kann zwar die Freisetzung von neu synthetisierten zytotoxischen Proteinen, nicht aber die Sezernierung aus bereits bestehenden zytotoxischen Granula, inhibiert werden [156, 165, 166]. Ebenso kann die Ausschüttung von bereits in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichertem CCL5 durch Brefeldin A nicht gehemmt werden [146, 147]. Daher wurde die Granulysin, Perforin, Granzym B und CCL5 Produktion nicht nur von unspezifisch stimulierten Zellen, sondern parallel auch von unstimulierten Zellen analysiert.

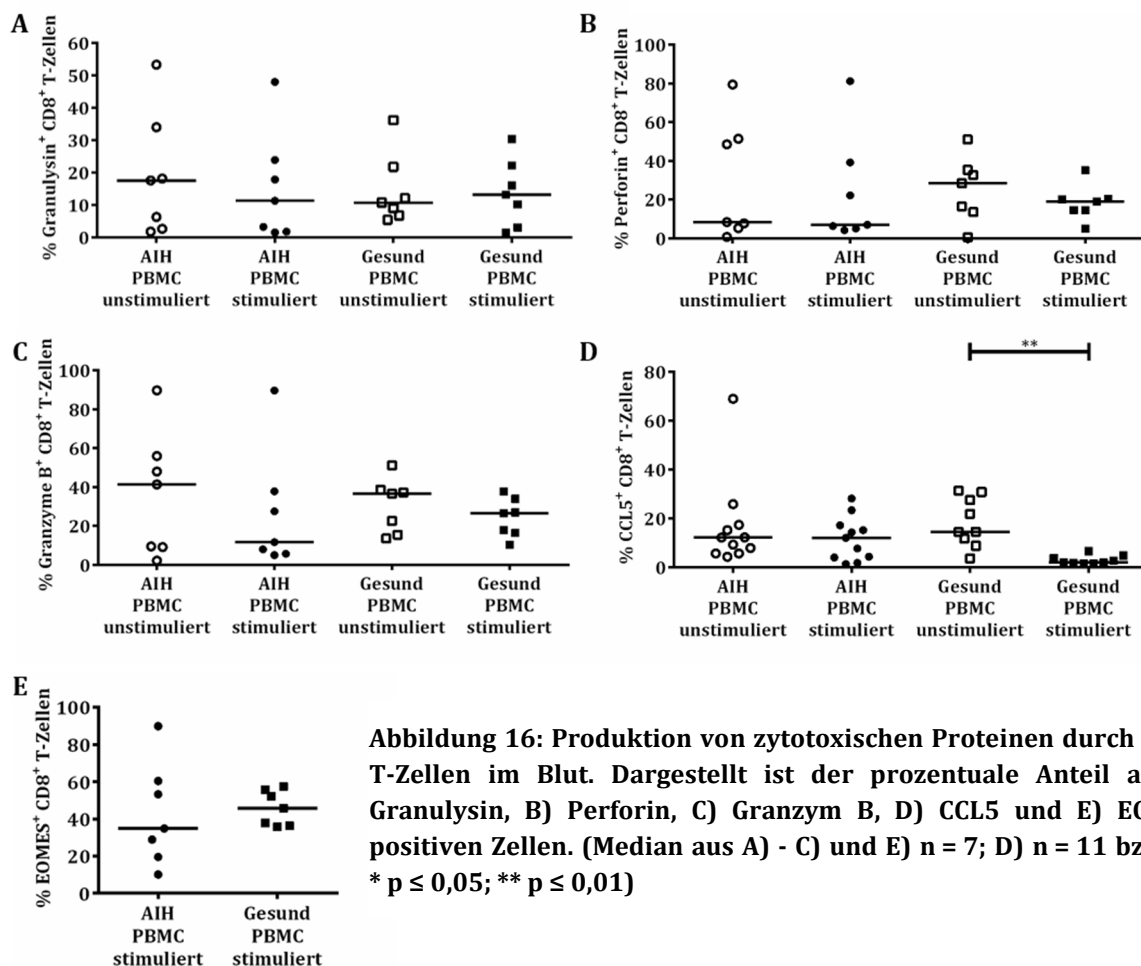


Der prozentuale Anteil an CD4⁺ T-Zellen, welche die zytotoxischen Proteine Granulysin, Perforin und Granzym B produzierten, war mit einem Median von unter 1 % (vgl. Abbildung 15 B) bzw. unter 2 % (vgl. Abbildung 15 A und C) sowohl bei den AIH Patienten als auch bei den gesunden Kontrollpersonen gering. Gleichzeitig unterschied sich weder der Anteil an Zellen, welche bereits ohne Stimulation diese Proteine gespeichert hatten, noch derjenige, welcher nach der unspezifischen Stimulation Granulysin, Perforin und Granzym B produzierten, signifikant zwischen den beiden Untersuchungsgruppen (vgl. Abbildung 15 A – C). Auch bei der Produktion des Transkriptionsfaktors EOMES konnte kein Unterschied zwischen den Patienten und den Gesundkontrollen festgestellt werden (vgl. Abbildung 15 E). Im Vergleich zu den zytotoxischen Proteinen wurde hingegen das Chemokin CCL5 von deutlich mehr unstimulierten CD4⁺ T-Zellen gespeichert (Median: 13,5 bzw. 22 %), wobei es aber ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen gab. Hingegen waren nach der Stimulation signifikant mehr Zellen der Patienten CCL5-positiv (p = 0,0213). Zugleich unterschied sich die Anzahl der CCL5 produzierenden CD4⁺ T-Zellen signifikant im Blut der Gesundkontrollen, nicht aber im Blut der Patienten, vor und nach der Stimulation (p = 0,0002 bzw. > 0,9999) (vgl. Abbildung

15 D). Dies ließ den Schluss zu, dass es sich bei den CD4⁺ T-Zellen im Blut von AIH Patienten nicht um zytotoxische Zellen handelte.

3.4.2 Proteinproduktion durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen

Bei den zytotoxischen T-Zellen handelt es sich klassischerweise um CD8⁺ Lymphozyten. Um die zytotoxischen Eigenschaften dieser Zellen in der AIH zu untersuchen, wurden PBMC von insgesamt 7 bzw. 11 AIH Patienten und 7 bzw. 9 gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Produktion von Granulysin, Perforin, Granzym B, CCL5 und dem Transkriptionsfaktor EOMES analysiert (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2). Wie bereits bei den CD4⁺ T-Zellen wurde hierbei die Produktion der zytotoxischen Proteine, sowie des CCL5 nicht ausschließlich in unspezifisch stimulierten, sondern auch in unstimulierten Zellen untersucht (vgl. Abs. 3.4.1).



Insgesamt war die Anzahl der Granulysin (Median zwischen 10,8 und 17,6 %), Perforin (Median zwischen 6,98 und 28,4 %) und Granzym B (Median zwischen 11,6 und 41,3 %) produzierenden CD8⁺ T-Zellen sowohl in den AIH Patienten, als auch in den gesunden Kontrollpersonen deutlich höher als in den CD4⁺ T-Zellen. Ähnlich den CD4⁺ T-Zellen,

unterschied sich weder der prozentuale Anteil der Zellen, welche Granulysin, Perforin oder Granzym B im unstimulierten Zustand gespeichert hatten, noch derjenige, welche nach der Stimulation diese zytotoxischen Proteine produzierten, signifikant zwischen den Patienten und den Gesundkontrollen (vgl. Abbildung 16 A – C und Abs. 3.4.1). Zwischen diesen beiden Versuchsgruppen gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der EOMES Produktion. Diese war mit einem Median von 34,9 bzw. 45,7 % erwartungsgemäß in den CD8⁺ T-Zellen aber deutlich höher als in den CD4⁺ T-Zellen (vgl. Abbildung 16 E). Wie bei den CD4⁺ T-Zellen unterschied sich der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Zellen, welche das Chemokin CCL5 vor der Stimulation gespeichert hatten, nicht zwischen den AIH Patienten und den Kontrollpersonen. Auch nach der Stimulation gab es, anders als bei den CD4⁺ T-Zellen, keinen Unterschied in der Produktion von CCL5 zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p = 0,0633$). Im Blut der gesunden Probanden speicherten aber erneut signifikant mehr unstimulierte Zellen CCL5, als nach der Stimulation von diesen produziert wurde ($p = 0,0011$) (vgl. Abbildung 16 D). Zusammenfassend schienen peripher zirkulierende zytotoxische CD8⁺ T-Zellen nach den vorliegenden Daten keine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AIH zu spielen.

3.5 Produktion von koloniestimulierenden Faktoren in der AIH

Vordaten haben gezeigt, dass auf mRNA-Ebene neben *TNF* auch das Gen für den Monozyten-Koloniestimulierenden Faktor (M-CSF, *CSF1*), gefolgt von dem für IFN γ (*IFNG*) und dem für Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF, *CSF2*) in LIL von AIH Patienten deutlich vermehrt exprimiert wird [167]. Infolgedessen sollte die Produktion dieser Zytokine im Blut (vgl. Abs. 3.5.1), sowie in der Leber (vgl. Abs. 3.5.2) von Patienten und Kontrollpersonen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Da zu den koloniestimulierenden Faktoren neben M-CSF und GM-CSF auch der Granulozyten-Koloniestimulierende Faktor (G-CSF, *CSF3*) gehört, sollte ebenfalls die Produktion dieses Zytokins analysiert werden [134, 135]. Bei der Untersuchung lag der Fokus erneut zunächst auf den CD4⁺ T-Zellen. Da aber zu den Hauptproduzenten dieser Faktoren auch andere, nicht-lymphozytäre Zelltypen zählen, sollte parallel außerdem ihre Produktion durch CD3⁺ Zellen untersucht werden [135].

3.5.1 M-CSF, GM-CSF und G-CSF produzierende Zellen in PBMC

Für die Analyse der M-CSF, GM-CSF und G-CSF Produktion durch CD4⁺ T-Zellen und CD3⁻ Zellen im Blut wurden unspezifisch stimulierte PBMC von insgesamt 9 (M-CSF), 10 (G-CSF) bzw. 11 (GM-CSF) AIH Patienten und 9 (M-CSF, GM-CSF) bzw. 10 (G-CSF) gesunden Probanden durchflusszytometrisch untersucht (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2). Die M-CSF Produktion wurde zusätzlich zu den stimulierten Zellen auch in unstimulierten Zellen bestimmt, da dieses Zytokin, anders als G-CSF und GM-CSF, in gewissem Maße konstitutiv von vielen Zellen produziert wird und es außerdem nicht nur als lösliches Zytokin von den Zellen sezerniert wird, sondern zum anderen auch als membrangebundenes oder membranassoziertes Protein auf der Zelloberfläche vorkommt [134, 136-138]. Die Freisetzung der membrangebundenen Form kann, anders als die Sezernierung von M-CSF aus sekretorischen Vesikeln, nicht durch den eingesetzten Proteintransportinhibitor Brefeldin A inhibiert werden [168].

Im Blut von AIH Patienten und Gesundkontrollen wurde M-CSF insgesamt nur von wenigen unstimulierten oder stimulierten CD4⁺ T-Zellen produziert (Median zwischen 0,99 und 1,81 %). Ein Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen war hierbei nicht auszumachen (vgl. Abbildung 17 A). In den CD3⁻ Zellen hingegen war die M-CSF Produktion mit einem Median zwischen 20,4 und 67,1 % deutlich höher. Die Frequenz der M-CSF produzierenden Zellen vor der Stimulation war in dieser Zellpopulation in beiden Gruppen jeweils höher (Median: 67,1 % bzw. 30 %) als bei den stimulierten Zellen (Median: 37,4 % bzw. 20,4 %), wobei allerdings jeweils kein signifikanter Unterschied innerhalb der Versuchsgruppen vorlag ($p = 0,1382$ bzw. $0,5474$). Gleichzeitig produzierten die unstimulierten CD3⁻ Zellen der AIH Patienten mit einem p -Wert von 0,0078 signifikant mehr M-CSF als die unstimulierten Zellen der Kontrollpersonen. Auch der Anteil der CD3⁻ Zellen, welche unter Stimulationsbedingungen M-CSF produzierten, lag bei den AIH Patienten oberhalb des Anteils bei den gesunden Probanden (Median: 37,4 % bzw. 20,4 %), wobei hier aber knapp kein signifikanter Unterschied bestand ($p = 0,0538$) (vgl. Abbildung 17 B).

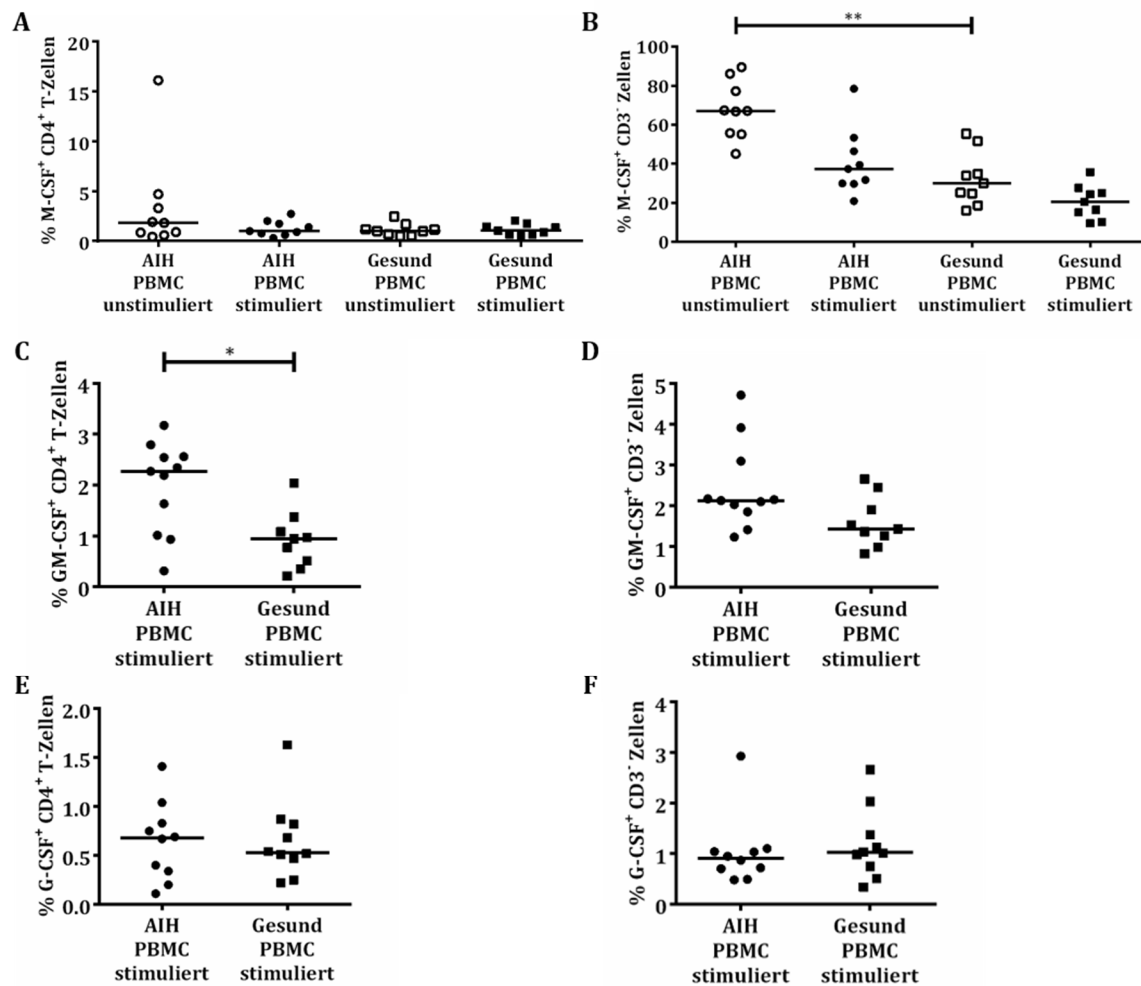


Abbildung 17: M-CSF, GM-CSF und G-CSF Produktion durch Blutzellen. Die Anzahl an A), B) M-CSF-, C), D) GM-CSF- und E), F) G-CSF-positiven A), C), E) CD4⁺ T-Zellen und B), D), F) CD3⁻ Zellen ist in % dargestellt. (Median aus A), B) n = 9; C), D) n = 11 bzw. 9; E), F) n = 10; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)

Die Anzahl an GM-CSF produzierenden Zellen war in beiden Gruppen sowohl in den CD4⁺ T-Zellen (Median: 2,27 bzw. 0,94 %) als auch in den CD3⁻ Zellen (Median: 2,13 bzw. 1,43 %) gering (vgl. Abbildung 17 C und D). Ungeachtet dessen war aber der prozentuale Anteil an GM-CSF-positiven CD4⁺ T-Zellen im Blut von AIH Patienten verglichen mit dem im Blut gesunder Personen signifikant (p = 0,0124) erhöht (vgl. Abbildung 17 C). Bei den CD3⁻ Zellen hingegen unterschied sich die Produktion mit einem p-Wert von 0,0668 knapp nicht signifikant zwischen den beiden Untersuchungsgruppen (vgl. Abbildung 17 D). Auch der Anteil von G-CSF produzierenden CD4⁺ und CD3⁻ Zellen unterschied sich nicht signifikant (p > 0,9999 bzw. = 0,4475) zwischen den AIH Patienten und den gesunden Personen. Hierbei war die Produktion insgesamt mit einem Median von 0,68 bzw. 0,53 % und 0,91 bzw. 1,02 % vernachlässigbar gering (vgl. Abbildung 17 E und F).

3.5.2 Produktion von koloniestimulierenden Faktoren durch LIL

Neben den Blutzellen (vgl. Abs. 3.5.1) sollten ebenfalls Immunzellen in der Leber auf ihre Produktion von koloniestimulierenden Faktoren untersucht werden. Hierzu wurden jeweils LIL aus 4 Biopsien von AIH Patienten, sowie 6 Biopsien von Kontrollpersonen (Fettlebererkrankung bzw. Tumorrangewebe) isoliert, polykonal stimuliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2). Da die Ergebnisse im Blut keine Beteiligung von G-CSF an der Pathogenese der AIH vermuten ließen, wurde in der Leber nur die Produktion von GM-CSF und M-CSF bestimmt. Die M-CSF Produktion wurde hierbei erneut nicht nur in stimulierten, sondern zusätzlich auch in unstimulierten Zellen bestimmt (vgl. Abs. 3.5.1). Da zum Teil nur sehr geringe Gesamtzellzahlen aus den Biopsien isoliert werden konnten und die generell niedrige Produktion der beiden Faktoren mitunter die Abgrenzung der M-CSF- bzw. GM-CSF-positiven $CD4^+$ T-Zellen von den jeweils negativen Zellen erschwerte, wurden anstelle der $CD4^+$ T-Zellen alle $CD3^+$ Zellen auf ihre Zytokinproduktion untersucht.

