

Charakterisierung leberspezifischer Immunantworten bei chronischer autoimmuner Hepatitis in einem neuen Mausmodell

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Humanbiologin Katja Fischer
geboren am 12. August 1981 in Rostock

2011

Referent: Prof. Dr. Heiner Wedemeyer
Koreferent: Prof. Dr. Reinhard Schwitzer
Tag der Promotion: 13.12.2011

Die Neugier steht immer an erster Stelle des Problems,
das gelöst werden will.
Galileo Galilei, (1564 - 1642)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
Zusammenfassung	9
Abstract	11
A. EINLEITUNG	13
1 Autoimmunität	13
1.1 Definition	13
1.2 Zentrale und periphere Toleranzmechanismen	13
1.3 Bruch der Toleranz - Autoimmunerkrankungen	14
2 Das Immunsystem der Leber	16
2.1 Anatomie der Leber	16
2.2 Zellen des Immunsystems in der Leber	16
2.3 Angeborene Immunantworten	17
2.4 Antigenpräsentierende Zellen (APC)	19
2.5 Adaptive Immunantworten	20
3 Autoimmune Hepatitis	22
3.1 Definition	22
3.2 Epidemiologie und Subtypen der AIH	22
3.3 Diagnostik (Symptome, Laborparameter, Histologie)	23
3.4 Ätiologie	24
3.5 Immunpathogenese	24
3.6 Therapie und Transplantation	25
4 Tiermodelle der autoimmunen Hepatitis	27
4.1 Toleranzbruch in Inzuchtstämmen	27
4.2 Zytokin-Modelle	28
4.3 Genetische Hepatitis-Modelle	28
4.4 Transgene Tiermodelle	29
5 Hypothese und Ziele der Arbeit	31
B. MATERIAL UND METHODEN	32
1 Material	32
1.1 Geräte	32
1.2 Hilfsmittel	33
1.3 Reagenzien und Chemikalien	34
1.3.1 Verbrauchsmaterialien	34
1.3.2 Restriktionsenzyme	37
1.3.3 Plasmide	38
1.3.4 Oligonukleotide	39
1.3.5 Primäre Antikörper	40
1.3.6 Sekundäre Antikörper	41
1.3.7 Bakterien und Zelllinien	41
1.3.8 Mäusestämme	42
1.4 Puffer	42
1.4.1 Molekularbiologische Arbeiten	42
1.4.2 Proteinbiochemische und histologische Arbeiten	43

1.4.3	Zellbiologische Arbeiten	45
2	Methoden	47
2.1	Molekularbiologische Arbeiten	47
2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	47
2.1.3	Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen, Agarosegelen oder Zellen	48
2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.1.5	Restriktionsspaltung	49
2.1.6	Dephosphorylierung und Ligation linearisierter Vektoren	49
2.1.7	Hitzeschocktransformation	49
2.1.8	Mini-Plasmidpräparation aus Bakterien	50
2.1.9	Endotoxin-freie (EF) Maxi-Plasmidpräparation aus Bakterien	50
2.1.10	Kryokonservierung von Bakterien	50
2.1.11	Aufreinigung von Gesamt-RNA	50
2.1.12	Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription	51
2.1.13	In-vitro-Mutagenese	51
2.1.14	Herstellung eines rekombinanten Adenovirus	52
2.1.15	Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation	53
2.1.16	Virustitration	53
2.1.17	Infektion von 293-Zellen mit rekombinanten Adenoviren	53
2.2	Proteinbiochemische Arbeiten	54
2.2.1	Präparation von Gesamtzellextrakten	54
2.2.2	Proteinmengenbestimmung nach Bradford	54
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.2.4	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	54
2.2.5	Western Blot	55
2.2.6	Herstellung rekombinanter Proteine	55
2.3	Zellbiologische Arbeiten	56
2.3.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur	56
2.3.2	Zelllinien und ihre Kultivierung	56
2.3.3	Auftauen, Einfrieren und Zählen eukaryotischer Zellen	56
2.3.4	Präparation von murinen Zellen aus Milz und Lymphknoten	56
2.3.5	Präparation von intrahepatischen Leukozyten	57
2.3.6	Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	57
2.3.7	Stimulation von murinen T Zellen	57
2.3.8	Anreicherung von Zellen über magnetische Zellsortierung	58
2.3.9	Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen	58
2.3.10	Intrazelluläre Färbung für durchflusszytometrische Messungen	58
2.3.11	Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)	59
2.3.12	B-Zell-Immunospot-Assay	59
2.4	Histologische Arbeiten	60
2.4.1	Herstellung von Gewebsschnitten	60
2.4.2	H&E-Färbung von Paraffinschnitten	60
2.4.3	Versilberung von Paraffinschnitten	61
2.4.4	Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten	61
2.4.5	Foxp3-Färbung auf Kryoschnitten	61
2.4.6	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Rattenschnitten	62
2.4.7	Ishak Score	62
2.5	Mausversuche	62
2.5.1	Tierhaltung	62
2.5.2	Anästhesie bei der Maus	62
2.5.3	Serumgewinnung bei der Maus	63
2.5.4	Blutzucker-Bestimmung	63
2.5.5	Intravenöse und intraperitoneale Injektion bei der Maus	63
2.5.6	Hydrodynamischer Transfer von Plasmiden	63
2.5.7	Adoptiver Transfer von T-Lymphozyten oder Serum	63
2.5.8	Behandlung mit Diphtherietoxin (DT)	64
2.5.9	Partielle Hepatektomie	64
2.5.10	Therapie mit Kortikoiden	64
2.5.11	Klinische Parameter	64
2.6	Statistiken	64

C. ERGEBNISSE.....	65
1 Leberspezifische Expression humaner Autoantigene mit Hilfe adenoviraler Vektoren...65	
2 Transiente Antwort gegen den Adenovirus.....67	
3 Bruch der humoralen Toleranz nach Infektion mit Ad-FTCD, Ad-2D6 und Ad-SLA68	
4 Die Rolle der genetischen Prädisposition und des immunogenen Antigens72	
5 Die Ad-FTCD induzierte AIH ist chronisch und führt zu Fibrose75	
6 Die Rolle des Gefahrensignals bei der Induktion der AIH.....78	
7 Charakterisierung der intrahepatischen Lymphozyten.....79	
8 Adoptiver Transfer der induzierten AIH84	
9 Antigenpezifität der AIH-vermittelnden T-Zellen86	
10 Die Induktion der AIH ist abhängig von regulatorischen T-Zellen88	
11 Therapie der induzierten AIH mit Steroiden.....90	
D. DISKUSSION.....	92
1 Identifikation der auslösenden Mechanismen der AIH mit Hilfe des neuen Modells92	
2 Mechanismen der Chronizität der emAIH.....95	
3 Die Rolle von Tregs bei der Induktion und Progression von AIH99	
4 emAIH – ein präklinisches Modell zur Entwicklung von Therapien100	
5 Die Effekte der Antigene CYP2D6 und SLA im Modell101	
6 Zusammenfassung und Ausblick102	
Literaturverzeichnis105	
Anhang.....116	
Curriculum Vitae116	
Danksagung117	
Erklärung zur Dissertation118	

Abkürzungen

2D6	Cytochrom P450 2D6
A.bidest	Aqua bidest
AIH	Autoimmune Hepatitis
Aire	<i>autoimmune regulator gene</i>
ALT	Alaninaminotransferase
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen-presenting cells</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ASGPR	Asialoglykoprotein Rezeptor
AST	Aspartataminotransferase
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans (<i>complete Freund's Adjuvant</i>)
ConA	Concanavalin A
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4</i>
DAPI	4'6-Diamino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DT	Diphtherietoxin
EDTA	Ethylenediamintetraacetat
ELISPOT	<i>Enzyme-linked Immunospot Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FTCD	Formiminotransferase Cyclodeaminase
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein

HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonic acid
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse-raddish peroxidase</i>)
HSV	Herpes Simplex Virus
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenous
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC-1	<i>Liver-Cytosol-1</i>
LCMV	Lymphotrophes Chriomenigitisvirus
LFA	Funktionelles Leukozytenantigen (<i>leukocyte functional antigen</i>)
LKM-1	<i>Liver-Kidney-Microsome-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibilty complex</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle (<i>natural killer T cell</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle (<i>natural killer cell</i>)
NO	Stickoxide (<i>nitric oxides</i>)
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	<i>Programmed Death-1</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyd

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s.g.	so genannten
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SLA	<i>Soluble Liver Antigen</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Treg	regulatorischen T-Zellen
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.T.	zum Teil

Zusammenfassung

Die autoimmune Hepatitis (AIH) ist eine chronische Erkrankung der Leber, die durch einen Verlust der Immuntoleranz gegenüber Lebergewebe entsteht und zur Zirrhose sowie Leberversagen führen kann. Ein Großteil der Patienten kann mit Steroiden erfolgreich behandelt werden. Die meist lebenslange Therapie hat allerdings zahlreiche Nebenwirkungen und ist bei 10-20% der Erkrankten unwirksam. Für die Entwicklung neuer Therapien mit weniger negativen Auswirkungen auf den Patienten und möglichst langfristiger Wirkung fehlt jedoch das Verständnis über die Pathogenese der AIH. Um die Ätiologie der AIH besser zu verstehen, wurden in der Vergangenheit zahlreiche Tiermodelle entwickelt. Die meisten dieser Modelle brachten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Toleranzmechanismen der Leber, zeigten jedoch oft nur transiente Immunantworten der Leber oder nutzten T-Zell-Rezeptor (TCR)-transgene Tiere und die leberspezifische Expression von Neo-Antigenen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein chronisches Mausmodell entwickelt, das den Charakteristika der AIH entspricht und zudem wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Immunpathogenese liefert.

Eine selbst-limitierenden Infektion mit Adenoviren, die das heterologe humane AIH Typ-2 Antigen Formiminotransferase Cyclodeaminase (FTCD) leberspezifisch exprimierten, führte in genetisch prädisponierten *non-obese diabetic* (NOD)-Mäusen zum Bruch der Toleranz. Nach einer akuten Phase mit transienter Genexpression und Transaminasen-Anstieg wurden in den Mäusen ein Bruch der humoralen Toleranz mit antigenspezifischen Autoantikörpern sowie Hypergammaglobulinämie und eine massive zelluläre Infiltration der Leber beobachtet. Die Progressivität dieser chronischen autoimmunen Hepatitis (AIH) konnte anhand zunehmender Ishak Scores und beginnender Fibrose gezeigt werden.