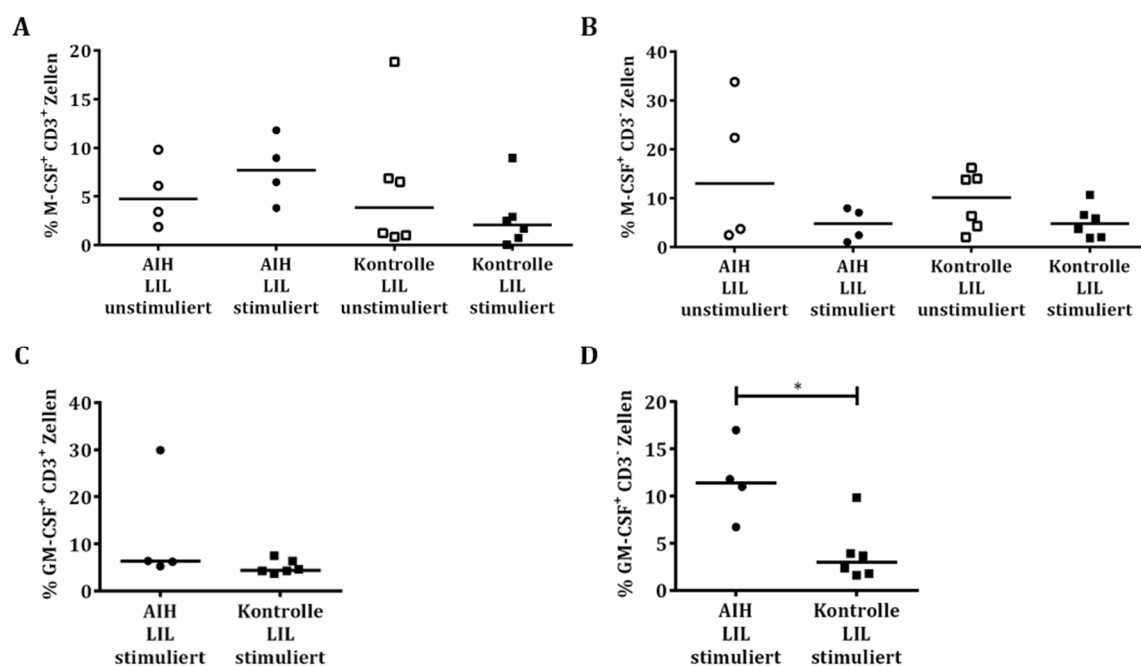


Abbildung 18: M-CSF und GM-CSF produzierende Immunzellen in der Leber. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an A), B) M-CSF- und C), D) GM-CSF-positiven A), C) $CD3^+$ und B), D) $CD3^-$ Zellen. (Median aus $n = 4$ bzw. 6)

Ähnlich wie die $CD4^+$ T-Zellen im Blut (vgl. Abs. 3.5.1) produzierten nur wenige unstimulierte, sowie stimulierte $CD3^+$ Zellen in der Leber von AIH Patienten und Kontrollpersonen M-CSF (Median zwischen 2,09 und 7,72 %). Die $CD3^+$ Zellen der AIH Patienten produzierten hierbei, anders als die der Kontrollen, nach der Stimulation tendenziell mehr M-CSF (Median: 7,72 %) als im unstimulierten Zustand (Median: 4,77 %)

und auch mehr als die stimulierten Zellen der Kontrollprobanden (Median: 2,09 %), obgleich diese Unterschiede nicht signifikant waren ($p > 0,9999$ bzw. $= 0,1652$) (vgl. Abbildung 18 A). Die M-CSF Produktion war erwartungsgemäß in den CD3⁻ Zellen der Leber, wie auch im Blut, stärker als in den CD3⁺ Zellen. Gleichzeitig war hier der Anteil an M-CSF-positiven Zellen aber mit einem Median von maximal 13,05 % insgesamt deutlich niedriger als im Blut. Bei den Patienten und den Kontrollen war erneut ein geringfügig höherer Anteil der unstimulierten CD3⁻ Zellen positiv für M-CSF als der Anteil der stimulierten Zellen, wobei abermals jeweils kein signifikanter Unterschied vorlag ($p = 0,9282$ bzw. $0,8185$). Anders als im Blut war in den Biopsien der AIH Patienten der Anteil der unstimulierten M-CSF produzierenden CD3⁻ Zellen zwar höher als in den unstimulierten Zellen der Kontrollen (Median: 13,05 % bzw. 10,08 %), der Unterschied war hier aber nicht signifikant ($p > 0,9999$) (vgl. Abbildung 18 B und Abs. 3.5.1). Insgesamt war in der Leber ein höherer Anteil an GM-CSF-positiven Zellen, sowohl in den CD3⁺ Zellen (Median: 6,28 bzw. 4,405 %), als auch in den CD3⁻ Zellen (Median: 11,4 bzw. 3,005 %) zu finden als im Blut. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Erkrankten und Kontrollpersonen ließ sich allerdings für die CD3⁺ Zellen, anders als im Blut, nicht nachweisen ($p = 0,2571$). Hingegen produzierten signifikant mehr der CD3⁻ Zellen aus der Leber von AIH Patienten GM-CSF, als die Zellen aus der Leber der Kontrollen ($p = 0,0190$) (vgl. Abbildung 18 C und D und Abs. 3.5.1). Zusammengenommen deuteten die Ergebnisse auf eine relevante M-CSF Produktion durch CD3⁻ Zellen, sowie eine GM-CSF Produktion durch CD4⁺ T-Zellen im Blut bzw. CD3⁻ in der Leber von AIH Patienten hin.

3.5.3 Differentielle Produktion von M-CSF und TNF in der AIH

Die Produktion von M-CSF durch CD4⁺ bzw. CD3⁺ T-Zellen schien in der AIH nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings war der Anteil an M-CSF-positiven CD3⁻ Zellen bei den Patienten im Blut gegenüber den Gesundkontrollen deutlich erhöht (vgl. Abs. 3.5.1). Um zu verstehen, um welche Arten von Zellen es sich hierbei hauptsächlich handelte, sollten unstimulierte, lebende, M-CSF produzierende PBMC durchflusszytometrisch auf die Präsenz von Zellmarkern, welche eine Einteilung in verschiedene CD3⁻ Zellsubpopulationen des Immunsystems ermöglichten, analysiert werden (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2). In Abbildung 19 ist exemplarisch eine repräsentative Verteilung der M-CSF produzierenden Zellsubpopulationen eines AIH Patienten dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass es sich erwartungsgemäß bei fast allen M-CSF-positiven Zellen um CD3⁻ Zellen handelte. Die

Hauptproduzenten von M-CSF waren Makrophagen, wobei zusätzlich noch Monozyten und Eosinophile jeweils einen geringen Anteil der M-CSF-produzierenden Zellen ausmachten.

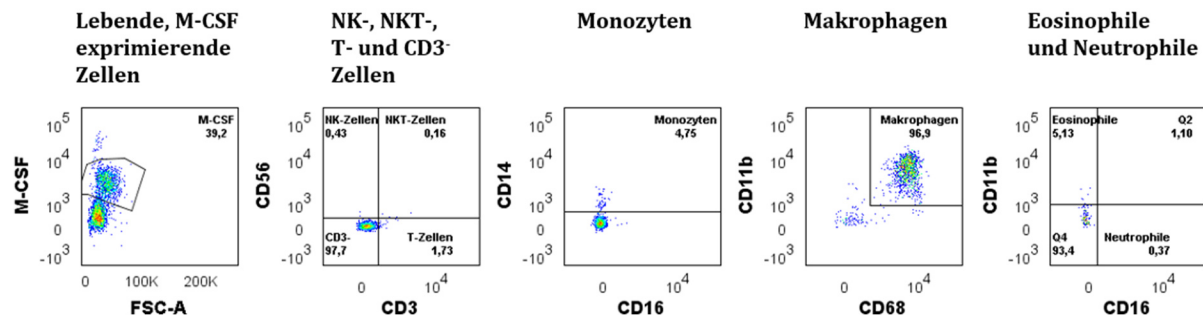


Abbildung 19: Repräsentative Verteilung der M-CSF produzierenden Zellsubpopulationen exemplarisch an PBMC eines AIH Patienten dargestellt. Gating-Strategie: Einzelzellen; Lymphozyten; lebende Zellen; M-CSF Produzenten; NK-, NKT-, T- und CD3⁻ Zellen; von den CD3⁻ Zellen die Monozyten; von den nicht Monozyten die Makrophagen und von den nicht Makrophagen die Eosinophilen und Neutrophilen

Für Makrophagen ist nicht nur eine M-CSF Sezernierung beschrieben, in der Literatur gelten sich auch als potente TNF Produzenten [72]. Anders als in der Literatur meist beschrieben, zeigten die vorangegangenen Ergebnisse jedoch eine deutlich erhöhte TNF Produktion insbesondere durch die CD4⁺ T-Zellen im Blut und in der Leber von AIH Patienten (vgl. Abs. 3.2). Um zu bestätigen, dass es sich bei den M-CSF und TNF produzierenden Zellen in der AIH tatsächlich um unterschiedliche Zellen handelte, wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Zytokin produzierenden CD3⁻ und CD3⁺ Zellen miteinander verglichen. Hierzu dienten bei M-CSF die unstimulierten PBMC aus Absatz 3.5.1 und bei TNF die stimulierten PBMC aus Absatz 3.2.1.

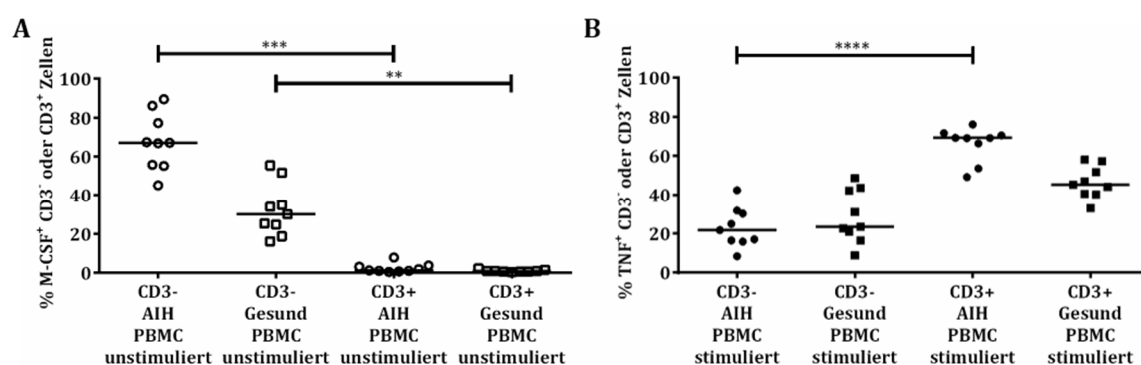


Abbildung 20: M-CSF und TNF produzierende CD3⁻ und CD3⁺ Zellen im Blut von AIH Patienten und Gesundkontrollen. Die Anzahl der A) M-CSF-, und B) TNF-positiven CD3⁻ und CD3⁺ Zellen ist in % dargestellt. (Median aus n = 9; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,001; **** p-Wert ≤ 0,0001)**

Abbildung 20 veranschaulicht deutlich, dass M-CSF fast ausschließlich durch CD3⁻ Zellen (p = 0,0002 bzw. 0,0055) und TNF hingegen signifikant mehr durch CD3⁺ Zellen im Blut von AIH Patienten produziert wurde (p < 0,0001). Allerdings produzierten auch CD3⁻ Zellen der

Patienten und der gesunden Personen TNF (Median: 21,7 bzw. 23,3 %), wobei aber kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen vorlag ($p > 0,9999$) (vgl. Abbildung 20 B). Zusammengefasst wurde M-CSF in der AIH erwartungsgemäß hauptsächlich durch Makrophagen produziert, wobei es sich hierbei um andere Zellen als die Hauptproduzenten von TNF handelte. TNF wurde etwas überraschend in der AIH vor allem durch CD4⁺ T-Zellen produziert.

3.6 Aktivität, Expression und Präsenz von ADAM-17 in der AIH

Mit TNF und M-CSF wurden zwei der Substrate des Enzyms ADAM-17 in der AIH verstärkt produziert (vgl. Abs. 3.2 und 3.5) [114-116]. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob dies im Zusammenhang mit einer veränderten Aktivität oder Präsenz dieses Enzyms steht. Dazu sollte zunächst die Produktion bzw. Freisetzung weiterer ADAM-17 Substrate bestimmt werden. Weiterhin sollte mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors getestet werden, in wie weit die TNF Freisetzung durch PBMC von diesem Enzym abhängt. In einem nächsten Schritt sollte außerdem sowohl die *ADAM17* Genexpression, sowie der Proteingehalt dieses Enzyms in den Zellen analysiert werden.

3.6.1 Produktion und Freisetzung von ADAM-17 Substraten in PBMC

Neben TNF und M-CSF ist ADAM-17 auch an der Freisetzung von vielen anderen Transmembranproteinen beteiligt. So gehören z. B. TGF α , IL-6R α , CSF1R, TNF-RI und II und CD62L zu dessen Substraten [117]. Um zu untersuchen, ob weitere ADAM-17 Substrate in der AIH verstärkt produziert werden, wurden PBMC von insgesamt 10 AIH Patienten und gesunden Kontrollpersonen per Durchflusszytometrie auf ihre Produktion von L-Selektin (CD62L) getestet (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.2). Da dieses Adhäsionsmolekül auf fast allen zirkulierenden Leukozyten konstitutiv als Oberflächenprotein präsent ist und die Hauptproduzenten von M-CSF in der AIH Makrophagen sind (vgl. Abs. 3.5.3), wurden neben den CD4⁺ T-Zellen, auch CD3⁻ Zellen auf ihre CD62L Produktion analysiert [169, 170]. Hierbei wurden ausschließlich unstimulierte Zellen betrachtet, da eine Aktivierung der Zellen zu einer raschen Freisetzung des Proteins durch ADAM-17 führt [171-173].

Der Anteil an CD62L produzierenden CD4⁺ T-Zellen war insgesamt in PBMC sowohl der AIH Patienten als auch der Kontrollpersonen mit einem Median von 39,85 bzw. 60,05 % höher, als in den CD3⁻ Zellen (Median: 4,485 bzw. 14,65 %). In beiden Zellsubpopulationen war die Anzahl an CD62L-positiven Zellen bei den Patienten signifikant geringer, als bei den

Gesundkontrollen ($p = 0,0068$ bzw. $0,0015$), was auf eine gesteigerte Freisetzung hindeutete (vgl. Abbildung 21).

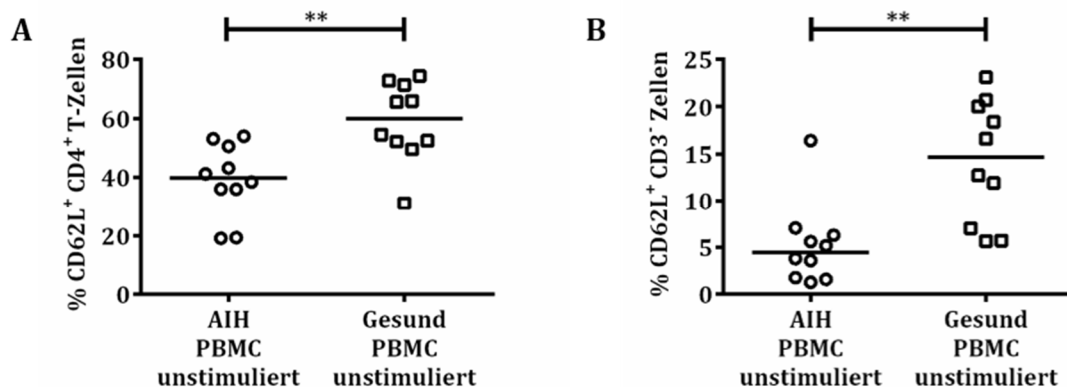


Abbildung 21: Produktion von CD62L durch Zellen im Blut. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD62L-positiven A) CD4⁺ und B) CD3⁺ Zellen (Median aus $n = 10$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$)

Diese Ergebnisse könnten zum einen für eine verstärkte ADAM-17 Aktivität, aber gleichzeitig auch für eine generell höhere Anzahl an aktivierter Zellen bei den AIH Patienten sprechen. Um dies weiter einzugrenzen, wurden außerdem die freigesetzten ADAM-17 Substrate TNF-RI und M-CSF mittels ELISA gemessen. Hierzu wurden beim TNF-RI ELISA Plasmaproben von 3 AIH Patienten und 6 gesunden Personen, sowie 4 Serumproben von Patienten eingesetzt. Mit dem M-CSF ELISA wurden je 16 Plasmaproben von Patienten und Gesundkontrollen analysiert (vgl. Abs. 2.2.4).

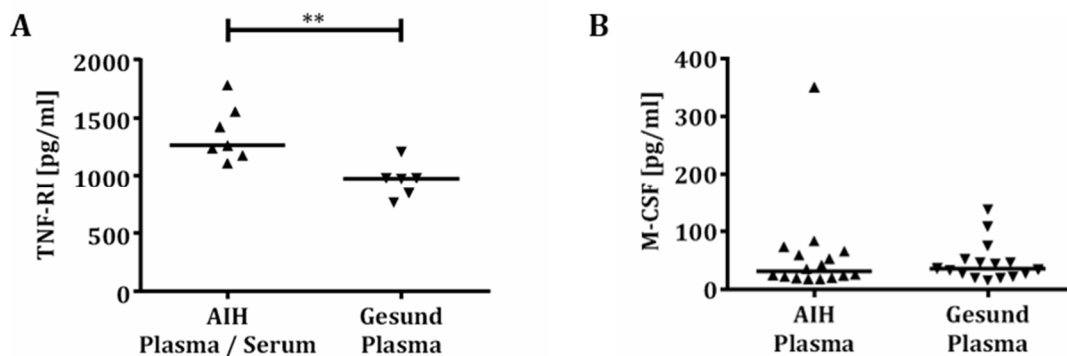


Abbildung 22: Konzentration von ADAM-17 Substraten im Plasma bzw. Serum. Die A) TNF-RI und B) M-CSF Konzentration ist in pg/ml dargestellt (Median aus A) $n = 7$ bzw. 6; B) $n = 16$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$)

Die TNF-RI Konzentrationsbestimmung erfolgte sowohl in Plasma- als auch Serumproben von AIH Patienten. Da sich die verschiedenen Probenarten erwartungsgemäß aber weder generell in ihrer TNF-RI Konzentration unterschied, noch jeweils ein Cluster bildeten, wurden sie zusammen als eine Gruppe dargestellt. Bei den AIH Patienten war die TNF-RI

Konzentration im Plasma bzw. Serum gegenüber der im Plasma der gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ($p = 0,0047$) (vgl. Abbildung 22 A). Interessanterweise unterschied sich die M-CSF Konzentration im Plasma der Patienten und der Gesundkontrollen hingegen nicht ($p = 0,7717$). Insgesamt war die M-CSF Konzentration (Median: 31,31 bzw. 35,71 pg/ml) deutlich geringer als die Konzentration des TNF-RI (Median: 1263 bzw. 975,1 pg/ml) (vgl. Abbildung 22 B). Alles in allem deutete dies auf eine stärkere Präsenz oder Aktivität von ADAM-17 in der AIH hin.

3.6.2 ADAM-17-abhängige TNF Freisetzung durch PBMC

Um zu bestätigen, dass die gesteigerte Freisetzung von ADAM-17 Substraten in der AIH (vgl. Abs. 3.6.1) abhängig von diesem Enzym ist, wurde exemplarisch die TNF Freisetzung durch PBMC von 3 AIH Patienten unter Stimulationsbedingungen untersucht, die gleichzeitig mit dem ADAM-17 / ADAM-10 Inhibitor GW280264X bzw. zur Kontrolle mit dem ADAM-10 Inhibitor GI254023X behandelt wurden (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.5). Außerdem wurden zur Kontrolle Zellen ohne die Zugabe eines Inhibitors stimuliert.

Erwartungsgemäß war die TNF Konzentration mit einem Median von 766,1 pg/ml im Zellkulturüberstand der ohne die Zugabe eines Inhibitors stimulierten Zellen am höchsten (vgl. Abbildung 23). Bei den Zellen, welche mit dem ADAM-17 / ADAM-10 Inhibitor behandelt wurden, war im Vergleich die freigesetzte TNF Menge hingegen deutlich reduziert (Median: 213,8 pg/ml). Die TNF Freisetzung durch die allein mit dem ADAM-10

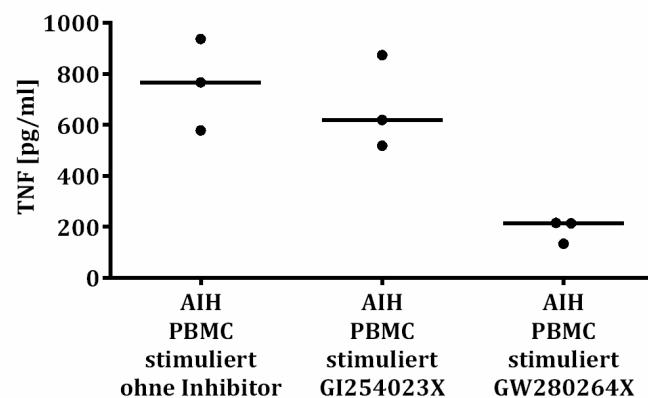


Abbildung 23: Exemplarische Testung der Abhängigkeit der TNF Freisetzung durch PBMC von AIH Patienten vom Enzym ADAM-17. Abgebildet ist die TNF Konzentration in pg/ml nach einer unspezifischen Stimulation mit bzw. ohne der Zugabe von 3 μ M GI254023X bzw. GW280264X (Median aus $n = 3$)

Inhibitor behandelten Zellen war im Gegensatz kaum verringert (Median: 618,9 pg/ml). Aufgrund der geringen Größe der Versuchsgruppen konnte hier allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden. Die Ergebnisse ließ aber den Schluss zu, dass die TNF Freisetzung in den PBMC von AIH Patienten ADAM-17, nicht aber ADAM-10 abhängig war.

3.6.3 Expression von *ADAM17* durch PBMC und LIL

Verschiedene ADAM-17 Substrate wurden in der AIH vermehrt freigesetzt (vgl. Abs. 3.6.1 und 3.6.2). Um zu testen, ob dies Folge einer gesteigerten ADAM-17 Präsenz ist, wurde die *ADAM17* Expression durch PBMC von insgesamt 9 AIH Patienten und 8 gesunden Personen sowie Biopsien von 8 AIH Patienten und 11 Kontrollpersonen (Fettlebererkrankung bzw. Tumorrangewebe) mittels qRT-PCR analysiert. Hierbei wurde zum Vergleich der Zielgenexpressionen der Patienten und Kontrollen die jeweils ermittelte relative Expression der einzelnen Proben auf den Median der Kontrollgruppe normiert (vgl. Abs. 2.2.1 und 2.2.6.2 - 2.2.6.4).

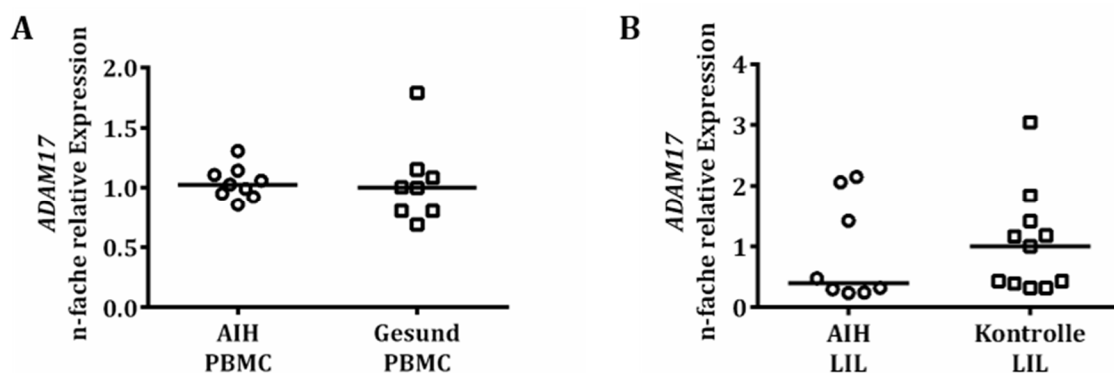


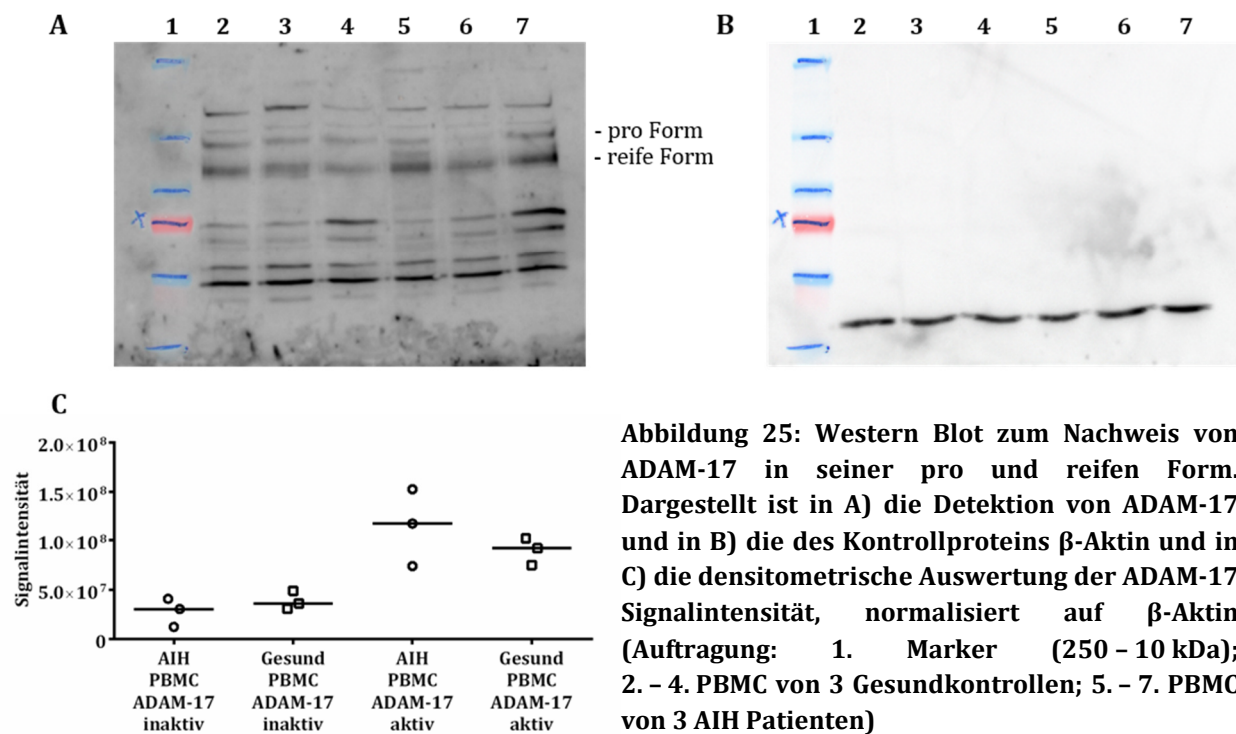
Abbildung 24: *ADAM17* exprimierende PBMC und LIL. Die relative *ADAM17* Expression durch A) PBMC und B) LIL ist normiert auf den Median der Kontrollen dargestellt (Median aus A) $n = 9$ bzw. 8; B) $n = 8$ bzw. 11; Kontrollgen: *HPRT1*)

Im Blut der AIH Patienten und der gesunden Personen war die relative Expression von *ADAM17* ähnlich (Median: 1,027 bzw. 1; $p = 0,6539$) (vgl. Abbildung 24 A). Auch bei den LIL unterschied sich die *ADAM17* Expression nicht signifikant zwischen den Patienten und Kontrollpersonen, wobei die LIL der AIH Patienten tendenziell weniger *ADAM17* exprimierten (Median: 0,3959 bzw. 1; $p = 0,5278$) (vgl. Abbildung 24 B).

3.6.4 Präsenz und Aktivität von ADAM-17 in PBMC

Die vermehrte Freisetzung von ADAM-17 Substraten in der AIH schien nicht Folge einer gesteigerten *ADAM17* Expression zu sein (vgl. Abs. 3.6.1 – 3.6.3). Allerdings wird die ADAM-17 Aktivität neben der Transkription auch über andere Mechanismen reguliert. So wird das Enzym unter anderem als Vorläuferprotein mit einer inhibierenden Pro-Domäne synthetisiert und liegt erst nach Abspaltung dieser Domäne in seiner aktiven Form vor [120]. Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Freisetzung der ADAM-17 Substrate im Zusammenhang mit einer veränderten Aktivität des Enzyms liegt, sollte das Vorläufer- sowie das reife Protein in PBMC von AIH Patienten und gesunden Probanden mittels Western Blot

nachgewiesen werden. Mithilfe einer anschließenden densitometrischen Messung der Signalintensität sollte außerdem Rückschluss auf die jeweilig vorliegende Proteinmenge gezogen werden (vgl. Abs. 2.2.7). Die Molekülmasse des Vorläuferproteins ist in der Literatur mit 110 bis 120 kDa und die des reifen Proteins mit 80 bis 100 kDa angegeben. Weiterhin kann das Protein in glykosylierter Form mit einer Molekülmasse von 130 kDa und ohne die zytoplasmatische Domäne (60 kDa) vorliegen [123, 124].



In Abbildung 25 A ist ein exemplarischer Western Blot zum Nachweis von ADAM-17 in nicht stimulierten PBMC von 3 gesunden Personen (Reihe 2 – 4) und 3 AIH Patienten (Reihe 5 – 7) und in Abbildung 25 B der Nachweis des Kontrollproteins β -Aktin im selben Blot dargestellt. Alle Proben wurden jeweils in einer Gesamtproteinkonzentration von 15 μ g aufgetragen. Die gleichmäßige Auftragung der Proben konnte anhand der Signalintensität der β -Aktin Banden kontrolliert werden. Beim Nachweis von ADAM-17 waren trotz des Einsatzes eines Protease Inhibitor Cocktail in allen 6 Proben neben den Banden der pro und reifen Form außerdem einige weitere Signale erkennbar. Da die Banden dieser beiden Formen jeweils leicht oberhalb ihrer beschriebenen Molekülmasse von 120 bzw. 100 kDa lagen (vgl. 2. blaue Markerbande \sim 130 kDa bzw. 3. blaue Markerbande \sim 100 kDa), konnte davon ausgegangen werden, dass die oberste Bande der glykosylierten ADAM-17 Form (130 kDa) und die Bande auf Höhe der roten Markerbande (\sim 70 kDa) der Form ohne die zytoplasmatische Domäne (60 kDa) entsprach. Bei den restlichen Banden handelte es sich vermutlich um ADAM-17 Fragmente. Abbildung 25 C zeigt die densitometrische Auswertung der ADAM-17

Signalintensität normiert auf das Kontrollprotein β -Aktin. Hierbei war die Signalintensität für die aktive Form von ADAM-17 sowohl bei den AIH Patienten, also auch bei den gesunden Kontrollen jeweils stärker, als die Intensität des Vorläuferproteins. Außerdem war bei den exemplarisch getesteten Patienten das Signal für aktives ADAM-17 stärker als in den Kontrollen (Median: $1,171 \cdot 10^8$ bzw. $9,197 \cdot 10^7$). Beim Vorläuferprotein hingegen war die Signalintensität bei den Patienten und gesunden Probanden fast identisch (Median: $3,038 \cdot 10^7$ bzw. $3,618 \cdot 10^7$). Dies zeigte eine gesteigerte ADAM-17 Aktivität in PBMC von AIH Patienten.

4. Diskussion

Die Pathogenese der AIH ist bislang weitgehend ungeklärt, wodurch eine gezielte Behandlung derzeit nicht möglich ist [32]. Daher erfolgt standardmäßig eine Therapie mit einer meist lebenslangen generellen Immunsuppression, die aber häufig mit gravierenden Nebenwirkungen einhergeht [7, 56, 61, 174]. Hinzu kommt, dass diese Standardtherapie bei einigen Patienten zu keiner oder nur einer unvollständigen Remission führt [7, 60]. Daher ist es erforderlich, neue krankheitsspezifischere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, wofür ein besseres Verständnis der Pathogenese notwendig ist [32]. Ein möglicher alternativer Therapieansatz ist die Behandlung mit dem bei anderen entzündlichen Erkrankungen schon therapeutisch genutzten monoklonalen anti-TNF Antikörper Infliximab, welcher bereits erfolgreich bei einigen Patienten mit einer schwer zu behandelnden AIH eingesetzt wurde [64-66]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss dieser Behandlung auf die Pathogenese zu untersuchen. Weiterhin sollten CD4⁺ T-Zellen, welche mutmaßlich entscheidend an der Pathogenese beteiligt sind, hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion charakterisiert werden [33-35]. Im letzten Teil sollte außerdem die Aktivität und Präsenz des Enzyms ADAM-17 in der AIH analysiert werden, da dieses die Freisetzung von TNF, der Zielstruktur der Infliximab Therapie, katalysiert [114, 115].

4.1 Infliximab Therapie in der AIH

Infliximab ist ein chimärer monoklonaler anti-TNF Antikörper, wobei die TNF bindende variable Region murinen Ursprungs ist und die konstante Region der eines humanen IgG1 entspricht. Parallel gibt es noch weitere komplett humane anti-TNF Antikörper wie z. B. Adalimumab die therapeutisch genutzt werden [175]. Mit diesen Medikamenten werden unter anderem bereits Patienten mit anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis bzw. Psoriasis Arthritis und Morbus Crohn erfolgreich behandelt [176-180]. Bei der AIH hingegen wird Infliximab bisher nur als Therapie außerhalb der behördlich zugelassenen Indikation bei Patienten mit einer schwer zu behandelnden AIH im Rahmen von Heilversuchen eingesetzt [64-66]. Bei einer dieser Patientinnen wurden in einem Gesamtzeitraum von etwa 3 ½ Jahren neben den klinischen Parametern auch die TNF, IFN γ und IL-17A Produktion durch CD3⁻, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen im Blut beobachtet (vgl. Abs. 3.1.1). Nach Beginn der Behandlung verbesserten sich die γ -Globulin- und IgG-Werte, sowie die Elastizität der Leber zunächst. Parallel normalisierten sich auch die Aminotransferasen. Insgesamt spricht dies für ein gutes Ansprechen auf die

anti-TNF Therapie. Interessanterweise nahm in dieser Zeit nicht nur die Anzahl an TNF produzierenden Zellen, sondern auch die der IFN γ - und IL-17A-positiven Zellen, sowie der TNF / IFN γ -doppelt-positiven Zellen ab. Dabei zeigte sich insgesamt der Anteil an IL-17A produzierenden Zellen vernachlässigbar gering, was gegen die in der Literatur postulierte Hypothese einer Th17 getriebenen Erkrankung spricht [54, 181]. Auch bei der *in vitro* Behandlung von PBMC von gesunden Personen mit Infliximab war, neben der Anzahl der TNF produzierenden Zellen, auch die der IFN γ - und IL-2-positiven Zellen im Vergleich zu den Zellen ohne Behandlung deutlich geringer (vgl. Abs. 3.1.2). Dies ist konform mit vorbeschriebenen Phänomenen unter einer Infliximab Therapie, so zeigten Ringheanu *et al.*, dass Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn die mit Infliximab therapiert wurden, sowie isolierte Monozyten von gesunden Probanden die unter Stimulationsbedingungen mit Infliximab behandelt wurden, nicht nur weniger TNF-RNA exprimierten, sondern dass ebenfalls eine reduzierte Expression der RNA für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 vorlag [182]. Dies deutet darauf hin, dass neben der Neutralisierung der löslichen Form von TNF noch weitere Mechanismen den klinischen Effekt von Infliximab vermitteln. So ist Infliximab in der Lage, neben löslichem TNF auch monomere TNF Moleküle und mTNF zu binden [183]. Hierbei bindet der Antikörper nicht an der Rezeptorbindestelle zwischen den einzelnen TNF Monomeren, sondern direkt an dem TNF Monomer. Ein trimeres TNF Molekül kann also von bis zu drei therapeutischen Antikörpermolekülen gebunden werden. Gleichzeitig kann ein Antikörper auch zwei benachbarte TNF Moleküle binden [184]. Aufgrund dieser Bindeeigenschaft liegen die kristallisierbaren Fragment Regionen (Fc-Regionen) der anti-TNF Antikörper frei und können mit spezifischen Fc-Rezeptoren interagieren. So zeigten Vos *et al.*, dass in Abhängigkeit der Fc-Region des anti-TNF Antikörpers, welcher mTNF auf aktivierten T-Zellen gebunden hat, die Differenzierung von regulatorischen Makrophagen induziert wird und dass diese Makrophagen wiederum die Proliferation der T-Zellen inhibieren [185]. Dieser Mechanismus könnte bei der Behandlung von AIH Patienten mit Infliximab von besonderer Relevanz sein, da insbesondere CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielen [33-35]. Auch bei Patienten mit Morbus Crohn ergeben sich Hinweise auf diesen Wirkmechanismus von Infliximab. Morbus Crohn Patienten mit einem Polymorphismus im Gen für den Fc- γ Rezeptor IIIa sprechen besser auf eine Infliximab Therapie an als andere, da der Polymorphismus die Affinität des Rezeptors zu IgG1 Antikörpern erhöht [186]. Zusätzlich kann die Lyse einer Zelle durch die Bindung von zytotoxischen Zellen an die

Fc-Region der an mTNF gebundenen therapeutischen Antikörper eingeleitet werden, was, insbesondere hinsichtlich einer möglichen Reduktion der mit der Pathogenese assoziierten CD4⁺ T-Zellen, bei der AIH Therapie mit Infliximab eine wesentliche Rolle spielen könnte [33-35, 106, 187]. Darüber hinaus werden weitere Wirkmechanismen diskutiert, welche möglicherweise durch die Bindung von Infliximab an mTNF zur Apoptose oder einen Zellzyklus G0/G1 Arrest bzw. zu einer Komplement-induzierten Zelllyse führen [182, 187-189]. Ein potentiell weiterer Wirkmechanismus von anti-TNF Antikörpern, welcher bei der Therapie der AIH eine wichtige Rolle spielen könnte, wurde von Nguyen und Ehrenstein beschrieben: Die Autoren zeigten, dass Adalimumab die Interaktion von mTNF auf Monozyten mit dem TNF-RII auf Treg fördern kann und dies über den IL-2/STAT5 Signalweg zur gesteigerten Proliferation und Suppressionseigenschaft dieser Treg führt [190]. Treg sind entscheidend an der Regulierung von Entzündungsreaktionen und der Entwicklung einer Selbsttoleranz beteiligt, indem sie andere Immunzellen supprimieren [76, 82, 85]. Einige allergische bzw. autoimmune Erkrankungen wie z. B. Asthma, MS und Diabetes mellitus Typ I sind mit einer verminderten Anzahl und/oder Funktion von Treg assoziiert [191-193]. Auch in der AIH wird eine verminderte Treg Präsenz bzw. Funktion diskutiert [194, 195]. Neuere Untersuchungen, bei denen spezifischere Zellmarker bei der Identifizierung der Treg eingesetzt wurden, konnten diese Hypothese bisher nicht bestätigen: Im Zellinfiltrat der Leber von unbehandelten AIH Patienten und Patienten mit einer gesteigerten Krankheitsaktivität ist hingegen sogar eine erhöhte Anzahl an Treg beschrieben [53, 196].

Etwa ein Jahr nach Beginn der Therapie mit Infliximab begannen sich die klinischen Parameter wie γ -Globulin-, IgG-Werte und Aminotransferasen der Patientin wieder zu verschlechtern. Parallel stieg ebenfalls der prozentuale Anteil an TNF, IFN γ und IL-17A produzierender Zellen, sowie der TNF / IFN γ -doppelt-positiver Zellen wieder an, was für eine zunehmende Krankheitsaktivität spricht (vgl. Abs. 3.1.1). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Bildung von Antikörpern gegen das Medikament sein, wie es häufig bei therapeutisch genutzten Antikörpern vorkommt [197].

Neben der Möglichkeit des Verlustes des Therapieansprechens durch die Bildung von anti-Medikament Antikörpern, kann die Therapie mit Infliximab außerdem einige Nebenwirkungen hervorrufen, die bei der Entscheidung für eine Behandlung mit denen anderer möglicher Therapien abgewogen werden müssen. So besteht bei der Behandlung mit anti-TNF Medikamenten z. B. ein erhöhtes Risiko, dass eine latente Tuberkulose wieder

ausbricht [198, 199]. Paradoxerweise ist außerdem die Entstehung einer AIH-ähnlichen Erkrankung bei Patienten, welche aufgrund von anderen Erkrankungen mit anti-TNF Medikamenten behandelt wurden, beschrieben [200, 201].

Zusammengenommen zeigt die Beobachtung des klinischen Verlaufes und der Zytokinproduktion einer Patientin die mit Infliximab behandelt wurde, sowie die Ergebnisse der *in vitro* Behandlung von PBMC mit Infliximab, dass Infliximab in der AIH nicht nur zur Normalisierung der klinischen Parameter durch die Neutralisierung von TNF sondern auch zur Reduktion der Produktion von anderen inflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , IL-17A und IL-2 führt. Aufgrund der Daten wurde nun eine klinische Studie begonnen, bei der Infliximab bei AIH Patienten als Erstlinientherapie getestet wird [AIH-MAB EUDRACT-Nr. 2017-003311-19]. Weiterhin konnten hier zusätzliche Parameter identifiziert werden, welche auf ein unzureichendes Therapieansprechen in der AIH hindeuten und als mögliche weitere Marker im peripheren Blut mit diagnostischer bzw. prognostischer Aussagekraft in Betracht kommen. Um die Wirkungsweise der anti-TNF Therapie besser zu verstehen, wurde im Weiteren die Zytokinproduktion durch T-Zellen in der AIH untersucht.

4.2 Zytokinproduktion durch CD4⁺ T-Zellen in der AIH

CD4⁺ T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AIH. So machen sie im intrahepatischen Entzündungszellinfiltrat nicht nur die größte Subpopulation aus [33-35], sondern interagieren auch mit bestimmten MHC-II Haplotypen, die mit der AIH assoziiert sind [20-26]. Außerdem erkennen CD4⁺ T-Zellen zwei der bekannten Autoantigen-Epitope in der AIH [39-41]. Neben TNF, der Zielstruktur der Infliximab Therapie (vgl. Abs. 4.1), wurde außerdem die Produktion von IFN γ , IL-17A und IL-2 untersucht. Diese anderen Zytokine wurden ausgewählt, da diese ebenfalls im Zusammenhang mit der Pathogenese der AIH diskutiert werden und für sie eine erhöhte Genexpression in LIL von AIH Patienten im Vergleich zu Kontrollen in einer vorangegangenen Arbeit einer Kollegin gezeigt wurde [47, 49, 53-55].