Mit dem neuen Mausmodell konnte erstmalig die Genetik, Umweltfaktoren und das Prinzip der Molecular Similarity als auslösende Mechanismen der AIH nachgewiesen werden. Bei der Induktion der AIH ist das Adenovirus als Gefahrensignal unerlässlich und durch Verwendung unterschiedlicher Mausstämme wurde außerdem gezeigt, dass auch der genetische Hintergrund eine wichtige Rolle spielt. Durch den alleinigen Bruch der humoralen Toleranz und dem Ausbleiben einer chronischen Immunantwort unter Verwendung von Adoviren, welche die humanen Antigene CYP2D6 oder SLA exprimierten, wird die Bedeutung der Immunogenität des Antigens und die Problematik, die hepatische Toleranz zu brechen, deutlich. Weiterhin wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal CD4+T-Zellen als Vermittler dieser chronischen Erkrankung identifiziert. Sowohl der adoptive Transfer der AIH in immundefiziente Empfänger durch CD4+T-Zellen als auch die IFN- γ -Produktion antigenspezifischer T-Zellen im ELISPOT wurden demonstriert. Außerdem konnte in der Leber der erkrankten Tiere ein lokaler Anstieg an regulatorischen T-Zellen (Tregs) sowie der

NK-Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Experimenten in Treg-depletierbaren Mäusen wurde außerdem erstmalig gezeigt, dass Tregs nicht nur in der chronischen Phase sondern auch bei der Induktion der AIH eine regulierende Funktion ausüben.

Das neue Mausmodell der AIH ist somit ideal, um weitere Informationen über Mechanismen der Immunpathogenese sowie der Funktion von Tregs und NK-Zellen bei der Entstehung und Entwicklung einer AIH zu liefern. Darüber hinaus ist es aufgrund der übereinstimmenden diagnostischen Kriterien und der gezeigten Therapierbarkeit mit einem klassischen Steroid ein geeignetes präklinisches Modell der AIH. In Zukunft könnte es zum Testen neuer therapeutischer Interventionen, wie z.B. immunmodulierender und antigenspezifischer Therapien, genutzt werden, um damit die Therapieoptionen der Patienten zu verbessern.

Schlagworte: Autoimmune Hepatitis, Virusinfektion, Immunpathogenese

Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is defined as a chronic liver disease with loss of tolerance against liver tissue eventually leading to cirrhosis. 80-90% of the patients can be treated with a life-long standard treatment regime using steroids. Unfortunately there are strong drug-related side effects and steroid-refractory patients. Therefore there is a need for a model system to investigate the complex immunopathogenesis of this chronic disease and subsequently to develop new therapeutic interventions. Current models of AIH were important to understand and modulate hepatic immune responses but were not appropriate to study mechanisms in chronic AIH, as they usually just resulted in a short, self-limited hepatitis. In this study we attempted to develop a new mouse model of chronic AIH by combining a danger signal with a heterologous human self-antigen within a genetically predisposed host.

To this end we generated adenoviral constructs expressing common autoantigens of human AIH showing 80% homology to the murine protein. Following an acute phase of hepatitis with elevated levels of liver transaminases and transient gene expression within the liver, we could show chronic evolving liver-specific autoimmune responses after the infection of non-obese diabetic (NOD) mice with an adenovirus expressing the human formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD), a common autoantigen of AIH type-2. This supports the notion that the induction of AIH is linked to environmental as well as genetic factors. Chronic disease was confirmed by massive leukocyte infiltrates and fibrosis which were progressing over time. In parallel we detected a break of humoral tolerance with hypergammaglobulinemia and antigen-specific autoantibodies. Additionally break of humoral tolerance could be achieved by using other non-predisposed mouse strains or other heterologous antigens like the human CYP2D6 and SLA, two important autoantigens of AIH, despite an absent chronic disease. This demonstrates the important impact of the immunogenicity of the heterologous antigen and the problems to break hepatic tolerance against liver tissue. Furthermore we identified CD4+T cells to be the driving force of AIH induction by the detection of IFN- γ producing antigen-specific T cells using an ELISPOT assay and a successful transfer of the disease by CD4+T cells into immune-deficient syngeneic hosts. Moreover we detected a local increase in NK cells as well as regulatory T cells (Tregs). Using a Treg depletion model we could show that Tregs play an important role in the induction of AIH.

In summary, the new mouse model of AIH can be used as a preclinical model of AIH since it shares many characteristics of the human disease and shares many mechanisms with the human disease like the association of genetic and environmental factors with the induction of AIH. Like in humans prednisolone leads to a remission of the chronic disease. The model will be helpful to test new therapeutic intervention of AIH with less side-effects and improved

responsiveness and for investigating the function of Tregs, NK cells within disease development.

Keywords: autoimmune hepatitis, virusinfection, immunopathogenesis

A. EINLEITUNG

1 Autoimmunität

1.1 Definition

Von Autoimmunität spricht man, wenn die normalen Mechanismen der Selbst-Toleranz des Immunsystems nicht funktionieren bzw. gebrochen werden und es zur Immunreaktion gegen körpereigene Zellen und Gewebe kommt. Als Folge können Autoimmunerkrankungen entstehen.

1.2 Zentrale und periphere Toleranzmechanismen

Das Immunsystem besteht aus angeborenen und adaptiven Immunantworten. Das angeborene Immunsystem dient der schnellen Reaktion der Körpers auf Pathogene. Hierzu gehören phagozytierende Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie Mastzellen, Natürliche Killerzellen (NK) und das Komplementsystem des Blutes. Diese Immunantwort ist jedoch nicht lang anhaltend und nicht spezifisch gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet. Das adaptive Immunsystem, zu dem T-Zellen und Antikörperproduzierende B-Zellen gehören, ist hingegen spezifisch und entwickelt sich im Lauf des Lebens in Adaptation auf Infektionen weiter. Ein so genanntes immunologisches Gedächtnis bildet sich aus. Die Spezifität entsteht durch Gen-Rearrangements während der Lymphozytenentwicklung in den zentralen lymphatischen Organen und ist zunächst zufällig. Dabei kommt es allerdings auch zur Entwicklung von Lymphozyten, die eine hohe Affinität für körpereigene Antigene haben. Diese Subpopulationen werden jedoch normalerweise schon frühzeitig aus dem Zellpool entfernt (negative thymische Selektion oder zentrale Toleranz) oder nach Reifung in peripheren Organen und Geweben durch verschiedene Mechanismen kontrolliert (periphere Toleranz). Die zentrale Toleranz des B-Zell- und T-Zell-Repertoires wird im Knochenmark bzw. im Thymus entwickelt. Wenn eine unreife B-Zelle ihr Antigen im Knochenmark erkennt, d.h. der B-Zell-Rezeptor spezifisch für ein körpereigenes Antigen ist, wird diese Zelle durch Apoptose (programmierter Zelltod) eliminiert. Man spricht von der klonalen Deletion. Eine Alternative ist das Rezeptor-Editing. Hierbei wird durch weitere Gen-Rearrangements der vorhandene B-Zell-Rezeptor verändert und durch einen neuen Rezeptor ersetzt. Im Thymus werden körpereigene Proteine nach Prozessierung in Verbindung mit MHC (*major histocompatibility complex*) auf Thymusepithelzellen präsentiert. Unreife T-Zellen, die ihr Antigen im Thymus erkennen, werden ebenfalls durch den programmierten Zelltod eliminiert. Einige Lymphozyten, die ihr Antigen nur mit einer geringen Affinität binden, gehen in die Peripherie und verbleiben dort in einem ignoranten, latent autoreaktiven Zustand. Zu den peripheren Toleranzmechanismen gehören Anergie (Nichtreagieren auf ein Antigen), Deletion (Zelltod durch Apoptose) und Unterdrückung durch

regulatorische T-Zellen (Tregs). Periphere Anergie entsteht immer dann, wenn T-Zellen ihr Antigen auf MHC präsentiert bekommen, aber eine Kostimulation ausbleibt. Die Zelle reagiert auf die TCR-Peptid-MHC Interaktion nicht mit Proliferation und Zytokinproduktion, d.h. es entsteht keine Effektorzelle. Zudem können T-Lymphozyten, die ihr körpereigenes Antigen ohne Inflammation erkennen sowie Zellen, die wiederholt durch Antigene stimuliert werden, in Apoptose gehen. Regulatorische T-Zellen sind Zellen, die für ein körpereigenes Antigen spezifisch sind und im Thymus sowie in der Peripherie aus CD4+T-Zellen differenzieren können. Diese Zellen tragen zur peripheren Toleranz bei, indem sie die Aktivierung und Effektorfunktionen anderer autoreaktiver Zellen im gleichen Gewebe mit Hilfe anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , unterdrücken bzw. über interzelluläre Signale Toleranz induzieren (siehe Tabelle 1) (Abbas et al. 2007; Murthy et al. 2008).

Toleranztyp	Mechanismus	Ort
<u>Zentrale Toleranz</u>	Rezeptor-Editing (B-Zellen) bei Misserfolg auch Deletion (negative Selektion)	Knochenmark Thymus
<u>Periphere Toleranz</u>		
Ignoranz	Zellinaktivierung durch gering affines Antigen, latent reaktiv	Sekundäre lymphatische Organe
Periphere Anergie	Zellinaktivierung durch schwaches Signal ohne Kostimulation	Sekundäre lymphatische Organe
Klonale Deletion	Apoptose nach Aktivierung	Sekundäre lymphatische Organe & Orte mit Inflammation
Regulatorische T-Zellen	Unterdrückung durch Zytokine, Interzelluläre Signale	Sekundäre lymphatische Organe & Orte mit Inflammation

Tabelle 1: Zusammenfassung der zentralen und peripheren Toleranzmechanismen. Verändert nach (Murthy et al. 2008).

1.3 Bruch der Toleranz - Autoimmunerkrankungen

Autoimmune Erkrankungen betreffen ungefähr 5% der Bevölkerung der westlichen Länder (Sinha et al. 1990; Jacobson et al. 1997). Autoimmunität entsteht aus einer Kombination aus genetischer Prädisposition, Bruch der natürlichen Toleranz und dem Einfluss von Umweltfaktoren. Eine unvollständige Selektion oder Regulation der autoreaktiven Lymphozyten oder die unzureichende Präsentation einiger Antigene führen dazu, dass Selbstantigene durch autoreaktive Zellen erkannt werden, diese dadurch aktiviert werden und in der Folge proliferieren und sich in Effektorzellen differenzieren. Daraus resultiert eine anschließende Gewebeerstörung durch die Effektorzellen.