Durch die CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut als auch in der Leber wurde, verglichen mit den anderen untersuchten Zytokinen, TNF am stärksten produziert (vgl. Abs. 3.2.1 und 3.2.2). Hierbei war die Produktion in den Zellen der AIH Patienten gegenüber den Zellen der Kontrollpersonen signifikant erhöht. Auch ein exemplarischer RNAscope® an einer Leberbiopsie einer Patientin mit neu diagnostizierter AIH zeigte, dass die Zellen rund um das Portalfeld innerhalb des Entzündungsbereichs verstärkt TNF exprimieren

(vgl. Abs. 3.2.3). Zusätzlich waren auch TNF exprimierende Zellen im Leberparenchym nachweisbar. Der Einsatz einer zweiten Sonde gegen CD4 bestätigte die Ergebnisse der Durchflusszytometrie: Bei den TNF produzierenden Zellen handelt es sich vermehrt um CD4⁺ T-Zellen. Insgesamt erschien die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Entzündungszellinfiltrat im Gegensatz zu einer konventionellen immunhistochemischen Färbung aber vergleichsweise gering (vgl. Abbildung 1). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass beim RNAscope®, anders als bei einer immunhistochemischen Färbung, keine Proteine, sondern RNA Moleküle mittels *in situ* Hybridisierung auf Zellebene in Gewebeschnitten gefärbt werden. So detektierten Van Hoof *et al.* ebenfalls vorwiegend CD4 mRNA^{lo}/Protein^{hi} Lymphozyten bei einer simultanen durchflusszytometrischen Analyse der mRNA Expression und Proteinproduktion [202]. Dass es sich bei den hier nachgewiesenen TNF produzierenden CD4⁺ T-Zellen in der Leber und dem Blut von AIH Patienten um in der Pathogenese bedeutende autoreaktive CD4⁺ T-Zellen handelt, lassen Ergebnisse von Löhr *et al.* und einer Kollegin vermuten. Sie zeigten, dass mit LKM bzw. SLA/LP spezifisch stimulierte T-Zellen von Patienten mit einer Typ II bzw. Typ III AIH ebenfalls verstärkt TNF produzieren [47, 167]. Dies könnte eine Erklärung für das gute Ansprechen von einigen AIH Patienten auf die Behandlung mit Infliximab sein [64-66]. Ein weiteres Indiz für eine zentrale Rolle von TNF in der Pathogenese der AIH ist, dass ein -308 G > A Polymorphismus im Promotor des *TNF* Gens mit der Erkrankung und hierbei insbesondere mit dem Typ I bzw. einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert wird [203-206]. Dieser Polymorphismus führt zu einer gesteigerten *TNF* Expression [207]. Eine Bewertung der Relevanz dieser Korrelation wird allerdings dadurch erschwert, dass ebenfalls eine enge Assoziation zwischen dem TNF-Promotor-Polymorphismus und den MHC-II Haplotypen HLA-A1-B8-DR3 bzw. HLA-DRB1*03:01 besteht, welche wiederum mit der AIH bei Europäern und Nordamerikanern in Verbindung stehen [21-23, 203, 204, 206, 208]. Eine Analyse bei brasilianischen Patienten, die in der Regel nicht positiv für den Haplotyp HLA-DRB1*03 sind, deuten darauf hin, dass es sich bei der Assoziation zwischen dem TNF-Promotor-Polymorphismus und der AIH eher um einen sekundären Effekt handelt, der durch die gleichzeitige Assoziation der MHC-II Haplotypen mit der Erkrankung und dem Polymorphismus entsteht. Interessanterweise zeigten aber auch die brasilianischen AIH Typ I Patienten, welche zwar negativ für den Haplotyp HLA-DRB1*03 aber positiv für den TNF-Promotor-Polymorphismus sind, signifikant höhere γ -Globulin-Werte [209].

Die gezeigte Untersuchung einer exemplarischen Leberbiopsie mittels RNAscope® zeigte, dass im Entzündungszellinfiltrat der Leber von AIH Patienten nicht ausschließlich CD4⁺ T-Zellen TNF exprimieren (vgl. Abs. 3.2.3). Mutmaßlich handelt es sich bei weiteren TNF-positiven Zellen vor allem um Monozyten bzw. Makrophagen, da sie zu den Hauptproduzenten von TNF zählen [102, 107]. Um auszuschließen, dass die beobachtete vermehrte TNF Produktion in der AIH nicht Folge einer generell gesteigerten Produktion der Mitglieder der TNF Superfamilie ist, wurde exemplarisch die Frequenz der FasL und RANKL-positiven CD4⁺ T-Zellen analysiert (vgl. Abs. 3.3). Diese Ergebnisse, sowie ein APRIL und BAFF ELISA (ohne Abbildung) lieferten insgesamt keinen Hinweis darauf, dass neben TNF bei der Erkrankung noch weitere Liganden der TNF Superfamilie verstärkt produziert werden. TNF ist auch in der Pathogenese anderer autoimmuner Erkrankungen wie z. B. rheumatoide Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis eines der prominenten Zytokine. Dort wirkt es jeweils als entscheidender Treiber der Inflammation, indem es in autokriner und parakriner Weise Immunzellen aktiviert, ihre Proliferation und Differenzierung induziert, sowie die Produktion von anderen Zytokinen anregt [210-213]. So beschrieben erst kürzlich Jain *et al.*, dass TNF produzierende CD4⁺ T-Zellen, welche ebenfalls membrangebundenen FasL trugen, über diese beiden Faktoren die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β durch APCs induzieren, dessen Expression wiederum mit der Ausbildung einer Autoimmunität assoziiert wird [214]. Hinweise darauf, dass IL-1 β ebenfalls an der Pathogenese der AIH beteiligt sein könnte, lieferten Daten aus einem Mausmodell einer entzündungsabhängigen Hepatitis [215]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TNF zu einer Reduktion der suppressiven Wirkung von Treg und somit zur konsekutiven Proliferation von CD4⁺ Th1 und Th17 Zellen führt [216].

Neben TNF produzierten die CD4⁺ T-Zellen im Blut der AIH Patienten, nicht aber in der Leber, signifikant mehr IFN γ als die Zellen der Kontrollen (vgl. Abs. 3.2.1 und 3.2.2). Dies spricht für einen vorwiegend Th1 Phänotyp der Zellen, deren charakteristisches Zytokin IFN γ ist [81]. Auch frühere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen IFN γ und der AIH. So produzieren mit LKM bzw. SLA/LP stimulierte autoreaktive T-Zellen von Patienten mit einer Typ II bzw. Typ III AIH neben TNF ebenfalls vermehrt IFN γ [47, 49, 167]. Außerdem konnten in Leberhistologien von pädiatrischen AIH Patienten neben Zellen welche TNF produzierten auch IFN γ -positive Zellen nachgewiesen werden [217]. Ferner lassen Daten aus einem Mausmodell einer entzündungsabhängigen Hepatitis vermuten, dass IFN γ , möglicherweise in Synergie mit TNF, eine MLKL (Mixed lineage kinase domain-like

protein) vermittelte Nekroptose der Hepatozyten in der AIH induziert [218]. So verwundert es nicht, dass eine IFN γ vermittelte Pathogenese auch für andere autoimmune Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Diabetes mellitus Typ I und MS diskutiert wird [219-221].

Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, dass ein großer Teil der TNF produzierenden CD4⁺ T-Zellen zusätzlich auch IFN γ sezernieren (vgl. Abs. 3.2.4). Dies spricht für einen vorwiegenden Th1 Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen in der AIH, die zusätzlich große Mengen an TNF produzieren [77] und deutet auf einen pathogenetisch relevanten und spezifischen Phänotyp dieser Zellen hin. Bei TNF / IFN γ -doppelt-positiven T-Zellen handelt es sich in der Regel um hochfunktionale, aktivierte Zellen, die eine zentrale Rolle in der Pathogenabwehr spielen. Dabei wirken die beiden Zytokine in synergistischer Weise [162-164]. So kann IFN γ z. B. die Zunahme der TNF-R-Dichte auf der Zelloberfläche induzieren und so den TNF-Effekt verstärken [222]. Außerdem konnten Kannanganat *et al.* zeigen, dass virusspezifische CD4⁺ T-Zellen, die zwei oder mehr funktionale Zytokine gleichzeitig produzierten, besser in der Lage waren, eine Virusinfektion zu bekämpfen. Hierbei produzierten die Mehrfachproduzenten nicht nur eine größere Auswahl an Zytokinen, sondern auch pro Zelle mengenmäßig mehr von den jeweiligen Zytokinen, als Zellen, die nur eins der Zytokine produzierten. Zusätzlich war die Präsenz des kostimulierenden Oberflächenmoleküls CD40L auf diesen Zellen höher. Insgesamt sprechen diese Beobachtungen für einen hohen Aktivierungsstatus der Zellen [223]. Außerdem wurde mehrfach beschrieben, dass aktivierte TNF / IFN γ -doppelt-positive T-Zellen häufig zusätzlich IL-2 produzieren und diese dreifach-positiven Zellen zum Teil eine stärkere Funktionalität bei der Pathogenabwehr aufweisen, als doppelt-positive Zellen [162, 164, 223].

Im Blut, nicht aber in der Leber der AIH Patienten war die Anzahl an IL-2 produzierenden CD4⁺ T-Zellen gegenüber der im Blut der Kontrollpersonen signifikant erhöht (vgl. Abs. 3.2.1 und 3.2.2). Vermutlich handelt es sich bei diesen Zellen daher ebenfalls um diese hochfunktionalen TNF / IFN γ / IL-2-dreifach-positive CD4⁺ T-Zellen, zumal eine fehlgeleitete Immunantwort nach einer Virusinfektion (z. B. Virushepatitis, Epstein-Barr-Virus) als möglicher Auslöser in der AIH diskutiert wird [224-226]. Diese Dreifach-Positivität muss jedoch noch untersucht werden. Generell ist IL-2 zusammen mit seinem Rezeptor eher ein Marker für den Aktivierungsstatus der T-Zellen, da beide vor allem nach einer T-Zell-Rezeptor vermittelten Induktion der T-Zellen produziert werden. IL-2 reguliert dann in vorwiegend autokriner Weise die Differenzierung, Expansion und Homöostase der T-Zellen, wobei es insbesondere für das Überleben und die

Aufrechterhaltung der supprimierenden Funktion von Treg notwendig ist [130, 131]. Dies steht im Widerspruch zu der diskutierten verminderte Treg Präsenz bzw. Funktion in der AIH [194, 195]. Bei neueren Analysen, bei denen spezifischere Zellmarker bei der Identifizierung der Treg eingesetzt wurden, war hingegen kein Unterschied in der Zahl oder Funktion dieser Zellen in der AIH gegenüber Kontrollen nachweisbar. Im Gegenteil konnte hier sogar eine erhöhte Frequenz an Treg im Zellinfiltrat der Leber von unbehandelten AIH Patienten bzw. Patienten mit einer gesteigerten Krankheitsaktivität gezeigt werden [53, 196]. Die Abnahme dieser korrelierte während einer erfolgreichen Therapie von Kindern mit einer Type II AIH mit sinkenden IL-2 Serumlevel [53].

Im Gegensatz zu TNF, IFN γ und IL-2 war die IL-17A Produktion durch die CD4⁺ T-Zellen im Blut und der Leber sowohl bei den AIH Patienten, als auch bei den Kontrollen vernachlässigbar gering (vgl. Abs. 3.2.1 und 3.2.2). Gleichzeitig konnten keine Unterschiede bei der IL-17A Produktion zwischen den beiden Untersuchungsgruppen festgestellt werden. Auch eine Kollegin konnte in einer vorangegangenen Arbeit keine veränderte *IL17A* Expression in PBMC oder LIL von AIH Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen feststellen [55]. Möglicherweise ist die erhöhte IL-2 Produktion ein Grund hierfür, da IL-2 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17 Zellen inhibiert [130, 131]. Interessanterweise kann die IL-2 Produktion durch die Bindung von mTNF an den TNF-RII induziert und somit die Th17 Differenzierung gehemmt werden [190, 227]. Die hier festgestellte geringe und unveränderte IL-17 Produktion widerspricht anderen Studien, wonach bei AIH Patienten eine erhöhte Frequenz an Th17 Zellen beschrieben wurde [54, 181]. Da es sich bei der AIH um eine heterogene Erkrankung handelt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich nicht auch Subtypen in ihrem Zytokinprofil unterscheiden [20-26, 42, 43]. Hierfür spricht, dass Thomas-Dupont *et al.* bei Patienten mit einer Typ II AIH signifikant höhere IL-21 und IL-22 Serumlevel gemessen haben als bei AIH Typ I Patienten [52]. Auch fehlgeschlagene individuelle Heilversuche AIH Patienten mit einer Therapie außerhalb des eigentlichen Zulassungsbereichs mit einem Antagonisten der IL-23 / IL-17 Achse (Ustekinumab) zu behandeln, deuten darauf hin, dass IL-17 nicht entscheidend zur Pathogenese der AIH beiträgt [228, 229].

Zusammengefasst verdeutlichen die Ergebnisse, dass es sich bei den CD4⁺ T-Zellen im Blut und in der Leber von AIH Patienten, welche mutmaßlich in der Pathogenese der Erkrankung eine zentrale Rolle spielen, um hochfunktionale, aktivierte Th1 Zellen handelt, die sich vor allem durch eine starke Produktion von TNF, aber auch IFN γ und IL-2 charakterisieren

lassen. Hingegen scheint die IL-17A Produktion durch diese Zellen in der Pathogenese nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.3 Zytotoxische T-Zellen in der AIH

Neben den CD4⁺ Th-Zellen bilden die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen die zweite große Gruppe innerhalb der T-Zellen [67]. Sie sind entscheidend an der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen und tumorös veränderten Zellen beteiligt, indem sie über unter anderem die Sezernierung von zytotoxischen Proteinen die Apoptose dieser Zellen einleiten [87-90]. Zu diesen Proteinen gehören z. B. Perforin, Serinproteasen und antimikrobielle Peptide. Diese werden von den Zellen in speziellen zytotoxischen Granula gespeichert und per Exozytose freigesetzt [88]. Für einige dieser zytotoxischen Proteine zeigte ein qRT-PCR basiertes Testverfahren eine veränderte Genexpression in LIL von AIH Patienten verglichen mit Kontrollen [unveröffentlichte Daten]. Dazu passend gibt es Hinweise aus der Literatur, dass zytotoxische Zellen mit der Pathogenese einiger autoimmuner Erkrankungen wie z. B. MS, SLE, Diabetes mellitus Typ I und Sjögren Syndrom assoziiert sind [230-233]. In den hier gezeigten Daten war kein Unterschied in Bezug auf die Sezernierung von zytotoxischen Molekülen durch CD8⁺ T-Zellen zwischen AIH und Kontrollen ersichtlich (vgl. Abs. 3.4.2). Dies spricht gegen eine wesentliche Beteiligung dieses Zelltypus an der Pathogenese der Erkrankung. Um endgültig eine pathogenetische Relevanz von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen an der AIH auszuschließen, müsste zukünftig noch die Sezernierung der zytotoxischen Moleküle durch LIL ergänzt werden, da bei den hier gezeigten Daten nur T-Zellen im Blut analysiert wurden. Ebenfalls konnte kein Unterschied in der Produktion des Transkriptionsfaktors EOMES, der neben anderen Faktoren die Genexpression von *PRF1*, *GZMB* und *IFNG* kontrolliert, festgestellt werden [95].

Da auch CD4⁺ T-Zellen einen zytotoxischen Phänotyp annehmen können, wurde ebenfalls in diesen Zellen die Granulysin, Perforin oder Granzym B Produktion analysiert (vgl. Abs. 3.4.1) [97]. Verglichen zu den CD8⁺ T-Zellen war wie erwartet die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen, welche positiv für diese Proteine sind, generell geringer und unterschieden sich gleichermaßen nicht zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen. Auch bei diesen Zellen wurde zusätzlich die Produktion des Transkriptionsfaktors EOMES untersucht, da er unter anderem auch bei der Annahme des zytotoxischen Phänotyps durch CD4⁺ T-Zellen beteiligt ist [98, 99]. Außerdem war die EOMES Produktion in diesen Zellen von besonderem Interesse, da er in bestimmten pathogenen Th1 Zellen die *IFNG* Expression kontrolliert und

wie zuvor beschrieben, in der AIH ebenfalls IFN γ produzierende Th1 Zellen in der Pathogenese eine zentrale Rolle zu spielen scheinen [96]. Auch hier zeigte sich kein Unterschied in der EOMES Produktion zwischen den AIH Patienten und den Kontrollen. Insgesamt ist festzustellen, dass Zytotoxizität durch CD4⁺ T-Zellen keinen relevanten Anteil an der Pathogenese der AIH trägt, obwohl auch hier abschließend ebenfalls die Untersuchung der LIL noch aussteht. Folglich sind zytotoxische T-Zellen mutmaßlich nicht ursächlich für die bei der AIH häufig auftretende Nekrose und/oder Apoptose der Hepatozyten bzw. Gewebeschädigungen wie z. B. einer Fibrose [4, 5].

Neben den zytotoxischen Proteinen wurde ebenfalls die Produktion von CCL5, einem Chemokin, welches nicht nur Leukozyten und T-Zellen chemotaktisch zum Entzündungsort lockt, sondern zusätzlich auch die Aktivierung von Th1- und zytotoxischen T-Zellen unterstützt, analysiert [146, 148, 149]. Vor der Stimulation bestand weder bei den CD4⁺ T-Zellen, noch bei den CD8⁺ T-Zellen ein Unterschied zwischen den AIH Patienten und den Gesundkontrollen in der Anzahl an Zellen, welche CCL5 in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichert hatten (vgl. Abs. 3.4.1 und 3.4.2). Interessanterweise waren aber nach der Stimulation signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen der AIH Patienten positiv für CCL5, als Zellen der Kontrollen. Auch bei den CD8⁺ T-Zellen war die Anzahl höher, wobei der Unterschied bei diesen Zellen allerdings nicht signifikant war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellen der gesunden Personen, anders als die der Patienten, insgesamt zwar gespeichertes CCL5 durch die Stimulation ausschütten, diese Speicher aber nicht direkt durch eine gesteigerte Produktion wieder auffüllen, da bei beiden T-Zellgruppen jeweils vor der Stimulation signifikant mehr Zellen bei diesen Personen positiv für CCL5 waren, als nach der Stimulation. Andererseits könnten die Ergebnisse auch so gedeutet werden, dass die Zellen der gesunden Personen ihr gespeichertes CCL5 durch die Stimulation sezernieren, die der AIH Patienten dies aber nicht tun. Um dieses genauer zu differenzieren, müsste zukünftig z. B. die sezernierte CCL5 Menge im Überstand der Zellkulturen nach der Stimulation verglichen werden. Für die erste Hypothese spricht allerdings, dass TNF, welches bei den AIH Patienten vermehrt produziert wird, durch Bindung an seinen Rezeptor die Transkription von *CCL5* induzieren kann [234, 235]. Ferner konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass CCL5 entscheidend an der Leberfibrogenese beteiligt ist, welche bei chronischen Lebererkrankungen Ausdruck der anhaltenden intrahepatischen Entzündungsaktivität ist [4, 236]. Die vermehrte CCL5 Positivität von Zellen bei der AIH

würde daher gut das erhebliche fibrogenetische Potential bei der AIH erklären, welche häufig frühzeitig und schnell zur Leberfibrose bzw. Leberzirrhose führen kann [4].

Alles in allem scheinen zytotoxische CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese der AIH keine entscheidende Rolle zu spielen. Das Chemokin CCL5 wird vermutlich hingegen bei den Patienten verstärkt produziert und unterstützt damit die Inflammation, indem es T-Zellen chemotaktisch zum Entzündungsort lockt und sie aktiviert. Ferner erklärt dies die zunehmende fibrotische Vernarbung der Leber.

4.4 Koloniestimulierende Faktoren in der AIH

Auch die Gene der koloniestimulierenden Faktoren M-CSF und GM-CSF sind, wie Vordaten zeigten, in der AIH relevant hochreguliert [167]. Diese Faktoren, zu denen auch noch G-CSF zählt, regulieren die Proliferation und Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen zu Monozyten bzw. Makrophagen, Granulozyten und Neutrophilen, sowie deren Aktivierung und Überleben [135, 136, 139-141]. Die hier gezeigten Daten zur M-CSF Produktion veranschaulichen, dass dieses Zytokin vorrangig durch CD3⁺ Zellen produziert wurde und dass insbesondere der Anteil an M-CSF-positiven unstimulierten Zellen der AIH Patienten gegenüber den Kontrollen erhöht war (vgl. Abs. 3.5.1 und 3.5.2). Die Tatsache, dass im Besonderen die unstimulierten Zellen positiv für M-CSF waren, ist darin begründet, dass M-CSF, anders als GM-CSF und G-CSF, nicht nur als lösliches Zytokin über sekretorische Vesikel von den Zellen sezerniert wird, sondern auch als membrangebundenes oder membranassoziertes Oberflächenprotein auf den Zellen vorliegt. Außerdem wird es von vielen Zellen in gewissem Maße konstitutiv produziert [134, 136-138]. Eine Analyse der M-CSF-positiven CD3⁺ Zellen bei den AIH Patienten ergab, dass es sich bei diesen Zellen hauptsächlich um Makrophagen und in deutlich geringerer Anzahl um Monozyten und Eosinophile handelte (vgl. Abs. 3.5.3). Die gesteigerte M-CSF Produktion vor der Stimulation spricht für einen höheren Grundaktivierungszustand dieser Zellen bei den AIH Patienten. Auch frühere Daten deuten darauf hin, dass es sich bei den Makrophagen in der Leber von AIH Patienten vor allem um aktivierte Zellen handelt [237]. Außerdem ist IFN γ , welches in der AIH vermehrt von CD4⁺ T-Zellen produziert wird, ein starker Aktivator von Makrophagen [126]. Eine unkontrollierte Aktivierung von Makrophagen ist ebenfalls mit der Pathogenese von anderen chronisch entzündlichen bzw. autoimmunen Erkrankungen wie z. B. MS, rheumatoiden Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Arteriosklerose, aber auch Gewebeschädigungen wie z. B. einer Fibrose assoziiert, wie sie

auch häufig bei der AIH auftritt [4, 238-240]. Hierbei produzieren sie unter anderem reaktive Sauerstoffspezies, die neben der Abtötung von Pathogenen und tumorös veränderten Zellen auch zu Gewebeschäden führen können. Des Weiteren aktivieren sie T- und B-Zellen durch die Präsentation von Fremd- oder Selbstantigenen, welche durch die Phagozytose und Prozessierung von Pathogenen, Zellfragmenten, beschädigten und toten Zellen entstehen [37, 69-72]. Neben M-CSF ist auch TNF eines der Leitzytokine von Makrophagen [72]. Allerdings spielt dies in der AIH nur eine untergeordnete Rolle, was sich durch den fehlenden Unterschied in der TNF Produktion dieser Zellen in den untersuchten Kohorten zeigte (vgl. Abs. 3.5.3). Somit werden M-CSF und TNF in der AIH von jeweils unterschiedlichen Immunzellen verstärkt produziert, wobei für die Freisetzung der jeweiligen membrangebundenen Form das gleiche Enzym (ADAM-17) verantwortlich ist (vgl. Abs. 4.5) [114-116].

GM-CSF wurde im Gegensatz zu M-CSF im Blut insgesamt nur von wenigen Zellen produziert (vgl. Abs. 3.5.1). Hierbei war die Produktion in den CD4⁺ T-Zellen der AIH Patienten signifikant höher, als bei den Zellen der Gesundkontrollen. Auch die CD3⁺ Zellen der Patienten produzierten mehr GM-CSF als die der Kontrollpersonen, wobei der Unterschied hier nicht signifikant war. In der Leber unterschied sich die Produktion bei den CD3⁺ T-Zellen nicht zwischen den beiden Personengruppen (vgl. Abs. 3.5.2). Bei Betrachtung der CD3⁺ Zellen war hingegen die Anzahl an GM-CSF-positiven Zellen bei den Patienten signifikant höher. Eine erhöhte GM-CSF Produktion, vor allem in der Leber, überraschte hierbei nicht, da dieses Zytokin insbesondere mit Gewebsentzündungen assoziiert wird. Dabei wird es vermehrt von T-Zellen sezerniert, wodurch die Phagozyten aktiviert werden, welche häufig als Hauptursache der Gewebeschäden angesehen werden [241, 242]. So wird GM-CSF mit der Pathogenese von chronisch entzündlichen, autoimmunen Erkrankungen wie z. B. rheumatoiden Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und MS assoziiert [243-245]. Außerdem kann es die Aktivierung von T-Zellen indirekt durch die Induktion der Proliferation und Differenzierung von APCs fördern, die Antigene an diese präsentieren [37, 139, 140]. Interessanterweise ist des Weiteren beschrieben, dass Infliximab die GM-CSF Produktion durch T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn verringern kann [246].

Anders als die M-CSF und GM-CSF Produktion war die Anzahl an G-CSF-positiven CD4⁺ T-Zellen und CD3⁺ Zellen sowohl im Blut der AIH Patienten, als auch der Kontrollpersonen vernachlässigbar gering (vgl. Abs. 3.5.1). Hierbei unterschied sich der Anteil an G-CSF produzierenden Zellen nicht zwischen den beiden Untersuchungsgruppen. Somit scheint

G-CSF in der Pathogenese der AIH keine entscheidende Rolle zu spielen. Über die Rolle von G-CSF in anderen autoimmunen Erkrankungen, ist bisher wenig bekannt. Allerdings konnte in einem Mausmodell einer rheumatoiden Arthritis gezeigt werden, dass der G-CSF Level im Serum und in den entzündeten Pfoten der Mäuse erhöht ist, sowie dass eine Gabe eines anti-G-CSF Wirkstoffes die Symptome in diesen Mäusen verbessert [247]. In einem anderen Mausmodell für MS wurde hingegen gezeigt, dass die Gabe von G-CSF die Apoptose von autoreaktiven T-Zellen induzieren kann [248]. In der klinischen Anwendung ist G-CSF bisher kaum mit autoimmunen Erkrankungen assoziiert worden [249-251].

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass neben den hochfunktionalen, aktivierten Th1 Zellen auch noch aktivierte Makrophagen, welche verstärkt M-CSF produzieren, an der Pathogenese der AIH beteiligt sind. Diese werden vermutlich unter anderem sowohl durch die erhöhte IFN γ , als auch durch eine gesteigerte GM-CSF Produktion durch CD4⁺ T-Zellen aktiviert und sind mitverantwortlich für die häufig bei der AIH auftretende Leberfibrose.

4.5 ADAM-17 in der AIH

Bei ADAM-17 handelt es sich um eine membrangebundene Metalloproteinase, welche unter anderem die Freisetzung der jeweiligen membrangebundenen Form der Zytokine TNF und M-CSF, welche vermehrt in der AIH produziert werden (vgl. Abs. 4.2 und 4.4), katalysiert [114-117]. Im Gegensatz zu mTNF, welches an beide TNF Rezeptoren bindet, interagiert lösliches TNF nur mit dem TNF-RI [112]. Dessen Aktivierung leitet vornehmlich die Apoptose bzw. Nekroptose der Zelle ein, während der TNF-RII das Überleben und die Proliferation der Zelle bewirkt (vgl. Abbildung 2). Daher kann eine Störung des Gleichgewichts zwischen löslichem TNF und mTNF, eine veränderte Bindungskapazität der Rezeptoren oder eine defekte Signalweiterleitung zu einer fehlerhaften Immunantwort und einer Autoimmunität führen. So können z. B. autoreaktive T-Zellen anstelle eines apoptotischen ein proinflammatorisches Signal erhalten oder es wird statt der Proliferation eine Apoptose von supprimierenden Treg induziert [109, 111]. Die hier gezeigten Daten zur Freisetzung des ADAM-17 Substrats CD62L (vgl. Abs 3.6.1) lassen vermuten, dass in der AIH eine verstärkte Präsenz oder Aktivität des Enzyms ADAM-17 vorliegt. Allerdings sind diese Ergebnisse hierfür noch kein eindeutiger Beleg, da sie aufgrund einer generellen raschen CD62L Freisetzung durch aktivierte Leukozyten ebenfalls als Folge einer erhöhten Anzahl an aktivierter Zellen in der AIH gedeutet werden können [171-173]. So wird der Level an

gelöstem CD62L im Serum bzw. Plasma als Marker für die Entzündungsaktivität während einer chronischen oder akuten Entzündungsreaktion wie z. B. bei SLE, Diabetes mellitus Typ I oder atopischer Dermatitis diskutiert [252-254]. Daher wurde zusätzlich die Konzentration der freigesetzten ADAM-17 Substrate TNF-RI und M-CSF im Plasma bzw. Serum bestimmt (vgl. Abs. 3.6.1). Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte TNF-RI Serumkonzentration bei den AIH Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen, was wiederum für eine erhöhte Freisetzung durch ADAM-17 spricht. Hingegen war bei der M-CSF Konzentration im Plasma kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellbar, was im Widerspruch zu den vorherigen Daten steht. Hierbei könnten aber die insgesamt von der normalen Serumkonzentration (2,4 – 10 ng/ml) deutlich abweichenden gemessenen M-CSF Konzentrationen (AIH: 31,31 pg/ml bzw. Kontrollen: 35,71 pg/ml) auf ein methodisches Problem hindeuten [135, 137, 255]. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass in der AIH die Expression bzw. Aktivierung von ADAM-17 nur in einzelnen Zelltypen fehlgesteuert ist, insbesondere da diese über verschiedenste Mechanismen in den Zellen reguliert wird (vgl. Abbildung 4) [113, 120-123]. So wurde M-CSF in der AIH hauptsächlich von Makrophagen produziert (vgl. Abs. 4.4), während das andere ADAM-17 Substrat TNF verstärkt durch CD4⁺ T-Zellen produziert wurde (vgl. Abs. 4.2). Für Letzteres ist wiederum eine erhöhte Serumkonzentration bei AIH Patienten beschrieben [50, 51], wobei dessen Freisetzung in Abhängigkeit des Enzyms ADAM-17 erfolgte, was die Untersuchung der TNF Freisetzung durch PBMC von AIH Patienten unter dem Einfluss eines ADAM-10 / ADAM-17 bzw. ADAM-10 Inhibitors bestätigte (vgl. Abs. 3.6.2). Auch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie deuten auf eine stärkere Präsenz oder Aktivität von ADAM-17 nur in bestimmten Zelltypen - mutmaßlich CD4⁺ T-Zellen - in der AIH hin, da sich vor allem die unstimulierten CD3⁻ Zellen der AIH Patienten positiv für M-CSF zeigten (vgl. Abs. 4.4), wobei es sich vermutlich hauptsächlich um membrangebundenes M-CSF handelte [136-138]. Sollte es sich tatsächlich in der AIH um eine selektiv in den CD4⁺ T-Zellen erhöhte ADAM-17 Präsenz bzw. Aktivität handeln, sind diese Zellen vermutlich ebenfalls der Ursprung der im Serum erhöhten TNF-RI Konzentration. Dies könnte gleichzeitig eine Erklärung für die mutmaßlich verminderte Apoptose der autoreaktiven T-Zellen liefern, da wie oben beschrieben der TNF-RI vornämlich die Apoptose bzw. Nekroptose der Zelle induziert. Ferner könnte die verstärkte Freisetzung von TNF mitverantwortlich für die Apoptose bzw. Nekroptose von z. B. den Hepatozyten in der AIH sein, da lösliches TNF ausschließlich mit diesem ubiquitär vorkommenden TNF-RI interagiert (vgl. Abbildung 2) [109, 111, 112].

Dazu passend gibt es Hinweise aus einem Mausmodell einer entzündungsabhängigen Hepatitis, dass die Nekroptose der Hepatozyten in der AIH durch die Rezeptor-interagierenden Serin/Threonin-Proteinkinase 1 (RIPK1) und die Pseudokinase MLKL vermittelt wird, wobei IFN γ die *Mkl* Genexpression induziert und vermutlich TNF in synergistischer Weise an der Aktivierung von MLKL beteiligt ist [218]. Sowohl RIPK1 als auch MLKL sind zentrale Moleküle des TNF-RI Signalwegs [109, 256]. In der Literatur wird die Nekroptose anders als die Apoptose als proinflammatorisch beschrieben, da bei ihr durch die untergehenden Zellen Schaden-assoziierte molekulare Muster freigesetzt werden, die von PRRs erkannt werden und somit weitere Entzündungsreaktionen auslösen können [257]. Einen Weitem Hinweis auf eine zentrale Rolle des TNF-RI beim Zelltod der Hepatozyten in der AIH lieferte ebenfalls das Mausmodell einer entzündungsabhängigen Hepatitis, bei dem TNF-RI negative Tiere weniger Gewebeschäden nach der Induktion der Hepatitis entwickelten [258]. Um abschließend die Hypothese der selektiv erhöhten ADAM-17 Präsenz bzw. Aktivität in einzelnen Zelltypen in der AIH zu bestätigen, müsste zukünftig eine Untersuchung der Freisetzung der ADAM-17 Substrate durch verschiedenste isolierte Zellsubpopulationen erfolgen.

Zur näheren Eingrenzung, ob die verstärkte Freisetzung der ADAM-17 Substrate in der AIH Folge einer erhöhten Genexpression oder Aktivität des Enzyms ist, wurde die *ADAM17* Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Hierbei konnte aber weder bei den PBMC, noch bei den LIL ein Hinweis auf eine veränderte Genexpression festgestellt werden (vgl. Abs. 3.6.3). Da die ADAM-17 Aktivität nicht nur über die Transkription, sondern auch über posttranslationale Modifikationen des Proteins wie z. B. der Abspaltung der inhibierenden Pro-Domäne reguliert werden kann, wurde zusätzlich die vorliegende Proteinmenge des inaktiven ADAM-17 Vorläuferproteins sowie die Proteinmenge des reifen Proteins ohne die Pro-Domäne mittels Western Blot in PBMC untersucht [120]. Hier zeigte sich, dass bei AIH Patienten im Vergleich zu gesunden Personen mehr aktives ADAM-17 in den Zellen vorlag, während sich die Proteinmenge für die inaktive Form zwischen den beiden Untersuchungsgruppen nicht unterschied (vgl. Abs. 3.6.4). Dies spricht für eine höhere ADAM-17 Aktivität in Zellen von AIH Patienten, wobei eine endgültige Bestätigung dieser Ergebnisse aber aufgrund der bisherigen geringen Probenanzahl noch aussteht. Auch bei anderen entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Psoriasis, rheumatoider Arthritis und MS wird eine verstärkte ADAM-17 Aktivität diskutiert [259-263]. Beispielsweise gibt es Hinweise, dass bei Morbus Crohn Patienten eine Interaktion der

Mukosa assoziierten T-Zellen mit einem Komplex bestehend aus löslichem IL-6 und löslichem IL-6-Rezeptor die Apoptose dieser Zellen verhindert, wobei der Rezeptor durch ADAM-17 freigesetzt wurde [117, 264]. Als eine mögliche Ursache der veränderten ADAM-17 Aktivität wird unter anderem eine Störung des intrazellulären Transport von ADAM-17 vermutet, welcher entscheidend an der Aktivierung des Enzyms beteiligt ist (vgl. Abbildung 4) [113, 121-123, 265]. Des Weiteren wird eine verstärkte ADAM-17 Aktivität auch mit fibrotischen Prozessen assoziiert, wie sie häufig bei der AIH auftritt. So konnte bei Patienten mit einer Nierenfibrose verschiedenster Genese eine verstärkte ADAM-17 Aktivität und eine daraus resultierende erhöhte Freisetzung der ADAM-17 Substrate TNF und Amphiregulin gezeigt werden, die signifikant mit der Fibroseaktivität korrelierten [4, 266]. Entsprechend zeigten Daten aus einem Mausmodell einer entzündungsabhängigen Hepatitis bei der die Tiere mit einem selektiven ADAM-17 Inhibitor behandelt wurden, dass eine anti-ADAM-17 Therapie die Entzündungs- bzw. Fibroseaktivität in der Leber reduzieren kann [267]. Beim Menschen hingegen ist eine therapeutische Inhibierung von ADAM-17 bisher nicht möglich, da putative Medikamente bislang auf Grund von Nebenwirkungen oder dem ausbleibenden Nachweis einer Wirksamkeit stets in klinischen Studien scheiterten. Daher wird parallel an Wirkstoffen geforscht, welche an Strukturen des intrazellulären ADAM-17 Transports und damit in die Aktivierung des Enzyms eingreifen [265, 268].

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse auf eine verstärkte Aktivität von ADAM-17, mutmaßlich selektiv in CD4⁺ T-Zellen von AIH Patienten hin. Diese führt möglicherweise zu einer reduzierten Apoptoserate in autoraktiven CD4⁺ T-Zellen und fördert die Leberfibrose. Daher könnte ADAM-17 als putative Zielstruktur einer zukünftigen Therapiestrategie dienen.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten bei der Analyse der Zytokinproduktion durch periphere Blutzellen parallel zu klinischen Parametern einer Patientin, welche auf Grund einer schwer zu behandelnden AIH mit dem anti-TNF Antikörper Infliximab behandelt wurde, mögliche zusätzliche Parameter identifiziert werden, welche Rückschlüsse auf ein unzureichendes Therapieansprechen in der AIH zulassen. Ob sich diese Marker in der Praxis als zusätzliche Marker in der Diagnostik bzw. zu prognostischen Aussagen hinsichtlich eines Therapieerfolges praktikabel einsetzen lassen, sowie ob sich hierbei Grenzwerte definieren

lassen, müssen zukünftige Untersuchungen noch zeigen. Eine mögliche Erklärung für das gute Ansprechen einiger AIH Patienten auf die Infliximab Behandlung lieferten außerdem die Ergebnisse zur Zytokinproduktion in CD4⁺ T-Zellen, wonach es sich bei diesen Zellen von AIH Patienten um hochfunktionale, aktivierte Th1 Zellen, welche sich vor allem durch eine starke TNF, aber auch IFN γ und IL-2 Produktion kennzeichnen lassen handelte. Ob sich dieses Medikament neben dem Einsatz bei schwer zu behandelnden Patienten auch als Erstlinientherapie in der AIH eignet, muss die bereits begonnene Klinische Studie [AIH-MAB EUDRACT-Nr. 2017-003311-19] in Zukunft noch zeigen. Erste Ergebnisse deuten auf ein gutes Therapieansprechen der Patienten hin.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an Leberbiopsien von AIH Patienten stehen des Weiteren noch abschließende Untersuchungen zur Rolle von zytotoxischen T-Zellen in der AIH aus. Die Ergebnisse aus dem Blut deuteten hierbei aber auf keine relevante Beteiligung dieser Zellen an der Pathogenese hin. Außerdem müsste noch die sezernierte Menge an CCL5 durch stimulierte Zellen von AIH Patienten bestimmt werden, um auszuschließen, dass es sich bei der erhöhten Anzahl an CCL5-positiven Zellen nach der Stimulation nicht um einen Defekt im Ausschüttungsprozess handelt.

Abschließend deuten die Versuche zur Rolle von ADAM-17 in der AIH auf eine verstärkte Aktivität dieses Enzyms hin. Hierbei steht aber aufgrund der bisherigen geringen Probenanzahl noch der endgültige Beleg aus. Weiterhin liefern die Ergebnisse Hinweise für eine selektiv erhöhte Aktivität mutmaßlich nur in den CD4⁺ T-Zellen. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste zukünftig eine weitere Analyse der ADAM-17 Aktivität in verschiedenen isolierten Zellsubpopulationen erfolgen. Alles in allem könnte es sich bei ADAM-17 um eine neue Zielstruktur einer zukünftigen Therapie der AIH handeln. Ob eine medikamentöse Inhibierung von ADAM-17 beim Menschen in der Praxis aber möglich ist, müssen ebenfalls noch künftige Versuche zeigen.