Die meisten Autoimmunerkrankungen sind polygenetisch. Unter diesen Genen haben MHC Gene die stärkste Assoziation mit Autoimmunität, v.a. MHC-II (HLA-DR und DQ). In Studien

mit Patienten und Knockout-Mäusen wurden aber auch viele Nicht-MHC-Gene identifiziert, die den Erhalt der Toleranz gegen Selbst beeinflussen (z.B. *CTLA-4*, *AIRE*, *FOXP3*) (Aaltonen et al. 1997; Bennett et al. 2001; Ueda et al. 2003).

Viren und Bakterien können zur Entstehung und Verschlechterung einer Autoimmunerkrankung beitragen, da sie bestimmte molekulare Muster auf ihrer Oberfläche tragen, die so genannten PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Die PAMPs werden von PRR (*pattern recognition receptors*) der Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt, stimulieren deren Expression kostimulierender Moleküle und darüber die Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Das adaptive Immunsystem wird demnach durch dieses Gefahrensignal (*Danger signal*) (Matzinger 1994) bzw. die Erkennung von infektiösen nicht körpereigenen Molekülen aktiviert (Janeway 1992). Wenn die Infektion eine lokale angeborene Immunantwort induziert, wodurch Leukozyten ins Gewebe rekrutiert werden und es zur Aktivierung von T-Zellen kommt, die körpereigene Antigene erkennen und nicht pathogenspezifisch sind, spricht man von „Bystander Aktivierung“. Eine „Molekulare Mimikry“ liegt vor, wenn T-Zellen oder Antikörper, die auf eine Infektion hin gebildet werden, mit einem körpereigenen Antigen kreuzreagieren. Es können nach einer Virusinfektion aber auch Gedächtnis-T-Zellen entstehen, die mit Epitopen eines anderen nicht verwandten Virus kreuzreagieren und hierdurch die Immunantwort auf diese zweite Infektion verändern. Dieses Prinzip wird als heterologe Immunität bezeichnet (Wedemeyer et al. 2001; Fyttili et al. 2008). Darüber hinaus können anatomische Veränderung des Gewebes durch eine Entzündung, Ischämie oder Trauma dazu führen, dass Antigene entstehen, die bisher vor dem Immunsystem geschützt bzw. versteckt waren (Sequestrierung) (Abbas et al. 2007; Murthy et al. 2008).

Autoimmune Erkrankungen können systemisch oder organspezifisch sein. Die Bildung zirkulierender Immunkomplexe aus Antigenen und Antikörper führt zu einer systemischen Erkrankung z.B. der systemische Lupus erythematoses. Autoantikörper oder T-Zellantworten gegen körpereigene Antigene führen eher zu einer organspezifischen Erkrankung z.B. Typ 1 Diabetes im Pankreas und die autoimmune Hepatitis in der Leber (Abbas et al. 2007; Murthy et al. 2008).

2 Das Immunsystem der Leber

2.1 Anatomie der Leber

Die Leber ist ein einzigartiges anatomisches und immunologisches Organ, in welchem antigenreiches Blut aus dem Darm, dem Pankreas und der Milz durch ein Netzwerk aus weitlumigen Blutkapillaren (Sinusoide) gepresst wird und von antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten kontrolliert wird (Racanelli et al. 2006). Der überwiegende Teil der Leberfunktionen wird ausschließlich von einem Zelltyp, den Leberepithelzellen (Hepatozyten), erfüllt. Das Leberparenchym stellt rund 60-80% der gesamten Zellpopulationen der Leber dar. Die klassische Baueinheit der Leber, das Leberläppchen, enthält radiär angeordnete Reihen aus Hepatozyten, die auf ein zentral gelegenes Gefäß (Zentralvene, *Vena centralis*) zustreben und zwischen denen Sinusoide verlaufen (siehe Abb.1). Diese Kapillaren sind von dünnen Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC) umsäumt, deren Basallamina beim Menschen gelöchert ist und damit einen Austausch zwischen Blut und Parenchym ermöglicht (Wisse 1970). Die Periportalfelder enthalten die Endverzweigungen der Leberarterie (*Arteria interlobularis*) und der Pfortader (*Vena interlobularis*) sowie einen Gallengang und Lymphgefäße. Die Endverzweigungen der Blutgefäße verschmelzen schon in der Peripherie der Läppchen miteinander, so dass in den Sinusoiden Mischblut an den Leberzellbalken vorbei Richtung Zentralvene entlang fließt. Von dort gelangt das Blut in die Lebervene und weiter zur unteren Hohlvene (siehe Abbildung 1).

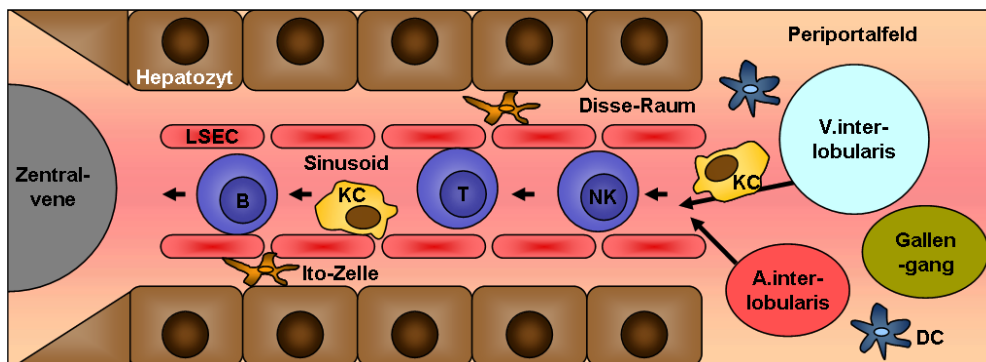


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Leber. Die Sinusoide sind begrenzt von einer fenestrierten Schicht dünner Endothelzellen (LSEC). Der Disse-Raum enthält Ito-Zellen in einer lockeren extrazellulären Matrix. B, B-Zellen; DC, Dendritische Zellen; KC, Kupfer-Zellen; NK, Natürliche Killer-Zellen; T, T-Zellen. Verändert nach (Racanelli und Rehmann 2006).

2.2 Zellen des Immunsystems in der Leber

Ungefähr 30% des gesamten Blutes fließt pro Minute durch die Leber und transportiert dabei täglich viele Lymphozyten durch die Leber (Sheth et al. 2001). In der menschlichen Leber befinden sich zudem ungefähr 10^{10} intrahepatische Lymphozyten, welche im Parenchym und

in den Periportalfeldern verstreut vorliegen (Morsy et al. 2005; Racanelli und Rehermann 2006). Für die immunologischen Funktionen der Leber von Bedeutung sind dabei sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen und natürliche Killer-T-Zellen, NKT-Zellen) als auch des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen). Zu den klassischen T-Zellen, den $\alpha\beta$ -T-Zellen, gehören CD4+ und CD8+T-Zellen. Im Gegensatz zum Blut ist der Anteil der CD8+T-Zellen in der Leber deutlich höher als der der CD4+T-Zellen und es liegt eine höhere Frequenz an Effektor- und Gedächtniszellen vor. NKT-Zellen zählen zu den nicht-klassischen T-Zellen und ihr Anteil mit bis zu 30% aller intrahepatischen Lymphozyten ist in der Leber bedeutend höher als in anderen Organen. $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen ebenfalls eine sehr prominente Zellpopulation in der Leber dar. Sie repräsentieren rund 15-25% aller intrahepatischen Lymphozyten, was die Leber zur reichsten Quelle für $\gamma\delta$ -T-Zellen macht (siehe Abbildung 2).

Neben den bereits genannten Immunzellen der Leber spielen auch die ansässigen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) bei der Immunregulation und für den Erhalt der Toleranz in der Leber eine wichtige Rolle. Diese können im Blut vorhandene Antigene phagozytieren aber auch Antigene präsentieren, die nach dem Zelltod Pathogen-infizierter Hepatozyten freigesetzt werden. Zu den APC der Leber gehören die Kupffer-Zellen, die LSEC und dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) sowie die Hepatozyten selber.

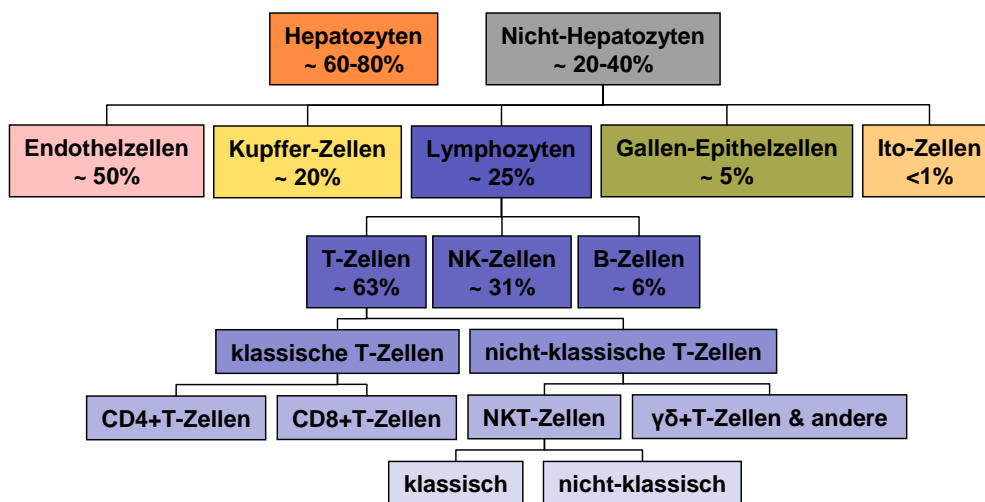


Abbildung 2: Darstellung der zellulären Zusammensetzung der gesunden humanen Leber. Die Zahlen entsprechen der geschätzten Häufigkeit jeder Population relativ zur Gesamtzahl der parenchymalen und nicht-parenchymalen Zellen in der Leber. Verändert nach (Racanelli und Rehermann 2006).

2.3 Angeborene Immunantworten

Die Zusammensetzung der Leber, mit ihrem hohen Anteil an Leukozyten, allein lässt schon vermuten, dass das Immunsystem in der Leber eine sehr wichtige Rolle spielt. Diese

Feststellung beruht aber auch auf Beobachtungen wie z.B. der Entwicklung einer Hepatitis während einer lang anhaltenden Virusinfektion und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen der Leber oder andererseits auch der Entwicklung von Immuntoleranz gegenüber Antigenen, welche die Leber passieren und der hohen Transplantat-Akzeptanz der Leber trotz MHC-Diskrepanz (Calne et al. 1969; Zakim et al. 2006).