5. Zusammenfassung

Bei der autoimmunen Hepatitis (AIH) handelt es sich um eine seltene chronisch-entzündliche Lebererkrankung, dessen Pathogenese bis heute weitgehend ungeklärt ist. Daher ist eine gezielte Behandlung derzeit nicht möglich, was in der Regel eine systemische Immunsuppression erforderlich macht. Diese Standardtherapie führt aber nicht in allen Fällen zu einer vollständigen Remission (d. h. Normalisierung der biochemischen und histologischen Merkmale der Erkrankung) bzw. es treten therapielimitierende Nebenwirkungen auf. Daher ist es notwendig, neue krankheitsspezifische Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, wofür ein besseres Verständnis der Pathogenese erforderlich ist. Eine mögliche alternative Therapiestrategie stellt eine Behandlung mit dem monoklonalen anti-TNF Antikörper Infliximab außerhalb des behördlich zugelassenen Indikationsbereichs dar, welche sich bereits bei einigen Fällen mit einer schwer zu behandelnden AIH als erfolgreich erwies. In dieser Arbeit konnte nun anhand des klinischen Verlaufs und der parallelen Analyse der Zytokinproduktion einer Patientin unter Infliximab-Therapie, sowie durch die Ergebnisse einer *in vitro* Behandlung von PBMC mit Infliximab gezeigt werden, dass unter einer solchen Therapie sich nicht nur die klinischen Parameter normalisieren, sondern es parallel zur Reduktion der Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 kommt. Möglicherweise können diese identifizierten Parameter zukünftig als zusätzliche Marker im peripheren Blut in der Diagnostik bzw. für prognostische Aussagen hinsichtlich eines Therapieerfolges eingesetzt werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollten CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut und der Leber von AIH Patienten genauer charakterisiert werden, da einiges darauf hindeutet, dass diese Zellen an der Pathogenese der AIH in besonderer Weise beteiligt sind. Die Analyse der CD4⁺ T-Zellen zeigte, dass es sich bei diesen Zellen sowohl im Blut als auch in der Leber vorrangig um TNF-produzierende Zellen handelte, welche zusätzlich ebenfalls vermehrt IFN γ und IL-2 produzierten, was auf einen hochfunktionalen, aktivierten Th1 Phänotyp dieser Zellen hinweist. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das gute Ansprechen einiger AIH Patienten auf die Infliximab Behandlung sein. Ferner wird das Chemokin CCL5 bei den AIH Patienten verstärkt produziert, welches vermutlich mittels Chemotaxis der T-Zellen die Inflammation unterstützt und an der zunehmenden fibrotischen Vernarbung der Leber beteiligt ist. Die IL-17A Produktion scheint hingegen, ebenfalls wie zytotoxische T-Zellen, in

der Pathogenese der AIH nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass neben den Th1 Zellen auch noch aktivierte Makrophagen, welche verstärkt M-CSF produzieren, an der Pathogenese und hier mutmaßlich an der Leberfibrose beteiligt sind. Diese werden vermutlich durch die CD4⁺ T-Zellen aktiviert, die sich weiterhin durch eine gesteigerte GM-CSF Produktion kennzeichneten.

Abschließend sollte die Aktivität und Präsenz des Enzyms ADAM-17 in der AIH analysiert werden, da dieses die Freisetzung von TNF katalysiert. Die Ergebnisse deuten auf eine verstärkte ADAM-17 Aktivität mutmaßlich selektiv nur in den CD4⁺ T-Zellen hin, was möglicherweise durch eine verstärkte Freisetzung des Apoptose-induzierenden TNF-RI zu einer reduzierten Apoptoserate in diesen Zellen führt. Außerdem könnte diese erhöhte Enzymaktivität die Leberfibrose fördern, indem vermehrt pro-fibrotische Zytokine freigesetzt werden. Alles in allem könnte daher ADAM-17 als eine neue Zielstruktur einer zukünftigen AIH Therapiestrategie dienen.

5.1 Summary

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory liver disease of unknown etiology and the mechanisms underlying disease pathogenesis are not fully understood. Therefore, a targeted therapy is currently not available and standard treatment usually consists of systemic immunosuppression. This standard therapy does not lead to complete remission in all patients (i. e. normalization of biochemical parameters and disappearance of histological inflammatory changes) and additionally therapy-limiting side effects can occur. It is therefore necessary to develop new disease-specific therapy options for which a better understanding of the pathogenesis is essential.

A possible alternative therapy strategy is the off-label treatment with the monoclonal anti-TNF antibody Infliximab, which has already proven effectiveness in some cases of difficult-to-treat AIH. Here, the beneficial effect of Infliximab treatment in an AIH patient was confirmed by showing the normalization of clinical disease parameters and the reduction of pro-inflammatory cytokines, such as TNF, IFN γ , IL-17A and IL-2. These pro-inflammatory cytokines were also reduced in PBMCs that were treated *in vitro* with Infliximab and might in the future serve as potential markers in the peripheral blood for diagnostic purposes or for prognosis regarding therapeutic success.

In the second part of this study, CD4⁺ T-cells in the peripheral blood and liver of AIH patients have been more precisely characterized, as these cells seem to be particularly involved in the pathogenesis of AIH. The analysis showed that the CD4⁺ T-cells in both peripheral blood and livers of AIH patients were primarily TNF-producing cells. Interestingly, the majority of these cells also produced IFN γ and IL-2, indicating that they were highly functional, activated Th1 cells. This finding may explain the good response to Infliximab treatment in AIH. In addition, the frequency of CCL5-positive cells was higher in patients with AIH compared to healthy controls. This chemokine is believed to support inflammation by promoting chemotaxis of T-cells and is involved fibrotic scarring of the liver. In contrast, cytotoxic T-cells and IL-17A production seemed to play only a minor role in the pathogenesis of AIH.

Furthermore, the data indicated that, in addition to highly activated Th1 cells, activated macrophages might be involved in the pathogenesis of AIH and associated liver fibrosis. They were presumably activated by GM-CSF-producing CD4⁺ T-cells and were characterized by high M-CSF production.

Finally, the presence and activation status of the enzyme ADAM-17 in AIH was examined: ADAM-17 catalyzes the release of TNF, which have identified as a key cytokine involved in the pathogenesis of AIH. The results suggested increased ADAM-17 activity in CD4⁺ T-cells of AIH patients. This might lead to protection from apoptosis in these cells, since ADAM-17 stimulates the release of apoptosis-inducing TNF-RI. In addition, increased enzyme activity could promote liver fibrosis by enhanced pro-fibrotic cytokine release. Taken together, these data highlight ADAM-17 as a potential new target structure for future AIH therapy.

Literaturverzeichnis

1. Strassburg, C.P., *Autoimmune hepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(5): p. 667-82.
2. Alvarez, F., et al., *International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1999. **31**(5): p. 929-38.
3. Gatselis, N.K., et al., *Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(1): p. 60-83.
4. Geller, S.A., *Autoimmune hepatitis: Histopathology*. Clin Liver Dis, 2014. **3**(2): p. 19-23.
5. Tiniakos, D.G., J.G. Brain, and Y.A. Bury, *Role of Histopathology in Autoimmune Hepatitis*. Digestive Diseases, 2015. **33**: p. 53-64.
6. Hennes, E.M., et al., *Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 169-76.
7. European Association for Study of the Liver, *EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2015. **63**(4): p. 971-1004.
8. Kirk, A.P., et al., *Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis*. Gut, 1980. **21**(1): p. 78-83.
9. Soloway, R.D., et al., *Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis*. Gastroenterology, 1972. **63**(5): p. 820-33.
10. Debbeche, R., et al., *Autoimmune hepatitis in Tunisia. Retrospective multicenter study of 83 cases*. La Tunisie medicale, 2010. **88**(11): p. 834-840.
11. Lv, T., and M. Li, et al., *A systematic review and meta-analysis on the incidence and prevalence of autoimmune hepatitis in Asian, European and American population*. J Gastroenterol Hepatol, 2019. **34**(10): p. 1676-84.
12. Gronbaek, L., H. Vilstrup, and P. Jepsen, *Autoimmune hepatitis in Denmark: incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study*. J Hepatol, 2014. **60**(3): p. 612-7.
13. Tanaka, A., et al., *Increase trend in the prevalence and male-to-female ratio of primary biliary cholangitis, autoimmune hepatitis, and primary sclerosing cholangitis in Japan*. Hepatol Res, 2019. **49**(8): p. 881-9.
14. Hurlburt, K.J., et al., *Prevalence of autoimmune liver disease in Alaska Natives*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(9): p. 2402-7.
15. Ngu, J.H., et al., *Population-based epidemiology study of autoimmune hepatitis: a disease of older women?* J Gastroenterol Hepatol, 2010. **25**(10): p. 1681-6.
16. Verma, S., M. Torbenson, and P.J. Thuluvath, *The impact of ethnicity on the natural history of autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1828-35.
17. Lim, K.N., et al., *Autoimmune hepatitis in African Americans: presenting features and response to therapy*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(12): p. 3390-4.

18. Wong, R.J., et al., *The impact of race/ethnicity on the clinical epidemiology of autoimmune hepatitis*. J Clin Gastroenterol, 2012. **46**(2): p. 155-61.
19. de Boer, Y.S., A. Gerussi, and F.F. van den Brand, et al., *Association Between Black Race and Presentation and Liver-Related Outcomes of Patients With Autoimmune Hepatitis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2019. **17**(8): p. 1616-24.e2.
20. Czaja, A.J., et al., *Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States*. Journal of Hepatology, 2002. **37**(3): p. 302-8.
21. Doherty, D.G., et al., *Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1994. **19**(3): p. 609-15.
22. Strettell, M.D., et al., *Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1997. **112**(6): p. 2028-35.
23. de Boer, Y.S., and N.M.F. van Gerven, et al., *Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1*. Gastroenterology, 2014. **147**(2): p. 443-52.e5.
24. Seki, T., et al., *HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients*. Gastroenterology, 1992. **103**(3): p. 1041-7.
25. Pando, M., et al., *Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1374-80.
26. Bittencourt, P.L., et al., *Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(7): p. 1906-13.
27. van Gerven, N.M.F., et al., *Epidemiology and clinical characteristics of autoimmune hepatitis in the Netherlands*. Scand J Gastroenterol, 2014. **49**(10): p. 1245-54.
28. Abe, M., et al., *Present status of autoimmune hepatitis in Japan: a nationwide survey*. Journal of Gastroenterology, 2011. **46**(9): p. 1136-41.
29. Werner, M., et al., *Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: A nationwide study*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2008. **43**(10): p. 1232-40.
30. Schramm, C., et al., *Autoimmune hepatitis in the elderly*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(5): p. 1587-91.
31. Webb, G.J., et al., *Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmune Hepatitis*. Annu Rev Pathol, 2018. **13**: p. 247-92.
32. Lohse, A.W., J. Herkel, and C. Weiler-Normann, *Can Understanding the Pathogenesis of Autoimmune Hepatitis Lead to Rational Therapy?* Dig Dis, 2017. **35**(4): p. 367-70.
33. Löhr, H.F., et al., *Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology*. Liver, 1994. **14**(3): p. 161-6.
34. Senaldi, G., et al., *Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis*. Arch Dis Child, 1992. **67**(12): p. 1447-53.
35. Lobo-Yeo, A., et al., *Preferential activation of helper/inducer T lymphocytes in autoimmune chronic active hepatitis*. Clin Exp Immunol, 1987. **67**(1): p. 95-104.
36. Liberal, R., D. Vergani, and G. Mieli-Vergani, *Update on Autoimmune Hepatitis*. J Clin Transl Hepatol, 2015. **3**(1): p. 42-52.

37. Chong, D.L.W. and S. Sriskandan, *Pro-inflammatory mechanisms in sepsis*. Contrib Microbiol, 2011. **17**: p. 86-107.
38. König, R., L.-Y. Huang, and R.N. Germain, *MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 796-8.
39. Mix, H., et al., *Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 2008. **135**(6): p. 2107-18.
40. Löhr, H., et al., *Clonal analysis of liver-infiltrating T cells in patients with LKM-1 antibody-positive autoimmune chronic active hepatitis*. Clin Exp Immunol, 1991. **84**(2): p. 297-302.
41. Arenz, M., et al., *T cell receptor Vbeta chain restriction and preferred CDR3 motifs of liver-kidney microsomal antigen (LKM-1)-reactive T cells from autoimmune hepatitis patients*. Liver, 2001. **21**(1): p. 18-25.
42. Cancado, E.L.R., C.P. Abrantes-Lemos, and D.R.B. Terrabuio, *The importance of autoantibody detection in autoimmune hepatitis*. Front Immunol, 2015. **6**(222).
43. Kanzler, S., et al., *Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1999. **31**(4): p. 635-40.
44. Gregorio, G.V., et al., *Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 541-7.
45. Homberg, J.-C., et al., *Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis*. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1333-9.
46. Sebode, M., C. Weiler-Normann, and T. Liwinski et al., *Autoantibodies in Autoimmune Liver Disease-Clinical and Diagnostic Relevance*. Frontiers in immunology, 2018. **9**.
47. Löhr, H.F., et al., *Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticlonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1996. **24**(6): p. 1416-21.
48. Ma, Y., et al., *Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 868-82.
49. Zhao, Y., and Y. Zhang, et al., *Identification of T cell epitopes on soluble liver antigen in Chinese patients with auto-immune hepatitis*. Liver Int, 2011. **31**(5): p. 721-9.
50. Akberova, D., A.P. Kiassov, and D. Abdulganieva, *Serum Cytokine Levels and Their Relation to Clinical Features in Patients with Autoimmune Liver Diseases*. J Immunol Res, 2017. **2017**.
51. Maggiore, G., et al., *Circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in children with autoimmune hepatitis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1995. **20**(1): p. 23-7.
52. Thomas-Dupont, P., et al., *Elevated circulating levels of IL-21 and IL-22 define a cytokine signature profile in type 2 autoimmune hepatitis patients*. Ann Hepatol, 2016. **15**(4): p. 550-8.
53. Diestelhorst, J., and N. Junge, et al., *Pediatric autoimmune hepatitis shows a disproportionate decline of regulatory T cells in the liver and of IL-2 in the blood of patients undergoing therapy*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0181107.

54. Zhao, L., and Y. Tang, et al., *Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18909.
55. Bovensiepen, C.S., *Charakterisierung extra- und intrahepatischer T-Zellen in der Autoimmunen Hepatitis*, in *Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften*. 2015, Universität Hamburg: Hamburg.
56. Taubert, R. and E. Jaeckel, *Autoimmunhepatitis – Standard- und Zweitlinientherapie*. Internist, 2018. **59**(6): p. 536-43.
57. Heber, D. and C. Imming. *Azathioprin*. Thieme Römpf Enzyklopädie [Online] 2015 [cited 2020 Januar]; Available from: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-01-04097>.
58. Weiler-Normann, C. and A.W. Lohse, *Autoimmune hepatitis: A life-long disease*. Journal of Hepatology, 2013. **58**(1): p. 5-7.
59. van Gerven, N.M.F., et al., *Relapse is almost universal after withdrawal of immunosuppressive medication in patients with autoimmune hepatitis in remission*. Journal of Hepatology, 2013. **58**(1): p. 141-7.
60. Eriksen, P.L., et al., *Enrichment of Genetic Variants in the Glucocorticoid Receptor Signalling Pathway in Autoimmune Hepatitis with Failure of Standard Treatment*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017. **121**(3): p. 189-94.
61. Oray, M., et al., *Long-term side effects of glucocorticoids*. Expert Opinion on Drug Safety, 2016. **15**(4): p. 457-65.
62. Hennes, E.M., et al., *Mycophenolate mofetil as second line therapy in autoimmune hepatitis?* Am J Gastroenterol, 2008. **103**(12): p. 3063-70.
63. Larsen, F.S., et al., *Low-dose tacrolimus ameliorates liver inflammation and fibrosis in steroid refractory autoimmune hepatitis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(23): p. 3232-6.
64. Weiler-Normann, C., et al., *Infliximab as a rescue treatment in difficult-to-treat autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2013. **58**(3): p. 529-34.
65. Weiler-Normann, C., et al., *A case of difficult-to-treat autoimmune hepatitis successfully managed by TNF-alpha blockade*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(11): p. 2877-8.
66. Rajanayagam, J. and P.J. Lewindon, *Infliximab as rescue therapy in paediatric autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2013. **59**(4): p. 908-13.
67. Murphy, K., et al., *Part I - Chapter 1: Basic Concepts in Immunology*, in *Janeway's immunobiology*. 2012, Garland Science: New York. p. 1-36.
68. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
69. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
70. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 4-9.
71. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.

72. Shapouri-Moghaddam, A., et al., *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6425-40.
73. Murphy, K., et al., *Appendix II - CD Antigens*, in *Janeway's immunobiology*. 2012, Garland Science: New York. p. 763-78.
74. den Haan, J.M.M., R. Arens, and M.C. van Zelm, *The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells*. Immunology letters, 2014. **162**: p. 103-12.
75. Hoffman, W., F.G. Lakkis, and G. Chalasani, *B Cells, Antibodies, and More*. Clinical journal of the American Society of Nephrology, 2016. **11**(1): p. 137-54.
76. Zhu, J., *T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2018. **10**(10): p. a030338.
77. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations*. Annual review of immunology, 2010. **28**: p. 445-89.
78. Ho, I.-C. and L.H. Glimcher, *Transcription: tantalizing times for T cells*. Cell, 2002. **109**: p. S109-S120.
79. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. Journal of immunology, 1986. **136**(7): p. 2348-2357.
80. Caza, T. and S. Landas, *Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets*. BioMed research international, 2015. **2015**.
81. Ivanova, E.A. and A.N. Orekhov, *T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview*. Biomed Res Int, 2015. **2015**.
82. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 5-17.
83. Walker, J.A. and A.N.J. McKenzie, *T(H)2 cell development and function*. Nature reviews. Immunology, 2018. **18**(2): p. 121-33.
84. Zhang, S., *The role of transforming growth factor beta in T helper 17 differentiation*. Immunology, 2018. **155**(1): p. 24-35.
85. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression*. Trends in Molecular Medicine, 2007. **13**(3): p. 108-16.
86. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annual review of immunology, 2011. **29**: p. 621-63.
87. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White, *CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection*. Annual Review of Immunology, 2000. **18**(1): p. 275-308.
88. Smyth, M.J., et al., *Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(1): p. 18-29.
89. Berke, G., *The CTL's kiss of death*. Cell, 1995. **81**(1): p. 9-12.
90. Shresta, S., et al., *How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?* Current opinion in immunology, 1998. **10**(5): p. 581-7.
91. Uellner, R., et al., *Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain*. The EMBO journal, 1997. **16**(24): p. 7287-96.

92. Boivin, W.A., et al., *Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma*. Laboratory investigation, 2009. **89**(11): p. 1195-220.
93. Krensky, A.M. and C. Clayberger, *Biology and clinical relevance of granulysin*. Tissue antigens, 2009. **73**(3): p. 193-8.
94. Kaspar, A.A., and S. Okada, et al., *A Distinct Pathway of Cell-Mediated Apoptosis Initiated by Granulysin*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(1): p. 350-6.
95. Pearce, E.L., et al., *Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1041-3.
96. Stienne, C., and M.F. Michieletto, et al., *Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes*. Immunity, 2016. **45**(4): p. 774-87.
97. Appay, V., and J.J. Zaunders, et al., *Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5954-8.
98. Lewis, G.M., et al., *TGF-beta receptor maintains CD4 T helper cell identity during chronic viral infections*. J Clin Invest, 2016. **126**(10): p. 3799-813.
99. Qui, H.Z., et al., *CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3555-64.
100. Cannon, J.G., *Inflammatory Cytokines in Nonpathological States*. News Physiol Sci, 2000. **15**: p. 298-303.
101. Zhang, J.-M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain*. International anesthesiology clinics, 2007. **45**(2): p. 27-37.
102. Cohen, M.C. and S. Cohen, *Cytokine function: a study in biologic diversity*. American journal of clinical pathology, 1996. **105**(5): p. 589-98.
103. Dostert, C., et al., *The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond*. Physiol Rev, 2019. **99**(1): p. 115-60.
104. Bodmer, J.-L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
105. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
106. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology, 2010. **49**(7): p. 1215-28.
107. Deora, A., and S. Hegde, et al., *Transmembrane TNF-dependent uptake of anti-TNF antibodies*. MAbs, 2017. **9**(4): p. 680-95.
108. Jones, E.Y., D.I. Stuart, and N.P. Walker, *Structure of tumour necrosis factor*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 225-8.
109. Al-Lamki, R.S. and T.N. Mayadas, *TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction*. Kidney Int, 2015. **87**(2): p. 281-96.
110. Brockhaus, M., et al., *Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci USA, 1990. **87**(8): p. 3127-31.
111. Faustman, D. and M. Davis, *TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(6): p. 482-93.

112. Bryde, S., and I. Grunwald, et al., *Tumor necrosis factor (TNF)-functionalized nanostructured particles for the stimulation of membrane TNF-specific cell responses*. Bioconjug Chem, 2005. **16**(6): p. 1459-67.
113. Lambrecht, B.N., M. Vanderkerken, and H. Hammad, *The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(12): p. 745-58.
114. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
115. Moss, M.L., et al., *Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 733-6.
116. Horiuchi, K., et al., *Cell surface colony-stimulating factor 1 can be cleaved by TNF-alpha converting enzyme or endocytosed in a clathrin-dependent manner*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6715-24.
117. Scheller, J., et al., *ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration*. Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 380-7.
118. Rose-John, S., *ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets*. Pharmacol Res, 2013. **71**: p. 19-22.
119. Zunke, F. and S. Rose-John, *The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017. **1864**: p. 2059-70.
120. Gonzales, P.E., et al., *Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31638-45.
121. Lorenzen, I., and J. Lokau, et al., *Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation*. Sci Rep, 2016. **6**(35067).
122. Soond, S.M., et al., *ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking*. Journal of cell science, 2005. **118**(11): p. 2371-80.
123. Schlöndorff, J., J.D. Becherer, and C.P. Blobel, *Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE)*. Biochem J, 2000. **347**: p. 131-8.
124. Gooz, M., *ADAM-17: the enzyme that does it all*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(2): p. 146-69.
125. Scharfenberg, F., et al., *Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020. **77**(2): p. 331-50.
126. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. Journal of leukocyte biology, 2004. **75**(2): p. 163-89.
127. Ealick, S.E., et al., *Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma*. Science, 1991. **252**(5006): p. 698-702.
128. De Maeyer, E. and J. De Maeyer-Guignard, *Interferon-gamma*. Current opinion in immunology, 1992. **4**(3): p. 321-6.
129. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annual review of immunology, 1997. **15**: p. 749-95.
130. Malek, T.R., *The Biology of Interleukin-2*. Annual Review of Immunology, 2008. **26**(1): p. 453-79.

131. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 180-90.
132. Gu, C., L. Wu, and X. Li, *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling*. Cytokine, 2013. **64**(2): p. 477-85.
133. Gaffen, S.L., *Structure and signalling in the IL-17 receptor family*. Nature reviews. Immunology, 2009. **9**(8): p. 556-67.
134. Hamilton, J.A., *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 533-44.
135. Barreda, D.R., P.C. Hanington, and M. Belosevic, *Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 509-54.
136. Herrmann, F., A. Lindemann, and R. Mertelsmann, *G-CSF and M-CSF: from molecular biology to clinical application*. Biotherapy, 1990. **2**(4): p. 315-24.
137. Douglass, T.G., et al., *Macrophage colony stimulating factor: not just for macrophages anymore! A gateway into complex biologies*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(10): p. 1354-76.
138. Stanley, E.R., et al., *Biology and action of colony-stimulating factor-1*. Mol Reprod Dev, 1997. **46**(1): p. 4-10.
139. Shi, Y., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know*. Cell research, 2006. **16**(2): p. 126-133.
140. Bhattacharya, P., et al., *GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity*. Cytokine, 2015. **75**(2): p. 261-71.
141. Hareng, L. and T. Hartung, *Induction and regulation of endogenous granulocyte colony-stimulating factor formation*. Biol Chem, 2002. **383**(10): p. 1501-17.
142. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
143. Legler, D.F. and M. Thelen, *Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function*. Chimia, 2016. **70**(12): p. 856-9.
144. Miller, M.C. and K.H. Mayo, *Chemokines from a Structural Perspective*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(10).
145. Appay, V. and S.L. Rowland-Jones, *RANTES: a versatile and controversial chemokine*. Trends Immunol, 2001. **22**(2): p. 83-7.
146. Catalfamo, M., et al., *Human CD8+ T Cells Store RANTES in a Unique Secretory Compartment and Release It Rapidly after TcR Stimulation*. Immunity, 2004. **20**(2): p. 219-30.
147. Franciszkiewicz, K., et al., *Synaptic release of CCL5 storage vesicles triggers CXCR4 surface expression promoting CTL migration in response to CXCL12*. J Immunol, 2014. **193**(10): p. 4952-61.
148. Stegelmann, F., et al., *Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7474-83.

149. Kim, J.J., et al., *CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines*. J Clin Invest, 1998. **102**(6): p. 1112-24.
150. Strasser, E., *Therapeutische Apherese - Eine Übersicht aktueller Indikationsstellungen*. Klinikarzt, 2014. **43**(1): p. 10-7.
151. McGann, L.E. and M.L. Walterson, *Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone*. Cryobiology, 1987. **24**(1): p. 11-6.
152. Crawford, T.Q., et al., *Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell subsets by flow cytometry*. Cytometry Part A, 2014. **85A**(3): p. 268-76.
153. Matthews, S.A. and D.A. Cantrell, *New insights into the regulation and function of serine/threonine kinases in T lymphocytes*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 241-52.
154. Isakov, N. and A. Altman, *Protein kinase C(theta) in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 761-94.
155. Chatila, T., et al., *Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin*. J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1283-9.
156. Hendricks, L.C., et al., *Brefeldin A affects early events but does not affect late events along the exocytic pathway in pancreatic acinar cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**(15): p. 7242-6.
157. Ruegg, C.L., et al., *Degradation of CD4 following phorbol-induced internalization in human T lymphocytes. Evidence for distinct endocytic routing of CD4 and CD3*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18837-43.
158. Invitrogen. *Normalization in western blotting to obtain relative quantitation*. [Online] 2018 [cited 2019 September]; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical-Notes/ibright-normalization-western-blotting-relative-quantitation-technical-note.pdf>.
159. Castera, L., X. Forns, and A. Alberti, *Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography*. J Hepatol, 2008. **48**(5): p. 835-47.
160. Yang, Y.-Y. and H.-C. Lin, *Diagnostic laboratory tests*, in *Cirrhosis: A practical guide to management*, S.S. Lee and R. Moreau, Editors. 2015, John Wiley & Sons Inc: Chichester, West Sussex. p. 12-20.
161. Luxembourg, B., M. Krause, and E. Lindhoff-Last, *Basiswissen Gerinnungslabor*. Dtsch Arztebl International, 2007. **104**(21): p. 1489-98.
162. Yu, H., et al., *Immunization with live and dead Chlamydia muridarum induces different levels of protective immunity in a murine genital tract model: correlation with MHC class II peptide presentation and multifunctional Th1 cells*. J Immunol, 2011. **186**(6): p. 3615-21.
163. Jordan, S.J., et al., *The Predominant CD4(+) Th1 Cytokine Elicited to Chlamydia trachomatis Infection in Women Is Tumor Necrosis Factor Alpha and Not Interferon Gamma*. Clin Vaccine Immunol, 2017. **24**(4).
164. Commandeur, S., M.Y. Lin, and K.E. van Meijgaarden, et al., *Double- and monofunctional CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis DosR antigens and peptides in long-term latently infected individuals*. Eur J Immunol, 2011. **41**(10): p. 2925-36.

165. Rosa, P., et al., *Brefeldin A inhibits the formation of constitutive secretory vesicles and immature secretory granules from the trans-Golgi network*. Eur J Cell Biol, 1992. **59**(2): p. 265-74.
166. Miller, S.G., L. Carnell, and H.-P.H. Moore, *Post-Golgi membrane traffic: brefeldin A inhibits export from distal Golgi compartments to the cell surface but not recycling*. J Cell Biol, 1992. **118**(2): p. 267-83.
167. Bovensiepen, C.S., and M. Schakat, et al., *TNF-Producing Th1 Cells Are Selectively Expanded in Liver Infiltrates of Patients with Autoimmune Hepatitis*. J Immunol, 2019. **203**(12): p. 3148-56.
168. Deng, P., C.W. Rettenmier, and P.K. Pattengale, *Structural requirements for the ectodomain cleavage of human cell surface macrophage colony-stimulating factor*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16338-43.
169. Rainer, T.H., *L-selectin in health and disease*. Resuscitation, 2002. **52**(2): p. 127-41.
170. Ivetic, A. and A.J. Ridley, *The telling tail of L-selectin*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(6): p. 1118-21.
171. Smalley, D.M. and K. Ley, *L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(2): p. 255-66.
172. Tedder, T.F., et al., *Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens*. J Immunol, 1990. **144**(2): p. 532-40.
173. Chao, C.-C., R. Jensen, and M.O. Dailey, *Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1686-94.
174. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Kapitel 12 - Transplantation*, in *Immunologie für Einsteiger*. 2012, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 211-24.
175. Sedger, L.M. and M.F. McDermott, *TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(4): p. 453-72.
176. Elliott, M.J., et al., *Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis*. Lancet, 1994. **344**(8930): p. 1105-10.
177. Weinblatt, M.E., et al., *Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial*. Arthritis and rheumatism, 2003. **48**(1): p. 35-45.
178. Reich, K., et al., *Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial*. Lancet, 2005. **366**(9494): p. 1367-74.
179. Antoni, C., et al., *Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of the IMPACT 2 trial*. Annals of the rheumatic diseases, 2005. **64**(8): p. 1150-7.
180. Hanauer, S.B., et al., *Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial*. Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 323-33.

181. An, J., *Expression and Significance of Th17 Cells and Related Factors in Patients with Autoimmune Hepatitis*. Combinatorial chemistry & high throughput screening, 2019. **22**(4): p. 232-7.
182. Ringheanu, M., et al., *Effects of infliximab on apoptosis and reverse signaling of monocytes from healthy individuals and patients with Crohn's disease*. Inflammatory bowel diseases, 2004. **10**(6): p. 801-10.
183. Scallon, B., et al., *Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2002. **301**(2): p. 418-26.
184. Lim, H., et al., *Structural Biology of the TNF α Antagonists Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(3).
185. Vos, A.C.W., et al., *Anti-tumor necrosis factor- α antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 221-30.
186. Louis, E., et al., *Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease*. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2004. **19**(5): p. 511-9.
187. Mitoma, H., et al., *Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab*. Arthritis and rheumatism, 2008. **58**(5): p. 1248-57.
188. Mitoma, H., et al., *Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- α* . Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 376-92.
189. Van den Brande, J.M.H., et al., *Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1774-85.
190. Nguyen, D.X. and M.R. Ehrenstein, *Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis*. J Exp Med, 2016. **213**(7): p. 1241-53.
191. Robinson, D.S., *Regulatory T cells and asthma*. Clinical & Experimental Allergy, 2009. **39**(9): p. 1314-23.
192. Costantino, C.M., C. Baecher-Allan, and D.A. Hafler, *Multiple Sclerosis and Regulatory T Cells*. Journal of Clinical Immunology, 2008. **28**(6): p. 697-706.
193. Jaeckel, E., et al., *Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus*. Horm Metab Res, 2008. **40**(2): p. 126-36.
194. Sebode, M. and A.W. Lohse, *Future perspective: immunomodulatory therapy for autoimmune hepatitis*. Digestive diseases, 2014. **32**(5): p. 502-6.
195. Longhi, M.S., et al., *Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis*. Journal of autoimmunity, 2010. **34**(1): p. 7-14.
196. Peiseler, M., and M. Sebode, et al., *FOXP3⁺ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency*. Journal of hepatology, 2012. **57**(1): p. 125-32.

197. Strand, V., et al., *Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review*. BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy, 2017. **31**(4): p. 299-316.
198. Harris, J., J.C. Hope, and J. Keane, *Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 2008. **198**(12): p. 1842-50.
199. Keane, J., et al., *Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent*. The New England journal of medicine, 2001. **345**(15): p. 1098-104.
200. Nakayama, S., *Autoimmune Hepatitis Triggered by Anti-TNF-alpha Therapy*. Case Rep Med, 2013. **2013**.
201. Ghabril, M., et al., *Liver injury from tumor necrosis factor-alpha antagonists: analysis of thirty-four cases*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. **11**(5): p. 558-64 e3.
202. Van Hoof, D., et al., *Simultaneous flow cytometric analysis of IFN-γ and CD4 mRNA and protein expression kinetics in human peripheral blood mononuclear cells during activation*. Cytometry Part A, 2014. **85A**(10): p. 894-900.
203. Cookson, S., et al., *Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1999. **30**(4): p. 851-6.
204. Czaja, A.J., et al., *Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 645-52.
205. Chaouali, M., et al., *Association of TNF-alpha-308 Polymorphism with Susceptibility to Autoimmune Hepatitis in Tunisians*. Biochem Genet, 2018. **56**(6): p. 650-62.
206. Ngu, J.H., et al., *Association of the HLA locus and TNF with type I autoimmune hepatitis susceptibility in New Zealand Caucasians*. SpringerPlus, 2013. **2**(355).
207. Wilson, A.G., et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**(7): p. 3195-9.
208. Wilson, A.G., et al., *An Allelic Polymorphism within the Human Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Promoter Region Is Strongly Associated with HLA A1, B8, and DR3 Alleles*. Journal of Experimental Medicine, 1993. **177**(2): p. 557-60.
209. Bittencourt, P.L., et al., *Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor alpha polymorphisms at position -308*. Journal of hepatology, 2001. **35**(1): p. 24-8.
210. Mateen, S., and A. Zafar, et al., *Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Chim Acta, 2016. **455**: p. 161-71.
211. Vasanthi, P., G. Nalini, and G. Rajasekhar, *Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review*. APLAR Journal of Rheumatology, 2007. **10**(4): p. 270-4.
212. Argollo, M., et al., *Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease*. Journal of Autoimmunity, 2017. **85**: p. 103-16.
213. Lowes, M.A., M. Suárez-Fariñas, and J.G. Krueger, *Immunology of psoriasis*. Annual review of immunology, 2014. **32**: p. 227-55.

214. Jain, A., et al., *T cells instruct myeloid cells to produce inflammasome-independent IL-1 β and cause autoimmunity*. Nature Immunology, 2020. **21**(1): p. 65-74.
215. Luan, J., X. Zhang, and S. Wang, et al., *NOD-Like Receptor Protein 3 Inflammasome-Dependent IL-1 β Accelerated ConA-Induced Hepatitis*. Frontiers in immunology, 2018. **9**.
216. Nie, H., Y. Zheng, and R. Li, et al., *Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis*. Nat Med, 2013. **19**(3): p. 322-8.
217. Hussain, M.J., et al., *Cellular expression of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in the liver biopsies of children with chronic liver disease*. J Hepatol, 1994. **21**(5): p. 816-21.
218. Günther, C., et al., *The pseudokinase MLKL mediates programmed hepatocellular necrosis independently of RIPK3 during hepatitis*. J Clin Invest, 2016. **126**(11): p. 4346-60.
219. Bouma, G. and W. Strober, *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(7): p. 521-33.
220. Cnop, M., et al., *Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. S97-S107.
221. Cao, Y., and B.A. Goods, et al., *Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis*. Science Translational Medicine, 2015. **7**(287): p. 287ra74.
222. Aggarwal, B.B., T.E. Eessalu, and P.E. Hass, *Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 665-7.
223. Kannanganat, S., et al., *Multiple-Cytokine-Producing Antiviral CD4 T Cells Are Functionally Superior to Single-Cytokine-Producing Cells*. Journal of Virology, 2007. **81**(16): p. 8468-76.
224. Christen, U. and E. Hintermann, *Pathogens and autoimmune hepatitis*. Clinical and experimental immunology, 2019. **195**(1): p. 35-51.
225. Wada, Y., et al., *Possible autoimmune hepatitis induced after chronic active Epstein-Barr virus infection*. Clinical Journal of Gastroenterology, 2014. **7**(1): p. 58-61.
226. Peng, H., et al., *Autoimmune hepatitis following Epstein-Barr virus infection: a diagnostic dilemma*. BMJ Case Reports, 2019. **12**(7): p. e229615.
227. Miller, P.G., M.B. Bonn, and S.C. McKarns, *Transmembrane TNF-TNFR2 Impairs Th17 Differentiation by Promoting Il2 Expression*. J Immunol, 2015. **195**(6): p. 2633-47.
228. Lohse, A.W. and C. Weiler-Normann, *Section VI - Chapter 41: Autoimmune Hepatitis*, in *Zakim and Boyer's Hepatology (Seventh Edition)*, A.J. Sanyal, et al., Editors. 2018, Content Repository Only!: Philadelphia. p. 594-609.e3.
229. Fragoulis, G.E., S. Siebert, and I.B. McInnes, *Therapeutic Targeting of IL-17 and IL-23 Cytokines in Immune-Mediated Diseases*. Annual review of medicine, 2016. **67**: p. 337-53.

230. Malmeström, C., et al., *Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF*. Journal of neuroimmunology, 2008. **196**(1-2): p. 159-65.
231. Blanco, P., et al., *Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis and rheumatism, 2005. **52**(1): p. 201-11.
232. Estella, E., et al., *Granzyme B-mediated death of pancreatic beta-cells requires the proapoptotic BH3-only molecule bid*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2212-9.
233. Polihronis, M., et al., *Modes of epithelial cell death and repair in Sjögren's syndrome (SS)*. Clinical and experimental immunology, 1998. **114**(3): p. 485-90.
234. Adada, M.M., et al., *Sphingosine kinase 1 regulates tumor necrosis factor-mediated RANTES induction through p38 mitogen-activated protein kinase but independently of nuclear factor kappaB activation*. J Biol Chem, 2013. **288**(38): p. 27667-79.
235. Hirano, F., et al., *Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced RANTES chemokine expression via activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase: roles of TNF-alpha in alcoholic liver diseases*. J Hepatol, 2003. **38**(4): p. 483-9.
236. Berres, M.-L., et al., *Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(11): p. 4129-40.
237. Yamamoto, K., et al., *Activated liver macrophages in human liver diseases*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1995. **10**(S1): p. S72-S76.
238. Wick, G., et al., *The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses*. Trends in immunology, 2010. **31**(3): p. 110-9.
239. Sindrilaru, A., et al., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(3): p. 985-97.
240. Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard, *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 445-55.
241. Becher, B., S. Tugues, and M. Greter, *GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation*. Immunity, 2016. **45**(5): p. 963-73.
242. Spath, S., et al., *Dysregulation of the Cytokine GM-CSF Induces Spontaneous Phagocyte Invasion and Immunopathology in the Central Nervous System*. Immunity, 2017. **46**(2): p. 245-60.
243. Williamson, D.J., et al., *The detection and initial characterization of colony-stimulating factors in synovial fluid*. Clin Exp Immunol, 1988. **72**(1): p. 67-73.
244. Noguchi, M., et al., *Increased secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mucosal lesions of inflammatory bowel disease*. Digestion, 2001. **63**(1): p. 32-6.
245. Kostic, M., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a mediator of autoimmunity in multiple sclerosis*. Journal of Neuroimmunology, 2018. **323**: p. 1-9.
246. Kirman, I., R.L. Whelan, and O.H. Nielsen, *Infliximab: mechanism of action beyond TNF-alpha neutralization in inflammatory bowel disease*. European journal of gastroenterology & hepatology, 2004. **16**(7): p. 639-41.

247. Christensen, A.D., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) plays an important role in immune complex-mediated arthritis*. European journal of immunology, 2016. **46**(5): p. 1235-45.
248. Peng, W., *G-CSF treatment promotes apoptosis of autoreactive T cells to restrict the inflammatory cascade and accelerate recovery in experimental allergic encephalomyelitis*. Experimental neurology, 2017. **289**: p. 73-84.
249. Haller, M.J., et al., *Mobilization without immune depletion fails to restore immunological tolerance or preserve beta cell function in recent onset type 1 diabetes*. Clinical and experimental immunology, 2016. **183**(3): p. 350-7.
250. Haller, M.J., et al., *Anti-thymocyte globulin/G-CSF treatment preserves beta cell function in patients with established type 1 diabetes*. J Clin Invest, 2015. **125**(1): p. 448-55.
251. Korzenik, J.R. and B.K. Dieckgraefe, *An open-labelled study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of active Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **21**(4): p. 391-400.
252. Font, J., et al., *Increased serum levels of soluble L-selectin (CD62L) in patients with active systemic lupus erythematosus (SLE)*. Clinical & Experimental Immunology, 2000. **119**(1): p. 169-74.
253. Krętowski, A., et al., *Soluble L-selectin levels in type I diabetes mellitus: a surrogate marker for disease activity?* Immunology, 2000. **99**(2): p. 320-5.
254. Shimada, Y., et al., *Elevated serum L-selectin levels and abnormal regulation of L-selectin expression on leukocytes in atopic dermatitis: Soluble L-selectin levels indicate disease severity*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999. **104**(1): p. 163-8.
255. Ushach, I. and A. Zlotnik, *Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(3): p. 481-9.
256. Vandenabeele, P., et al., *The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis*. Sci Signal, 2010. **3**(115): p. re4.
257. Declercq, W., N. Takahashi, and P. Vandenabeele, *Dual face apoptotic machinery: from initiator of apoptosis to guardian of necroptosis*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 493-5.
258. Küsters, S., et al., *In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis*. Eur J Immunol, 1997. **27**(11): p. 2870-5.
259. Lisi, S., M. D'Amore, and M. Sisto, *ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity*. Immunology letters, 2014. **162**: p. 159-69.
260. Ohta, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2001. **28**(8): p. 1756-63.
261. Cesaro, A., et al., *Differential expression and regulation of ADAM17 and TIMP3 in acute inflamed intestinal epithelia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(6): p. G1332-43.
262. Kawaguchi, M., Y. Mitsuhashi, and S. Kondo, *Overexpression of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis*. Br J Dermatol, 2005. **152**(5): p. 915-9.