Zu den wichtigen Komponenten der angeborenen Immunantwort der Leber gehören die Kupffer-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen. Die wichtigen immunologischen Funktionen der Kupffer-Zellen sind die Phagozytose von z.B. bakteriellen Abbauprodukten, apoptotischen Zellresten und Tumorzellen, zum anderen gehören sie wie andere Makrophagen zu den APC und produzieren nach Aktivierung lösliche Zytokine. In Antwort auf physiologische Konzentrationen von bakteriellen Stimuli wie LPS produzieren Kupffer-Zellen TNF- α und IL-10 (Knolle et al. 1995). Letztere regulieren die rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigenen und die MHC-II Expression von LSEC und DC runter und unterdrücken die Aktivierung von T-Zellen (Groux et al. 1996). Darüber hinaus regulieren IL-12 und IL-18, beides von Kupffer-Zellen freigesetzte Zytokine, die Differenzierung und lokale Expansion IFN- γ -produzierender NK-Zellen. Weitere Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α fördern hingegen die Rekrutierung und Aktivität von neutrophilen Granulozyten, welche neben den Kupffer-Zellen auch an der Beseitigung von Pathogenen beteiligt sind (siehe Abbildung 3) (Gregory et al. 1998).

Die NK-Zellen der Leber schaffen eine Balance zwischen lokal synthetisierten pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Ihre Aktivität wird geregelt über aktivierende und inhibierende Oberflächenrezeptoren. D.h. bei Abwesenheit von Liganden inhibitorischer Rezeptoren (z.B. MHC-I bei Virusinfektion) sind die NK-Zellen leicht stimulierbar (Moretta et al. 1994). Die Aktivierung der NK-Zellen führt zur Lyse der Zielzelle, schnellen Produktion und Freisetzung von IFN- γ und kann durch Zytokine wie z.B. Typ-I IFN verstärkt werden (Biron 1998). IFN- γ stimuliert wiederum Hepatozyten und LSEC zur Freisetzung von Chemokinen (wie CXCL9), die T-Zellen zur Leber rekrutieren (Itoh et al. 2001).

Eine weitere wichtige Gruppe des angeborenen Immunsystems sind die NKT-Zellen. Diese Zellen besitzen NK-Zellmarker und einen semi-invarianten T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) mit dem sie Glykolipid-Komponenten von Mikroorganismen erkennen können. Die klassischen NKT-Zellen werden neben dem TCR-Signal durch IL-12 aktiviert (Bendelac et al. 1997; Kumagai et al. 1997). Die Aktivierung resultiert in einer Fas-vermittelten Apoptose der Zielzelle und der Freisetzung großer Mengen von IFN- γ . IL-18 stimuliert die Freisetzung von IL-4 (Leite-De-Moraes et al. 2001). Neuere Daten zeigen, dass NKT-Zellen außerdem noch eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen in der Leber spielen und regulatorische Funktionen zur Toleranzinduktion besitzen können (Kakimi et al. 2000; Monteiro et al. 2010).

2.4 Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Durch die Leber fließt das Blut aus dem Gastrointestinaltrakt über die Pfortader, das reich ist an Lebensmittel-Antigenen, Toxinen und bakteriellen Abbauprodukten, sowie aus dem Blutkreislauf über die Leberarterie. Demzufolge treffen in der Leber Antigene (z.B. pathogenen Ursprungs) und Leukozyten des Blutes aufeinander. Die physikalischen Bedingungen in der Leber erleichtern den Kontakt zwischen Leukozyten und Zellpopulationen der Sinusoide (McCuskey et al. 1993). LSEC haben eine enorme endozytotische Kapazität, v.a. zur Rezeptor-vermittelten Endozytose, und können im Unterschied zu anderen Endozyten eine Vielzahl an unterschiedlichen Liganden binden und sehr effektiv phagozytieren (Steffan et al. 1986). LSEC besitzen zusätzlich noch Oberflächenmoleküle, welche einerseits die Interaktion mit und die Adhäsion von Leukozyten ermöglichen und andererseits deren Funktion als APC aufzeigen (Lohse et al. 1996; McNab et al. 1996). Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen resultiert die Antigenpräsentation durch die LSEC sowie durch die Kupffer-Zellen in Toleranzinduktion bei CD4+ und CD8+T-Zellen (Crispe 2003). Wenn naive CD4+T-Zellen ihr Antigen in der Leber präsentiert bekommen, sekretieren sie IL-10 und IL-4 anstelle von IL-2 und IFN- γ (Knolle et al. 1999). Das Unterstützen der Th2-Antwort und die Unterdrückung des Th1 Phänotyps ist eine Form der Toleranzinduktion in der Leber (Klugewitz et al. 2002). Naive CD8+T-Zellen, die ihr Antigen von LSEC präsentiert bekommen, werden tolerant, d.h. sie produzieren nur wenig IL-2 und IFN- γ , haben eine geringe Zytotoxizität und Proliferation sowie ein hohes Maß an Apoptose (siehe Abbildung 3).

Eine weitere wichtige Population von APC in der Leber sind die DC. Sie sind in der Leber größtenteils unreif und sie haben besondere immunregulatorische Eigenschaften (Lau et al. 2003). Letztere zeichnen sich dadurch aus, dass naive T-Zellen, die von hepatischen DC aktiviert wurden, nicht zu starken zytoxischen Effektorzellen werden und dass hepatische DC große Mengen an anti-inflammatorischem IL-10 produzieren. (Khanna et al. 2000; Lu et al. 2001). DC der Leber fördern auch eher Th2-Antworten und induzieren die Apoptose in Th1-Zellen (Watanabe et al. 2003). Das Zytokin-Milieu der Leber mit hohen Mengen an IL-10 und TGF- β tragen zum tolerogenen Phänotyp der DC in der Leber und deren verringerten Migration zu den Lymphknoten bei (Cabillic et al. 2006).

Hepatozyten exprimieren unter inflammatorischen Bedingungen MHC-II und beeinflussen *in vivo* und *in vitro* nachweislich die inflammatorische CD4+T-Zell-Aktivität, was u.a. zu verlängerter Viruspersistenz führt (Herkel et al. 2003; Warren et al. 2006; Wiegard et al. 2007).

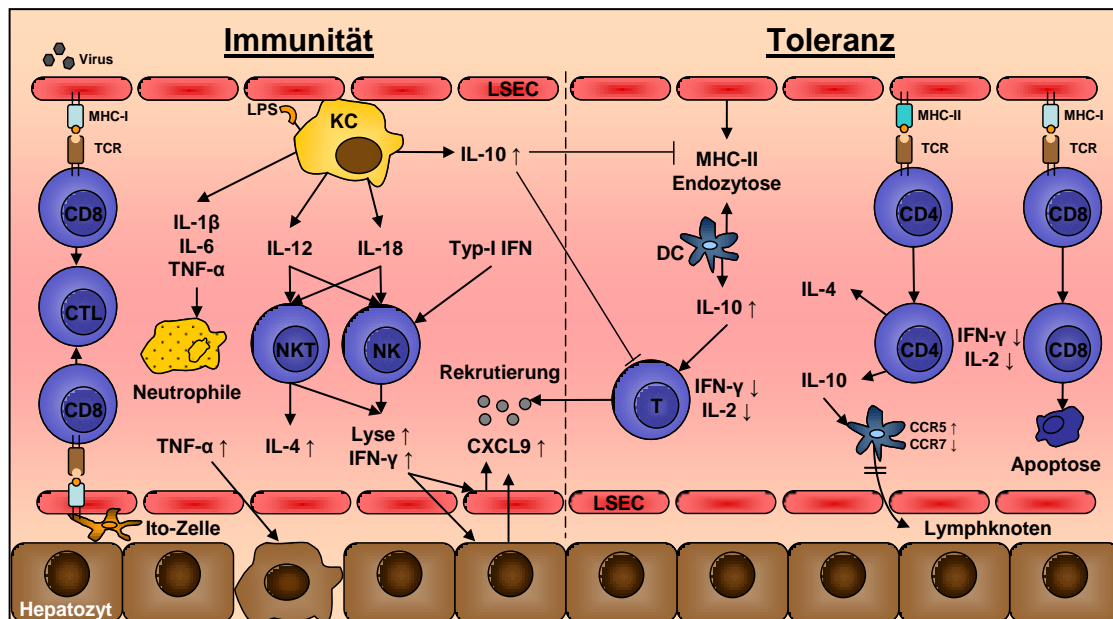


Abbildung 3: Immunreaktionen der Leber. Dargestellt sind angeborene und adaptive Immunantworten der gesunden Leber, die entscheidend zur Immunabwehr bzw. zur Toleranzinduktion beitragen. CTL, Zytotoxische T-Zellen; DC, Dendritische Zellen; KC, Kupfer-Zellen; Neutrophile, Neutrophile Granulozyten; NK, Natürliche Killerzellen; NKT, Natürliche Killer-T-Zellen; T, T-Zellen. Siehe Text für weitere Details. Verändert nach (Crispe 2003; Racanelli und Rehermann 2006).

2.5 Adaptive Immunantworten

Zu den adaptiven Immunantworten der Leber gehören neben den T-Zell- auch B-Zellantworten. B-Zellen sind nur sehr spärlich in der Leber zu finden (s.o.), weshalb über ihre Funktion in der Leber noch wenig bekannt ist. Aus Studien an HCV-infizierten Lebern weiß man jedoch, dass naive B-Zellen auch in der Leber stimuliert werden können, in intrahepatischen Keimzentren proliferieren und zu Antikörper-produzierenden Zellen differenzieren (Murakami et al. 1999). Diese follikulären Strukturen sind funktionell denen in den Lymphknoten sehr ähnlich.

Neben der genannten Toleranzinduktion von CD4+ und CD8+T-Zellen nach Präsentation des Antigens auf LSEC kann eine Immunantwort gegen pathogene Leberantigene auch mit einer CD4+ und CD8+T-Zellantwort assoziiert sein. Aktivierte CD8+T-Zellen werden dabei zunächst unabhängig von ihrem Antigen zur Leber rekrutiert bzw. dort abgefangen (Mehal et al. 1999). Diese Rekrutierung ist mit der ICAM-1 und VAP-1 Expression der LSEC und der Expression von LFA-1 auf der Oberfläche der CD8+T-Zellen zu erklären (Bertolino et al. 2005). Erst wenn die CD8+T-Zellen ihr spezifisches Antigen erkannt haben und aktiviert werden, wird eine Reaktionsfolge initiiert, beginnend mit Proliferation und IFN-γ-Produktion (Isogawa et al. 2005). Letztere ist allerdings nur kurzfristig und geht mit einer Expression von PD-1 einher. Die Lyse der Zielzelle beginnt dagegen recht spät nach Aktivierung und hält länger an. Der PD-1 Ligand (PD-L1) wird konstitutiv von LSEC, Kupfer-Zellen, Hepatozyten und Ito-Zellen produziert. PD-1 spielt eine Rolle bei der Deletion aktivierter CD8+T-Zellen

und damit der Senkung von Leberschäden. Die T-Zell-Toleranz nach Aktivierung der CD8+T-Zellen wird auch über den Weg des passiven Zelltods in der Leber erreicht, z.B. durch Entzug des Antigens oder der Überlebens-Faktoren wie IL-2 (Bertolino et al. 1998; Bertolino et al. 1999). Allerdings kann auch die Präsentation des Antigens auf Hepatozyten ohne Kostimulation zur Apoptose und Toleranz naiver CD8+T-Zellen führen (DeSilva et al. 1991; Holz et al. 2010).

Die Interaktion von naiven CD4+T-Zellen mit LSEC führt wie oben erwähnt zu einer Differenzierung Richtung Th2 und regulatorische T-Zellen mit einer hohen Expression von IL-10. Kruse et al. beschrieben außerdem eine Gruppe von T_{LSEC} , die von LSEC induziert werden, regulatorische Funktionen haben sowie in vivo das Auftreten einer AIH supprimieren konnten, aber Foxp3-negativ sind (Kruse et al. 2009). Diese Toleranzinduktion in der Leber ist wichtig, da durch die Leber eine Vielzahl von Antigenen transportiert, prozessiert sowie dem Immunsystem präsentiert werden, die nicht pathogenen Ursprungs sind und demnach keine Immunreaktion erfordern. Lebertoleranz wirkt nicht nur lokal sondern auch systemisch. Ein Beispiel dafür ist die Akzeptanz eines Hauttransplantates nach erfolgreicher Lebertransplantation desselben Spenders (Calne et al. 1969).

Unter bestimmten Bedingungen entsteht in der Leber eine akute oder chronische Immunantwort. Neben der bereits erwähnten Aktivierung und Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen zur Eliminierung von Pathogenen oder virusinfizierten Zellen, kann es auch zur Differenzierung von Effektorzellen des adaptiven Immunsystems kommen. Bei Virusinfektionen der Leber können beispielsweise hohe Mengen an Antigen, das auf MHC-I der LSEC kreuzpräsentiert wird sowie eine hohe TCR Affinität zum Bruch der LSEC-vermittelten Toleranzinduktion der CD8+T-Zellen und damit zur Differenzierung von Zytotoxischen T-Zellen (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*) führen (Schurich et al. 2010). CTL entstehen außerdem nach Kreuzpräsentation von exogenen Proteinen auf Ito-Zellen, welche sich im Disse-Raum unterhalb der LSEC befinden (Winau et al. 2007). In Abhängigkeit von dem Typ aber auch dem Aktivierungsstatus der APC, z.B. bei Erkennung eines Gefahrensignals, entsteht somit Immunität anstatt Toleranz. Ein ganz entscheidender Faktor für die Entstehung von Immunität in der Leber ist zudem die primäre T-Zellaktivierung im Lymphknoten. Dabei wandern reife DC von der Leber in benachbarte Lymphknoten und aktivieren dort die Proliferation und Differenzierung von antigenspezifischen T-Zellen. Die Entstehung von Effektorzellen und die Zerstörung des Leber-Parenchyms sind die Folge (Bowen et al. 2004). Leberschäden entstehen auch durch das pro-apoptische Zytokin TNF- α , welches von KC und T-Zellen nach Aktivierung und unter pro-inflammatorischen Bedingungen produziert wird (Abbas et al. 2007). Insbesondere virusinfizierte Hepatozyten sind empfindlich gegenüber der pro-apoptischen Wirkung dieses Zytokins (Knolle 2009) (siehe Abbildung 3). Eine

Unterbrechung der Toleranzmechanismen der Leber ist außerdem durch Toxine (z.B. Alkoholleber) und „Molekulare Mimikry“ (z.B. autoimmune Lebererkrankungen wie PBC und AIH) möglich (Khoruts et al. 1991; Manns et al. 1991; Shimoda et al. 1995).

3 Autoimmune Hepatitis

3.1 Definition

Die autoimmune Hepatitis (AIH) ist eine chronische Lebererkrankung, die charakterisiert ist durch den Toleranzverlust gegenüber Lebergeweben. Als erster beschrieb Waldenström 1950 die Erkrankung als eine chronische Hepatitis, die bei jungen Frauen auftrat und mit einem Ikterus, erhöhten Gammaglobulinen und Amenorrhö (fehlender Menstruation) einherging und schließlich zu einer Leberzirrhose führte (Waldenström 1950). Die autoimmune Hepatitis ist weiterhin definiert durch das Ansprechen auf immunsuppressive Therapie v.a. Steroide (Cook et al. 1971).

3.2 Epidemiologie und Subtypen der AIH

Die Prävalenz der AIH wird in Europa mit 5-20 Fällen pro 100.000 Einwohner angegeben während die Häufigkeit z.B. in Japan deutlich darunter liegt (Boberg et al. 1998). Frauen sind häufiger betroffen als Männer mit einem Verhältnis von 4:1 in Europa (Czaja et al. 1998). Die Erkrankung tritt sehr häufig schon im Kindesalter auf, wobei die Verlaufsform hier akut sein kann (Gregorio et al. 1997). Ein Drittel der älteren Patienten weisen schon bei der ersten Diagnosestellung ein chronisches Krankheitsbild mit Fibrose und Zirrhose auf, bei den Kindern ist es die Hälfte der Patienten.

Es gibt zwei AIH-Subtypen. Typ-1 ist die klassische Hepatitis, die charakterisiert ist durch die Anwesenheit anti-nukleärer Antikörper (ANA) und anti-*smooth-muscle-actin* (SMA) Antikörper und/oder anti-*soluble-liver-antigen* (SLA) (Maggiore et al. 1993; Vitozzi et al. 2002). Dieser Typ tritt häufiger bei jungen Frauen auf und spricht in der Regel gut auf Immunsuppressiva an. Es gibt eine starke genetische Assoziation mit den Haplotypen HLA-DR3 und -DR4. Patienten mit dem Merkmal DR3 haben einen früheren Krankheitsbeginn und schwereren Krankheitsverlauf, während DR4 mit einem späteren Auftritt der Erkrankung, häufigeren extrahepatischen Erkrankungen und besserer Therapierbarkeit einhergeht (Czaja et al. 1993; Strettell et al. 1997).

Typ-2 AIH ist durch zirkulierende anti-*Liver-Kidney-Microsome* (LKM-1) Antikörper oder anti-*Liver-Cytosol* (LC-1) Antikörper definiert (Maggiore et al. 1986; Lapierre et al. 1999). Anti-LKM-1 erkennt Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) (Gueguen et al. 1989; Manns et al. 1991) und anti-LC-1 Formiminotransferase Cyclodeaminase (FTCD), beides von Hepatozyten produzierte Enzyme. Dieser Subtyp tritt oft schon in jungen Jahren auf und ist mit HLA-DR3

und -DR7 assoziiert (Czaja et al. 1997; Bittencourt et al. 1999). Hinzu kommen ein akuter Krankheitsverlauf und ein schnellerer Übergang zur Leberzirrhose trotz Behandlung mit Immunsuppressiva, weshalb die Prognose ungünstiger ist als beim Typ-1 (Manns et al. 2001; Bogdanos et al. 2008). Um die Liste der genetischen Assoziationen mit dem erhöhten Auftreten einer AIH, d.h. MHC und Nicht-MHC Gene, und deren regionale Verteilung zu vervollständigen, sind die aktuellen Zusammenhänge in Tabelle 2 zusammengefasst.

Gene	Form	Subtyp der AIH	Population
MHC Gene			
• <i>HLA-A1-B8</i>		1	Nordamerika, Europa
• <i>HLA-DRB1*0301 (DR3)</i>		1 und 2	Nordamerika, UK, Spanien, Argentinien
• <i>HLA-DRB1*0401 (DR4)</i>		1	Nordamerika, Europa
• <i>HLA-DRB1*0404</i>		1	Mexiko
• <i>HLA-DRB1*0405</i>		1	Argentinien, Japan
• <i>HLA-DRB1*1301 (DR13)</i>		1	Nordamerika, Europa, Brasilien, Argentinien
• <i>HLA-DRB1-07 (DR7)</i>		2	Deutschland, Brasilien, UK
• <i>HLA-DQB1*0201</i>		2	Nordamerika, Europa
• <i>HLA-DQB1*0603</i>		2	Nordamerika, Europa
Nicht-MHC Gene			
• <i>IgA</i>	Defizienz	1	Europa
• <i>C4A</i>	Geringe Konzentration	1 und 2	Nordamerika, Europa
• <i>CTLA4</i>	Polymorphismus	1	Nordamerika, Europa
• <i>FAS</i>	Polymorphismus	1	Japan, Nordamerika
• Vitamin D Rezeptor	Polymorphismus	1 und 2	Deutschland
• <i>TNFα*2</i>	Polymorphismus	1	Nordamerika, UK

Tabelle 2: Spezifische Gene der Prädisposition bei AIH Typ-1 und Typ-2 und deren regionale Verteilung. Verändert nach (Beland et al. 2009).

3.3 Diagnostik (Symptome, Laborparameter, Histologie)

Im *International Autoimmune Hepatitis Group Report* wurden die Kriterien für die Diagnostik der AIH in einem Auto-Immun-Hepatitis-Score zusammengefasst (Alvarez et al. 1999; Hennes et al. 2008). Mit diesem Scoring System sollen Patienten klassifiziert werden. Zu den Parametern gehören neben dem Geschlecht, der Grad der Erhöhung der Serumtransaminasen ALT (Alaninaminotransferase) und AST (Aspartataminotransferase), die Konzentration der Gammaglobuline, der Titer der oben genannten Autoantikörper, die Leberhistologie sowie ätiologische Faktoren und der Ausschluss einer Virushepatitis. Müdigkeit, Gewichtsverlust, uncharakteristische Schmerzen im Abdomen sowie Anorexie sind häufige nicht-spezifische Symptome dieser Lebererkrankung. Eine Erhöhung der Gammaglobuline auf das 1,5 bis 3-fache der Norm sowie ein Anstieg der Transaminasen bis auf über 1000U/l und die Anwesenheit von leberspezifischen Autoantikörpern gelten als wichtige Laborparameter für eine gesicherte Diagnostik. Im histologischen Bild nach

Leberbiopsie ist die AIH charakterisiert durch portale und periportale Entzündungszellinfiltrate (so genannte Grenzzonenhepatitis bzw. *Interface Hepatitis*) und lobularer Hepatitis mit einem hohen Anteil an Plasmazellen und T-Lymphozyten sowie Rosettenbildung, konfluenten Nekrosen und Einzelzelluntergängen (Scheuer 1991; Longerich et al.). Die AIH ist assoziiert mit extrahepatischen autoimmunen Erkrankungen wie z.B. Hashimotos Thyreoiditis, rheumatoider Arthritis, Ulcerativer Colitis, Diabetes mellitus und anderen allergischen Erkrankungen (Gregorio et al. 1997; Benten et al.).