- 263. Seifert, T., et al., *TACE mRNA expression in peripheral mononuclear cells precedes new lesions on MRI in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2002. **8**(6): p. 447-51.
- 264. Atreya, R., et al., *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 583-8.
- 265. Geesala, R., P.D. Issuree, and T. Maretzky, *Novel functions of inactive rhomboid proteins in immunity and disease*. Journal of leukocyte biology, 2019. **106**(4): p. 823-35.
- 266. Kefaloyianni, E., et al., *ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis*. JCI insight, 2016. **1**(13): p. e87023.
- 267. Sharma, M., et al., *Selective inhibition of tumor necrosis factor- α converting enzyme attenuates liver toxicity in a murine model of concanavalin A induced auto-immune hepatitis*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(2): p. 229-36.
- 268. Ieguchi, K. and Y. Maru, *Savior or not: ADAM17 inhibitors overcome radiotherapy-resistance in non-small cell lung cancer*. Journal of thoracic disease, 2016. **8**(8): p. E813-E815.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Σ	Summe
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
μl	Mikroliter
$\mu\text{l/ml}$	Mikroliter pro Milliliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
1x	einfach
Abs.	Absatz
<i>ADAM17</i>	Gen für ADAM-17
ADAM-17	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 17
AF	Alexa Fluor®
AIH	Autoimmune Hepatitis
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANA	antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-presenting cells (antigenpräsentierende Zellen)
APRIL	A proliferation-inducing Ligand
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
BAFF	B-Zell Aktivierungsfaktor
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl6	B-Zell Lymphom 6 Protein
Ca^{2+}	Kalzium
CCL5	C-C Motiv Chemokin Ligand 5
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA eines RNA-Strangs
Ct-Wert	Cycle threshold (Schwellenwertzyklus)
d. h.	das heißt

DAG	Diacylglycerin
DCs	Dendritic cells (dendritische Zellen)
DDT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EOMES	Eomesodermin
ER	endoplasmatische Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et aliae</i>
FasL	Fas Ligand
Fc	Fragment crystallizable region (kristallisierbare Fragment Region)
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreuung)
g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
g	Gramm
g/cm ³	Gramm pro Kubikzentimeter
g/l	Gramm pro Liter
g/ml	Gramm pro Milliliter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor)
<i>GZMB</i>	Gen für Granzym B
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
<i>HPRT1</i>	Gen für Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1

HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.d.R.	in der Regel
<i>IFNG</i>	Gen für IFN γ
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
IU/l	Internationale Units (Enzymaktivität) pro Liter
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kPa	Kilopascal
l	Liter
LC-1	Liver cytosol antigen type 1 (Leber-Zytosol-Antigen Typ 1)
LIL	Leberinfiltrierende Lymphozyten
LKM	Liver Kidney microsome (Leber-Nieren-Mikrosomen)
M	molar
mA	Milliampere
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor (Monozyten-Kolonienstimulierender Faktor)
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
ml	Milliliter
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
<i>Mkl</i>	Gen für MLKL
mM	millimolar
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose

mTNF	membrangebundenes TNF
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NCAM	Neutral cell adhesion molecule (neutrales Zelladhäsionsmolekül)
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NK	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PacO-NHS	Pacific Orange TM Succinimidyl Ester
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (pathogenassoziierte molekulare Muster)
PBC	primäre biliäre Cholangitis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Pycoerythrin
PE/Cy7	Pycoerythrin/Cyanine 7
PerCP/Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll/Cyanine 5.5
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<i>POLR2A</i>	Gen für RNA Polymerase II Subunit A
<i>PPIB</i>	Gen für Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase B
<i>PRF1</i>	Gen für Perforin
PRRs	Pattern-Recognition Receptors (Mustererkennungszepptoren)
PSC	primäre sklerosierende Cholangitis
qPCR	Real-time Polymerase Chain Reaction (quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion)
qRT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (quantitative reverse Transkription Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion)
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand

RANTES	Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted
rel.	relativ
RIPK1	Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROR γ t	RAR-related orphan receptor γ -t
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
sec	Sekunde
SLA/LP	Soluble liver antigen / Liver-Pancreas-Antigen (lösliches Leberantigen / Leber-Pankreas-Antigen)
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SMA	Smooth muscle antibodies (Antikörper gegen glatte Muskulatur)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreuung)
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
t	Zeit
TACE	Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TNF konvertierendes Enzym)
T-bet	T-Box Transkriptionsfaktor 21
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	Tris buffered saline with Tween® 20 (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tfh	follikuläre T-Helferzellen
TGF- β	Transforming growth factor β (transformierender Wachstumsfaktor β)
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
Treg	regulatorische T-Zellen

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/l	Units (Enzymaktivität) pro Liter
U/ml	Units (Enzymaktivität) pro Milliliter
V	Volt
VE	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung und einer immunhistochemischen CD4-Färbung an einer Leberbiopsie einer exemplarischen Patientin mit einer unbehandelten, hochfloriden AIH. Dargestellt ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Entzündungszellinfiltrats an einem Portalfeld in A) 10x Vergrößerung (Maßstab: 200 µm) und C) 20x Vergrößerung (Maßstab: 100 µm), sowie die CD4⁺ T-Zellen (braunes Signal) in diesem Zellinfiltrat in B) 10x Vergrößerung (Maßstab: 200 µm) und D) 20x Vergrößerung (Maßstab: 100 µm) (gefärbte Gewebeschnitte bereitgestellt vom Institut für Pathologie)..... 4

Abbildung 2: Bindungsaffinität und Signalvermittlung der TNF-Rezeptoren. Dargestellt ist in A) die Interaktion von membrangebundenem TNF (mTNF) mit den TNF-Rezeptoren (TNF-R) I und II, die Freisetzung von TNF durch das Enzym ADAM-17 und die Interaktion von löslichem TNF mit dem TNF-RI. B) veranschaulicht die Signalwege der Rezeptoren. Der TNF-RI enthält eine intrazelluläre Todesdomäne (TD) und interagiert mit dem Signalkomplex I (bestehend aus mehreren Signalmolekülen, wie z. B. die Rezeptor-interagierenden Serin/Threonin-Proteinkinase 1 (RIPK1)). Dieser Komplex induziert über verschiedene Signalkaskaden die Expression von proliferativen, inflammatorischen und pro-Überlebens-induzierenden Genen. Alternativ entsteht durch die Bindung weiterer Signalproteine der Signalkomplex II, welcher entweder über Caspasen die Apoptose oder über MLKL (Mixed lineage kinase domain-like protein) die Nekroptose der Zelle induziert. Der TNF-RII interagiert aufgrund der fehlenden TD nur mit einzelnen Signalmolekülen des Komplexes I und induziert die Expression von proliferativen, inflammatorischen und pro-Überlebens-induzierenden Genen. (Abbildung adaptiert nach Bryde und Grunwald *et al.* 2005; Al-Lamki und Mayadas 2015 und Faustman und Davis 2010 [108, 110, 111]) 13

Abbildung 3: Aufbau des Vorläuferproteins von ADAM-17. Es setzt sich aus einer zytoplasmatischen und transmembranen Domäne, „Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequence“-Domäne, Membran-proximalen Domäne, Disintegrin-Domäne, katalytischen Domäne und Pro-Domäne zusammen (Abbildung nach Vorlage von Zunke und Rose-John 2017 [118]) 14

Abbildung 4: Aktivierung des Enzyms ADAM-17. Nach der Transkription wird die inaktive Pro-Form des Enzyms im endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichert. Erst im späten

trans-Golgi-Komplex kommt es durch Abspaltung der Pro-Domäne zur Aktivierung von ADAM-17. Nach einem Transport zur Zellmembran und einer Konformationsänderung setzt es dort seine Substrate und wird im Anschluss internalisiert und in Lysosomen degradiert. (Abbildung adaptiert nach Lambrecht, Vanderkerken und Hammad 2018 und Lorenzen und Lokau *et al.* 2016 [112, 120])..... 15

Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie zur Eingrenzung einzelner, lebender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten 40

Abbildung 6: Auftrennungsmuster im SDS-Gel des PageRuler™ Plus (250 – 10 kDa) 47

Abbildung 7: Testung des linearen Zusammenhangs der aufgetragenen Proteinkonzentration und der Signalstärke im Western Blot. Dargestellt ist in A) ein β -Aktin Western Blot mit absteigend aufgetragener Proteinkonzentration beginnend bei 50 μ g und in B) die für die einzelnen Banden ermittelte Signalintensität aufgetragen gegen die Proteinkonzentration [μ g] 49

Abbildung 8: Krankheitsverlauf einer Patientin vor und nach Beginn einer Therapie mit Infliximab über insgesamt 3,5 Jahre. Abgebildet sind in A) - D) die Zytokin-positiven CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen [%] gegen die Zeit [Monaten]. In E) sind die Aminotransferasen AST und ALT [U/l], in F) die γ -Globuline [%] und IgG [g/l] und in G) die Ergebnisse der Elastographie-Messung [kPa] und die INR gegen die Zeit [Monaten] dargestellt. Die jeweils vertikale gestrichelte Linie symbolisiert den Therapiebeginn [t = 0] 51

Abbildung 9: Exemplarische *in vitro* Testung des Einflusses einer Infliximab Therapie auf die Zytokinproduktion an PBMC von 3 Gesundkontrollen. Abgebildet ist der prozentuale Anteil der A) TNF, B) IFN γ und C) IL-2 produzierenden CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nach einer unspezifischen Stimulation mit bzw. ohne 2,5 ng/ml Infliximab 53

Abbildung 10: TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 produzierende CD4⁺ T-Zellen im Blut von AIH Patienten und Gesundkontrollen. In A) ist exemplarisch die Zytokinproduktion durch CD4⁺ Zellen von repräsentativen AIH Patienten bzw. Gesundkontrollen dargestellt. Die Anzahl der B) TNF-, C) IFN γ -, D) IL-17A- und E) IL-2-positiven CD4⁺ Zellen ist in % dargestellt. (Median aus B) - D) n = 9; E) n = 11 bzw. 9; * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01) 55

Abbildung 11: Produktion von TNF, IFN γ , IL-17A und IL-2 durch CD4⁺ T-Zellen in der Leber. A) zeigt die Zytokinproduktion durch CD4⁺ Zellen exemplarisch an repräsentativen AIH Patienten bzw. Kontrollen mit einer Fettlebererkrankung. Dargestellt ist der prozentuale

Anteil der B) TNF-, C) IFN γ -, D) IL-17A- und E) IL-2-positiven CD4 ⁺ Zellen (Median aus B) - D) n = 6 bzw. 7; E) n = 4 bzw. 8; * p \leq 0,05).....	56
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme eines RNAscope [®] an einer Leberbiopsie einer exemplarischen Patientin mit AIH. Dargestellt ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Entzündungsherds um eine Portalfeld in A) 20x Vergrößerung (Maßstab: 100 μ m) und B) 40x Vergrößerung (Maßstab: 50 μ m). Die roten Signale entsprechen der Sonde 1 gegen CD4-RNA und die blau-grünen der Sonde 2 gegen TNF-RNA. Hintergrundfärbung: Hämalun...	58
Abbildung 13: TNF und IFN γ Koproduktion durch CD4 ⁺ T-Zellen im Blut und der Leber von AIH Patienten und Gesundkontrollen. Exemplarisch sind die TNF / IFN γ -doppelt-positiven CD4 ⁺ Zellen, sowie die TNF Produktion durch IFN γ -positive bzw. die IFN γ Produktion durch TNF-positive CD4 ⁺ Zellen A) im Blut und B) in der Leber von repräsentativen AIH Patienten bzw. Kontrollpersonen dargestellt. C) zeigt den prozentualen Anteil der TNF / IFN γ -doppelt-positiven CD4 ⁺ Zellen im Blut und D) in der Leber. (Median aus C) n = 9; D) n = 7 bzw. 5; * p \leq 0,05).....	60
Abbildung 14: Produktion von FasL und RANKL durch CD4 ⁺ T-Zellen im Blut. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der A) FasL- und B) RANKL-positiven Zellen (Median aus n = 12 bzw. 10)	61
Abbildung 15: Produktion von zytotoxischen Proteinen und dem Transkriptionsfaktor EOMES durch CD4 ⁺ T-Zellen im Blut. Die Anzahl der A) Granulysin, B) Perforin, C) Granzym B, D) CCL5 und E) EOMES positiven CD4 ⁺ Zellen ist in % dargestellt. (Median aus A) - C) und E) n = 7; D) n = 11 bzw. 9; * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001)	63
Abbildung 16: Produktion von zytotoxischen Proteinen durch CD8 ⁺ T-Zellen im Blut. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an A) Granulysin, B) Perforin, C) Granzym B, D) CCL5 und E) EOMES positiven Zellen. (Median aus A) - C) und E) n = 7; D) n = 11 bzw. 9; * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01)	64
Abbildung 17: M-CSF, GM-CSF und G-CSF Produktion durch Blutzellen. Die Anzahl an A), B) M-CSF-, C), D) GM-CSF- und E), F) G-CSF-positiven A), C), E) CD4 ⁺ T-Zellen und B), D), F) CD3-Zellen ist in % dargestellt. (Median aus A), B) n = 9; C), D) n = 11 bzw. 9; E), F) n = 10; * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01).....	67

Abbildung 18: M-CSF und GM-CSF produzierende Immunzellen in der Leber. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an A), B) M-CSF- und C), D) GM-CSF-positiven A), C) CD3 ⁺ und B), D) CD3 ⁻ Zellen. (Median aus n = 4 bzw. 6)	68
Abbildung 19: Repräsentative Verteilung der M-CSF produzierenden Zellsubpopulationen exemplarisch an PBMC eines AIH Patienten dargestellt. Gating-Strategie: Einzelzellen; Lymphozyten; lebende Zellen; M-CSF Produzenten; NK-, NKT-, T- und CD3 ⁻ Zellen; von den CD3 ⁻ Zellen die Monozyten; von den nicht Monozyten die Makrophagen und von den nicht Makrophagen die Eosinophilen und Neutrophilen.....	70
Abbildung 20: M-CSF und TNF produzierende CD3 ⁻ und CD3 ⁺ Zellen im Blut von AIH Patienten und Gesundkontrollen. Die Anzahl der A) M-CSF-, und B) TNF-positiven CD3 ⁻ und CD3 ⁺ Zellen ist in % dargestellt. (Median aus n = 9; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p-Wert ≤ 0,0001).....	70
Abbildung 21: Produktion von CD62L durch Zellen im Blut. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD62L-positiven A) CD4 ⁺ und B) CD3 ⁻ Zellen (Median aus n = 10; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)	72
Abbildung 22: Konzentration von ADAM-17 Substraten im Plasma bzw. Serum. Die A) TNF-RI und B) M-CSF Konzentration ist in pg/ml dargestellt (Median aus A) n = 7 bzw. 6; B) n = 16; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).....	72
Abbildung 23: Exemplarische Testung der Abhängigkeit der TNF Freisetzung durch PBMC von AIH Patienten vom Enzym ADAM-17. Abgebildet ist die TNF Konzentration in pg/ml nach einer unspezifischen Stimulation mit bzw. ohne der Zugabe von 3 µM GI254023X bzw. GW280264X (Median aus n = 3).....	73
Abbildung 24: <i>ADAM17</i> exprimierende PBMC und LIL. Die relative <i>ADAM17</i> Expression durch A) PBMC und B) LIL ist normiert auf den Median der Kontrollen dargestellt (Median aus A) n = 9 bzw. 8; B) n = 8 bzw. 11; Kontrollgen: <i>HPRT1</i>).....	74
Abbildung 25: Western Blot zum Nachweis von ADAM-17 in seiner pro und reifen Form. Dargestellt ist in A) die Detektion von ADAM-17 und in B) die des Kontrollproteins β-Aktin und in C) die densitometrische Auswertung der ADAM-17 Signalintensität, normalisiert auf β-Aktin (Auftragung: 1. Marker (250 – 10 kDa); 2. – 4. PBMC von 3 Gesundkontrollen; 5. – 7. PBMC von 3 AIH Patienten).....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	20
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien.....	22
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 4: Kits	26
Tabelle 5: Software	26
Tabelle 6: Antikörper	27
Tabelle 7: Zusammensetzung der Kulturmedien.....	28
Tabelle 8: Zusammensetzung allgemeiner Puffer	29
Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer zum Proteinnachweis.....	29
Tabelle 10: Klinische Daten zu den Patienten und Kontrollpersonen. N = Gesamtanzahl; w = weiblich; m = männlich; Immunsup. = Immunsuppressive; DZ = Durchflusszytometrie; PBMC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; Beh. = Behandlung; IFX = Infliximab; n. v. = nicht verfügbar; LIL = leberinfiltrierende Lymphozyten; GNLY = Granulysin; PRF = Perforin; GZMB = Granzym B. Normalwerte AST und ALT bei Frauen 10 – 35 IU/l, bei Männern 10 – 50 IU/l; IgG 7 – 16 g/l; γ -Globulin 10,3 – 18,2 %. Remission ist als normale AST-, ALT-, IgG- und γ -Globulin-Werte definiert. Das Alter, sowie die AST-, ALT-, IgG- und γ -Globulin-Werte sind als Median mit den Extremwerten (in Klammern) angegeben. Nicht verfügbare Daten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. So fehlen in den Angaben Daten von ¹ 1, ² 2, ³ 3, ⁴ 4, ⁵ 5, ⁶ 6 Personen.....	31
Tabelle 11: Zusammensetzung des Mastermixes zur cDNA-Synthese	43
Tabelle 12: Programm zur Umschreibung von RNA in cDNA.....	43
Tabelle 13: Zusammensetzung des qPCR Mastermix.....	44
Tabelle 14: qPCR Programm	44
Tabelle 15: Zusammensetzung des SDS-PAGE Gele.....	46

Publikationen und Kongressbeiträge

Bovensiepen, C. S.*, Schakat, M.*, Sebode, M., Zenouzi, R., Hartl, J., Peiseler, M., Li, J., Henze, L., Woestemeier, A., Schramm, C., Lohse, A. W., Herkel, J. & Weiler-Normann, C. (2019). TNF-Producing Th1 Cells are Selectively Expanded in Liver Infiltrates of Patients with Autoimmune Hepatitis. *J Immunol*, 203 (12), 3148-3156. Doi:10.4049/jimmunol.1900124

[*Geteilte Erstautorschaft]

02/2019 Poster bei der Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) in Heidelberg: Visualization and analysis of inflammatory type T-cells in autoimmune hepatitis (Schakat, M., Bovensiepen, C. S., Wöstemeier, A., Sebode, M., Lohse, A. W., Schramm, C., Herkel, J. & Weiler-Normann, C.)

Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse für die Möglichkeit, meine Dissertation an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik anfertigen zu dürfen und Herrn Prof. Dr. Stefan Hoth, für seine Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Christina Weiler-Normann für die Vergabe des interessanten Themas, ihr entgegengebrachtes Vertrauen, die liebevolle, freundschaftliche Betreuung und ihr stets offenes Ohr bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Johannes Herkel für die kompetente Betreuung und seine stets für Fragen offenen stehende Tür, sowie seinen guten Ideen und Anregungen.

Auch bei Herrn PD Dr. Dirk Schmidt-Arras und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die hilfreiche, unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

An alle Kollegen aus O58 richtet sich mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft, guten Ratschlägen und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich Jenny, Nina und Martina für die technische Unterstützung danken.

Ein spezieller Dank geht ebenfalls an alle Blutspender und Blutabnehmer, ohne die diese Arbeit nicht realisierbar gewesen wäre.

An dieser Stelle möchte ich ein besonders großes Dankeschön an meine Familie richten, die mir mein Studium erst ermöglicht hat und mich in meinem gesamten Werdegang immer unterstützte. Auch danke ich ihr, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich auch meinen Freunden für ihre mentale Unterstützung und die nötige Abwechslung zu dieser Arbeit danken. Ein besonderer Dank geht hier an den Sanitätsdienst und Katastrophenschutz der Malteser.

Eidesstattliche Erklärung

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

Datum

Miriam Schakat