3.4 Ätiologie

Umweltfaktoren werden als Auslöser für die Entwicklung einer AIH in genetisch prädisponierten Individuen eines bestimmten Alters und Geschlechts angesehen. Hierzu gehören Medikamente, chemische Verbindungen und Viren. Die tatsächlichen Ursachen einer AIH sind bis heute unbekannt. Infektiöse Partikel wie z.B. Masern, Ebstein-Barr-Virus oder auch Hepatitis-Viren wurden oft mit der Entstehung einer AIH in Verbindung gebracht (Robertson et al. 1987; Rahaman et al. 1994; Cianciara et al. 1995; Strassburg et al. 1996; Vento et al. 1997; Vento et al. 1997). Beispielsweise können bei einem Teil der HCV infizierten Patienten Autoantikörper gegen CYP2D6 auftreten, wie sie auch bei der AIH Typ-2 vorhanden sind. Allerdings erkennen die HCV-assoziierten LKM Antikörpern andere Epitope als die der AIH-Patienten und eine Therapie mit Immunsuppressiva ist wirkungslos (Strassburg et al. 1996). Neben den Viren als Auslöser einer AIH sind auch Xenobiotika und Medikamente immer wieder im Gespräch. Zu den chemischen Verbindungen und Medikamenten, die mit der Entstehung einer AIH in Verbindung gebracht werden, gehören: Minozoclin, Black Cohosh (Traubensilberkerze) sowie Statine (Nietsch et al. 2000; Russo et al. 2009). Es scheint jedoch weder ein einziges infektiöses Pathogen oder eine einzige Noxe für die Entstehung der AIH zu geben. Vielmehr scheinen verschiedene Umweltfaktoren in genetisch prädisponierten Personen die Erkrankung auslösen zu können.

3.5 Immunpathogenese

Die Pathogenese der AIH ist ein komplexer Prozess. Dabei spielen $\alpha\beta$ -T-Zellen, sowie NK-Zellen, Makrophagen und B-Zellen aber auch $\gamma\delta$ -T-Zellen eine wichtige Rolle (Senaldi et al. 1992; Strassburg et al. 2000). Akute Leberschäden und autoimmune Lebererkrankungen sind dabei mit einer starken Th1-Antwort assoziiert (Nishimura et al. 1999). Die Th1-Zellen sekretieren IFN- γ und IL-2, wodurch zum einen die Expansion CD8⁺T-Zellen stimuliert wird und zum anderen Makrophagen und die Expression von MHC-I und -II auf Hepatozyten aktiviert werden. Parallel zu den Th1-Antworten kommt es zur Aktivierung von IL-4 produzierenden Th2-Zellen, welche die B-Zellreifung und anschließende Autoantikörperproduktion stimulieren (Longhi et al. 2007). Eine Verringerung der Anzahl und Funktion regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit AIH könnte den Toleranzverlust sowie die

Effektorantworten und Leberschäden verstärken (Longhi et al. 2004; Longhi et al. 2006). Allerdings wurden diese Befunde bislang nur von einer einzigen Gruppe an pädiatrischen Patienten erhoben und in Kollektiven von adultem AIH Typ-1 nicht bestätigt. Ferner wurden alle Befunde nur an PBMCs und meist nicht an intrahepatischen Lymphozyten erhoben.

Die Rolle von Th17 bei Erkrankungen in der Leber ist kaum verstanden (Lemmers et al. 2009; Oo et al. 2010). Auch der Einfluss von NKT und NK-Zellen auf die Immunpathogenese einer AIH ist noch ungeklärt. Weitere Forschung ist daher wichtig, um die Entstehung und Entwicklung der AIH besser zu verstehen (siehe Abbildung 4).

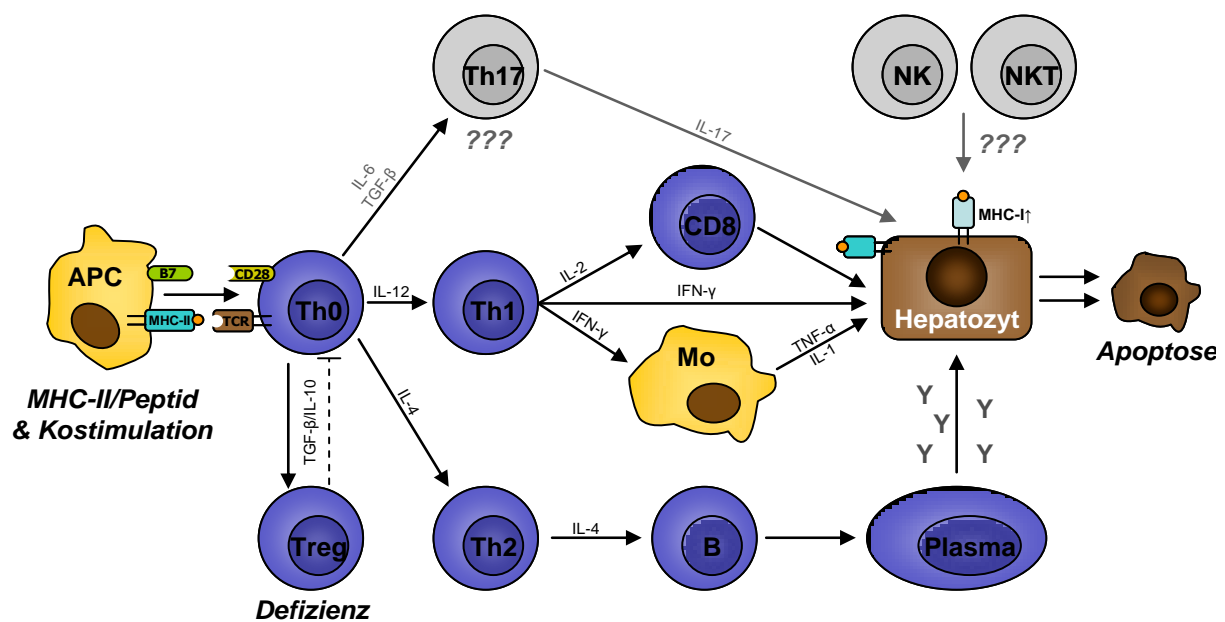


Abbildung 4: Darstellung der autoreaktiven Mechanismen in der Leber. APC, antigen-presenting cell; Mo, Makrophage; NK, Natürliche Killerzellen; NKT, Natürliche Killer-T-Zelle; Plasma, Plasmazelle. Verändert nach (Longhi et al. 2010).

3.6 Therapie und Transplantation

Unbehandelt haben die AIH-Patienten nur eine geringe Prognose mit einer 5- und 10-jährigen Überlebensrate von nur 50 und 10%. Immunsuppressive Therapie verbessert das Überleben deutlich (Read et al. 1963; Kirk et al. 1980). In 80-90% der erwachsenen Patienten erfolgt eine vollständige Remission unter der klassische Therapie und bei ~10% funktioniert diese nicht. Bei Kindern muss in 70% aller Fälle eine Langzeittherapie bis zum Erwachsenenalter durchgeführt werden, um ein Wiederkehren (Rezidiv) der Erkrankung zu vermeiden. 15% aller Kinder entwickeln ein chronisches Leberversagen und müssen vor dem 18. Lebensjahr transplantiert werden.

Die klassische Therapie bei AIH besteht aus einer Behandlung mit Prednisolon, allein oder in Kombination mit Azathioprin, wobei beide Strategien den gleichen Effekt haben (Manns und Strassburg 2001). Die Kombinationstherapie ist bei den meisten Patienten sinnvoll, da die Gabe von Azathioprin die benötigte Dosis von Prednisolon senkt. Damit werden die

zahlreichen Effekte eines Cushing Syndrom durch Steroide etwas verringert (z.B. Akne, Fettleibigkeit, Mondgesicht, Stiernacken, Diabetes mellitus und Bluthochdruck). Allerdings führt auch Azathioprin in 10% aller Patienten zu erheblichen Nebenwirkungen wie Blutbildveränderungen, Übelkeit, Erbrechen und abdominalen Beschwerden (Strassburg et al. 2009). Zunächst erfolgt eine Initialtherapie mit hoher Anfangsdosis und nach Erreichen der Remission eine geringer dosierte Erhaltungstherapie über mindestens 2-4 Jahre. Bei einem vollständigen Versagen der Therapie müssen alternative Behandlungsstrategien eingesetzt werden oder eine Lebertransplantation wird erforderlich.

Zu den Alternativen der klassischen Therapie zählen: Kortikoide der 2. Generation (Budesonid, Deflazacort), Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus) und Antimetaboliten (Mycophenolat Mofetil, Cyclophosphamid). Die bislang am besten untersuchte Alternative ist Budesonid. Dieses synthetische Steroid hat den Vorteil gegenüber der Therapie mit Prednisolon, dass es einen hohen First-Pass-Effekt hat, wodurch das Medikament eher lokal wirkt und zu weniger systemischen Nebenwirkungen führt (Thalen et al. 1979). Neuere Ergebnisse einer großen Multizentrenstudie zeigen, dass Budesonid in Kombination mit Azathioprin effektiver zur Remission führt als eine Prednisolon/Azathioprin-Kombinationstherapie (Manns et al. 2010). Steroid-refraktäre Patienten wurden in kleineren Studien mit den Calcineurin-Inhibitoren behandelt. Cyclosporin A zeigte gute Erfolge, hat aber auch viele toxische Effekte, die für eine langfristige Therapie ungünstig sind (z.B. Bluthochdruck, Niereninsuffizienz und Hyperlipidämie) (Alvarez et al. 1999; Debray et al. 1999). Zwei kleine Pilotstudien mit Tacrolimus wiesen diesem stärkeren Immunsuppressivum ebenfalls einen guten therapeutischen Effekt nach (Van Thiel et al. 1995; Aqel et al. 2004). Die beiden genannten Antimetabolite erwiesen sich in retrospektiven Studien als weniger geeignet (Hennes et al. 2008). Cyclophosphamid zeigte zusammen mit Prednisolon gute Erfolge bei AIH Patienten. Allerdings ist es durch seine starke hämatologischen Nebenwirkungen für Langzeittherapien eher ungeeignet (Kanzler et al. 1997).

Für Patienten, die weder auf das klassische Regime noch auf die Alternativen ansprechen und für Patienten im Endstadium der Erkrankung, ist die Lebertransplantation die einzige geeignete Maßnahme. In Europa macht die AIH nur noch 4% aller Lebertransplantationen aus (Strassburg et al. 2009). Die 5-Jahres- und 10-Jahres-Überlebensraten liegen bei 80-90% bzw. bei etwa 75%. Zwischen 10 und 35% aller Patienten erkranken innerhalb der ersten 5 Jahre nach der Transplantation erneut an einer AIH (Manns et al. 2000; Vogel et al. 2004).

4 Tiermodelle der autoimmunen Hepatitis

In den vergangenen Jahrzehnten wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, um die Pathogenese der AIH zu klären und neue Therapien zu entwickeln. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte jedoch keines dieser Modelle die Kriterien einer humanen AIH widerspiegeln, da es sich meistens um transiente Lebererkrankungen handelte.

4.1 Toleranzbruch in Inzuchtstämmen

Sehr frühe Modelle wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelt, um eine Lebererkrankung mit Leberinfiltraten, Nekrose und Fibrose zu erzielen, welche erst später als AIH beschrieben wurde. Für die ersten Modelle wurden jedoch keine Inzuchtstämme verwendet, weshalb man bei den Immunreaktion auf das häufig injizierte Leberhomogenat eher von einer Alloreaktion spricht als von einer immunologische Reaktion gegen Leberantigene (Fiessinger 1908; Casals et al. 1946; Behar et al. 1959; Jaeckel 2002). Zum Beispiel erzielten Scheiffarth et al. eine chronische Hepatitis in Kaninchen nach Immunisierung mit homologen Lebergesamtextrakt in komplettem Freundschens Adjuvanz (CFA, Wasser-in-Öl-Emulsion mit *M. tuberculosis*) (Scheiffarth et al. 1965). Die Leberveränderungen konnten hier auf die antigene Wirksamkeit der Zytoplasmafraktion zurückgeführt werden. Eine zweite frühe Arbeit entdeckte ein weiteres Autoantigen in der Membran von Hepatozyten und beschrieb dieses als leberspezifisches Protein (LSP) (Kosling et al. 1968; Meyer zum Buschenfelde et al. 1972). In diesem Kaninchenmodell wurden die zellulären Immunreaktionen in der Leber durch wiederholte Immunisierung mit xenogenen humanen Leberextrakten erreicht.

Scheiffahrt et al. erreichten als erste eine erfolgreiche experimentelle Hepatitis in einem Inzuchtstamm. Sie zeigten eine schwache bis starke periportale Infiltration der Leber und gleichzeitige Fibrose von Hepatozyten nach Immunisierung mit allogenen und nicht mit syngenem Leberhomogenaten in CFA (Scheiffarth et al. 1967). Durch eine mehrmalige Immunisierung mit syngemem Leberextrakt oder LSP in Klebsiella-haltigem Adjuvanz anstelle von CFA konnte eine weitere Arbeitsgruppe eine leberspezifische Erkrankung erreichen (Kuriki et al. 1983). In zwei weiteren Modellen wurde syngener S-100 Überstand eines Leberhomogenats (zentrifugiert bei 100.000g) bzw. das komplette Leberhomogenat in CFA mindestens sechsmal intramuskulär appliziert und periportale Infiltrate sowie Nekrose von Hepatozyten beobachtet (Mori et al. 1984; Mori et al. 1985; Mori et al. 1985; Araki et al. 1987). Lohse et al. zeigten in ihrem Modell der Experimentellen Autoimmunen Hepatitis (EAH), dass schon eine einmalige intraperitoneale Injektion der S-100 Fraktion eines syngenem Leberhomogenats in CFA zu einer Hepatitis mit Transaminase-Erhöhung, Leberinfiltraten und verzögerter Autoantikörper-Produktion führen kann (Lohse et al. 1990; Lohse et al. 1992). Darüber hinaus konnte erstmalig eine spezifische T-Zellantwort gegen

Leberantigene in einer Subfraktion der S-100 Extrakte *in vitro* demonstriert werden. Ein bemerkenswertes Ergebnis der Arbeiten von Lohse et al. war auch die Identifikation einer aktiven Gegenregulation der leberspezifischen Antworten durch Milzzellen zu Beginn der EAH (Lohse et al. 1993), welche für T-Zell-Vakzinierungen genutzt werden konnte (Lohse et al. 1998). Ein murines Modell der AIH Typ-2 wurde von Alvarez et al. mittels DNA-Immunisierung mit humanem Antigen entwickelt. Wiederholtes intramuskuläres Injizieren von Plasmiden, welche die potentiellen antigenen Regionen der Typ-2 Autoantigene CYP2D6 und FTCD bzw. das Th1-Zytokin IL-12 exprimierten, resultierte in einer Hepatitis mit Erhöhung der Transaminasen und milder Infiltration der Leber (Lapierre et al. 2004).

In einem neueren Modell entwickelten Mäuse, welche mit Adenoviren infiziert wurden, die das humane CYP2D6 exprimierten, eine persistierende autoimmune Lebererkrankung (Holdener et al. 2008).

4.2 Zytokin-Modelle

Aus Analysen der Biopsien von AIH-Patienten und Mausmodellen ist bekannt, dass die Zytokine IFN- γ und TNF- α eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Leberschäden spielen. In den folgenden Mausmodellen wurden Zytokin-vermittelte Leberschäden induziert. Tiegs et al. zeigten, dass ConA einen akuten Leberschaden verursachen kann, indem es die Freisetzung der Zytokine TNF- α und IFN- γ und eine unspezifische T-Zell-Aktivierung stimuliert (Tiegs et al. 1992; Gantner et al. 1995; Kusters et al. 1996). Weiterhin konnten polyklonale Stimulatoren von T-Zellen, wie anti-CD3 Antikörper oder das Superantigen *S.aureus* Enterotoxin B, in D-Galaktosamin (Transkriptions-Inhibitor)-sensibilisierten Tieren zu einer starken Apoptose von Hepatozyten führen, indem sie die Freisetzung von TNF- α stimulierten (Gantner et al. 1995; Leist et al. 1995).

4.3 Genetische Hepatitis-Modelle

Bisher existieren keine spontanen Modelle einer AIH, die auf einen Gendefekt beruhen und Untersuchungen zur Genetik der AIH ermöglichen. Im Gegensatz dazu existiert für Diabetes mellitus Typ-1 ein Mausstamm, die *non-obese diabetic* Maus, kurz NOD, der eine spontane Erkrankung mit natürlichem Verlauf zeigt und damit Informationen über eine genetische Prädisposition liefert (Vyse et al. 1996). Es gibt jedoch zwei Knockout-Modelle, die in Verbindung mit einer leberspezifischen Entzündung stehen. Im ersten dieser Modelle entwickeln Tiere mit einem Gen-Knockout des anti-inflammatorischen Zytokins TGF- β auf dem BALB/c Hintergrund eine schwere Hepatitis. Diese Tiere sterben jedoch spätestens 2 Wochen nach der Geburt und sind somit kein gutes Modell für eine spontane chronische Hepatitis (Gorham et al. 2001). In Anlehnung an einen schweren humanen Gendefekt, bei dem 10-15% der Patienten eine AIH entwickeln, wurde das gleiche Gen auch im Mausmodell manipuliert. Die Mutation des sogenannte *autoimmune regulator gene* (*aire*), führt auch in

der Maus zur Infiltration der Leber und leberspezifischen Autoantikörpern (Obermayer-Straub et al. 2001; Ramsey et al. 2002; Jiang et al. 2005).

4.4 Transgene Tiermodelle

In transgenen Modellen wurde ein gentechnisch hergestelltes neues Selbstantigen in der Leber exprimiert. Die ektopische Expression des Antigens im Thymus, welche zur Induktion zentraler Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen führt, kann in den bisherigen Ansätzen jedoch nicht ausgeschlossen werden (Klein et al. 2000). Jones-Youngblood et al. exprimierten ein Fusionsprotein aus dem MHC-I-homologen Molekül Q10 und H-2L^d (Q10/L) auf der Oberfläche von Hepatozyten (Jones-Youngblood et al. 1990; Wieties et al. 1990). Periportale Infiltrate konnten nur durch den Transfer aktivierter Milzzellen aus nicht-transgenen Tieren in die Q10/L-Mäuse erreicht werden. Es wurde keine spontane Hepatitis und nur eine geringe zytotoxische Aktivität von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten aus transgenen Tieren beobachtet, weil möglicherweise die Hepatozyten, welche des Neoantigen exprimieren, eine Toleranz antigenspezifischer T-Zellen hervorrufen. Eine weitere Erklärung dafür ist die bereits erwähnte negative Selektion von Q10/L-spezifischen T-Zellen im Thymus. Morahan et al. exprimierten das allogene H-2K^b Antigen unter dem Metallothionein-Promotor (Morahan et al. 1989). Nur der passive Transfer naiver Milzzellen einer nicht-transgenen Maus führte zu einer aggressiven Hepatitis. Diese Reaktion kann mit der potenten alloantigenen Funktion des Neoantigen erklärt werden. Neben der negativen Selektion im Thymus wurden in diesem Modell auch weitere periphere Toleranzmechanismen vermutet. Sehr wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Toleranzmechanismen in der Leber lieferten Ferber et al. (Ferber et al. 1994). Sie exprimierten das Alloantigen H-2K^b unter dem induzierbaren Promotor des C-reaktiven Protein (CRP). In diesem Modell wurde periphere T-Zelltoleranz mit geringen Dosen der Alloantigen induziert und nach der Durchführung weiterer Versuche mit der Herunterregulation des T-Zell-Rezeptors, Deletion antigenspezifischer Zellen und Anergie beschrieben. Der Einfluss zentraler Toleranzmechanismen wurde in Folgeexperimenten ausgeschlossen (Ferber et al. 1994). Die peripheren Toleranzmechanismen in diesem Modell konnten durch Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen mit Zellen, die H-2K^b und IL-2 simultan exprimierten, gebrochen werden (Limmer et al. 1998). Auf diese Weise konnte eine Abstoßung allogener Transplantate erreicht werden, während die Toleranz gegenüber leberspezifischen Antigenen erhalten blieb. In einem weiteren Versuch wurde jedoch durch wiederholte Gabe des immunstimulatorischen CpG-reichen Oligodeoxynukleotids (CpG-ODN) eine Autoreaktion gegen H-2K^b-exprimierende Hepatozyten erreicht (Sacher et al. 2002). Weiterhin entwickelten Voehringer et al. ein Modell, bei dem die Lebererkrankung durch eine Virusinfektion induziert wurde (Voehringer et al. 2000). Die leberspezifische Expression des

Glykoproteins GP33 des lymphotropen Choriomeningitisvirus (LCMV) wurde von dem murinen Albumin-Promotor kontrolliert. Adoptiv transferierte antigenspezifische CD8+T-Zellen ignorierten das Neoantigen auf den Hepatozyten solange bis dieser Toleranzmechanismus mit einer LCMV Infektion gebrochen wurde. Eine spontane chronische Hepatitis mit Leberinfiltraten, Nekrose und Transaminase-Erhöhung wurde kürzlich von Zierden et al. in Alb-HA/CL4-TCR doppelt transgenen Mäusen beschrieben (Zierden et al. 2010). In diesen Tieren wird das virale Hämagglutinin unter die Kontrolle des Albumin-Promotors gestellt und sie besitzen HA-spezifische TCR-transgene CD8+T-Zellen. Die Leberinfiltrate enthalten eine große Menge an anergen CD8+T-Zellen und CD4+CD25+Foxp3+ regulatorische T-Zellen. Durch diese peripheren Toleranzmechanismen wird in dem Modell vermutlich eine sehr starke Zerstörung der Hepatozyten verhindert.

Obwohl in den beschriebenen Mausmodellen oftmals keine chronischen Leberantworten induziert wurden, haben alle diese Modelle zusammengenommen erheblich zum Verständnis der Leberimmunologie beigetragen.

5 Hypothese und Ziele der Arbeit

Die Leber ist ein einzigartiges Organ mit einer Reihe wichtiger Funktionen. Die Entstehung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz in der Leber hat dabei eine sehr große Bedeutung. Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute nur wenig geklärt. Zudem ist wenig dazu bekannt, wie und warum es im Fall der autoimmunen Hepatitis zum Verlust der Lebertoleranz kommt. Zur besseren Untersuchung der Pathomechanismen der autoimmunen Hepatitis sollte in der vorliegenden Arbeit ein chronisches Mausmodell entwickelt werden. Bisherige Arbeiten scheiterten in dem Versuch eine chronische Hepatitis mit den Charakteristika der humanen Erkrankung im Tiermodell zu etablieren.

Als Hypothese bei der Entwicklung des neuen Modells wurde angenommen, dass eine limitierte Virusinfektion der Leber mit Adenoviren, als Gefahrensignal, in Kombination mit einem heterologen Autoantigen der AIH einen Toleranzverlust induzieren kann. Es sollte ferner die Hypothese getestet werden, dass die genetische Prädisposition eine Rolle in der leberspezifischen Autoimmunität spielt. Hierfür sollten Adenoviren, die sowohl für humane Antigene der AIH Typ-1 als auch Typ-2 kodieren, in verschiedenen Mausstämmen getestet werden. Neben der Annahme, dass für eine primäre Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen ein Gefahrensignal, Molekulare Mimikry und der genetische Hintergrund entscheidend sind, sollte experimentell nachgewiesen werden, ob Tregs auf die Initiation einer Autoimmunantwort Einfluss nehmen. Die Analyse der Chronifizierung der induzierten autoimmunen Erkrankung sollte auf humoraler sowie zellulärer Ebene erfolgen. Dafür sollten neben humoralen Markern wie Transaminasen, Autoantikörpern und Gammaglobulinen auch die Leberhistologie und die Zusammensetzung der intrahepatischen Leukozyten untersucht werden. Letztere könnte Aufschluss über die beteiligten Effektormechanismen bei der Entwicklung einer AIH geben.

In der Erforschung und Entwicklung sind neue Therapien der AIH, die weniger Nebenwirkungen haben sollten und bei Therapie-resistenten Patienten zum Einsatz kommen könnten. Um die Frage zu klären, ob das neue Mausmodell für die Entwicklung neuer Therapien geeignet ist, sollte zunächst in Anlehnung an die Behandlung der humanen AIH eine klassische Therapie mit Steroiden erfolgen. In Zukunft könnte das Mausmodell zum Testen und für die Entwicklung neuer Therapieansätze von Bedeutung sein.

B. MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Geräte

A-EL-VIS ELISpot-Reader	EPSON, Neuss
Analysewaagen	Sartorius, Göttingen
Bio Imaging System (CCD Kamera)	VWR, Darmstadt
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator	Sanyo-Biomedical, Bad Nenndorf
Cryo Freezing Container	Nalgene, USA
Kryotom CM3050S	Leica, Solms
Deckgläser 24x50mm	Thermo Scientific, Braunschweig
FACS Sorter LSRII	BD Biosciences, Heidelberg
Gelkammer für Agarose- Gelelektrophorese	Biorad, München
Gelkammern für Polyacrylamid- Gelelektrophorese	Biorad, München
Genpulser	Biorad, München
Gradienten-PCR Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Handstückzähler	Roth, Karlsruhe
Heizblock	Stuart Scientific
Infrarot-Leuchte	Roth, Karlsruhe
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
MACS-Multistand octo/quadro	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mäusezwangbox	MHH Werkstatt, Hannover
Megafuge	Thermo Scientific, Braunschweig
Menzelgläser-Objektträger	Thermo Scientific, Braunschweig
Menzelgläser-Objektträger Superfrost®Plus	Thermo Scientific, Braunschweig
Mikroskop Axio Imager M1	Zeiss, Jena
Mikrotom RM 2255	Leica, Solms
Multifuge 3 S-R	Heraeus Centrifuges, UK
Multipipette	Corning, Amsterdam, NL
Netzteil für Agarose- Gelelektrophorese	Biorad, München
Netzteil für Polyacrylamid-	Biometra, Jena

Gelelektrophorese	
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim
Rasierer	POCKET PRO® WAHL®
Scantainer für Mausekäfige	Scanbur, Karlslunde, DK
Schüttelinkubator für Bakterienkultur	INFORS, Bottmingen, CH
Sterilbank Herasafe KS	Thermo Scientific, Braunschweig
System zur Kapillarelektrophorese	Sebia, Évry, Frankreich
System zur	Olympus, Hamburg
Transaminasebestimmung	
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Vortexer	MS2 Minishaker IKA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage (Milli-Q-Plus)	Millipore, Billerica, USA

1.2 Hilfsmittel

12well Zellkulturplatte	Thermo Scientific, Braunschweig
24well Zellkulturplatte	Thermo Scientific, Braunschweig
48well Zellkulturplatte	Greiner Bio-one, Frickenhausen
6well Zellkulturplatte	Sarstedt, Sarstedt
96well Zellkulturplatte flach	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96well Zellkulturplatte rund	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96well Zellkulturplatte V-Form	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmal-Injektionsnadel 1ml U100	BD Biosciences, Heidelberg
Einmalspritzen 25, 10, 5, 1ml	Braun, Melsungen
Eppendorfgefäße (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon 15ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Falcon 50ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Filter 0,2µm/0,45µm	Filtropur S, Sarstedt
Filterpapier Whatman	GE Healthcare, München
LS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten (Multi-screen HTS™ IP sterile Plate)	Millipore, Billerica, USA
MS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
PAP Pen	G. Kisker, Steinfurt
Pipettenspitzen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PP-Röhrchen, 14ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Sarstedt
T175cm ² Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt
T25cm ² Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt
T75cm ² Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Sarstedt
Zellschaber 25cm, 17mm	Sarstedt, Sarstedt
Zellsieb 40µm/70µm	BD Biosciences, Heidelberg

1.3 Reagenzien und Chemikalien

1.3.1 Verbrauchsmaterialien

1% EVANS Blue	The Binding Site GmbH, Schwetzingen
40% Acrylamid	Biorad, München
Aceton	J.T. Bakereventer, Deventer, NL
AEC Staining Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-CD28	Eigene Herstellung Hybridom 37.51
Anti-CD3	Eigene Herstellung Hybridom 145-2C11
APS	Biorad, München
Bacillo [®] AF	BODE Chemie GmbH, Hamburg
BD GolgiPlug [™]	BD Biosciences, Heidelberg
Bradford Reagenz	Biorad, München
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (<i>Albumin from bovine serum</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
cDNA Synthese Kit	Roche, Mannheim
CFSE	Molecular Probes
Chloroquin-Diphosphat-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ConA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie [®] G-250 stain	Invitrogen, Darmstadt
CpG	Cooley Pharmaceuticals
Cytofix/Cytoperm [™] solution	BD Biosciences, Heidelberg
D+-Glukose Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

D+-Saccharose	Merck, Darmstadt
DAB/Metal Konzentrat	Pierce-Bioscience
DAPI	Invitrogen, Darmstadt
Dexpanthenol	Bayer Health Care, Leverkusen
Dialyse Kassetten	Pierce-Bioscience
Diphtherietoxin, aus <i>C. diphtheriae</i>	Merck, Darmstadt
DMEM (4.5 g/l D-Glukose)	Invitrogen, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP mix	Promega, Mannheim
DPBS 1x CaCl ₂ -MgCl ₂	Invitrogen, Darmstadt
ECL Reagenz	GE Healthcare, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol Absolut	J.T. Bakereventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	Biochrom AG, Berlin
Ficoll/Percoll	Invitrogen, Darmstadt
Fix/Perm	eBioscience, San Diego, USA
Fix-Perm Solution Diluent	eBioscience, San Diego, USA
Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden, D / Macherey-Nagel, Düren
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas
GlutaMAX™ 1 100x	Invitrogen, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GM-CSF	Eigene Herstellung
Hämalaun Lösung, Meyers	Merck, Darmstadt
HCl	J.T. Bakereventer, NL
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES 1M	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
IL-2	Eigene Herstellung
IL-4	Eigene Herstellung
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ionomycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ketamin	Albrecht GmbH, Aulendorf
LB-Agar	Kapseln, MP Biomedicals, LLC

LB-Medium	Kapseln, MP Biomedicals, LLC
L-Glutathion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maxi-Plasmid-Isolation/ Endofree	Qiagen, Hilden
MEM NEAA 100x	Invitrogen, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mini-Plasmid-Isolation	Qiagen, Hilden
Mowiol	Merck, Darmstadt
NaCl	Fresenius Kabi, Bad Homburg
NaCl Plastipur®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-Pyruvat 100mM	Invitrogen, Darmstadt
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Nonidet P40	AppliChem GmbH, Darmstadt
NucleoBond Maxi EF	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond Mini	Macherey-Nagel, Düren
Oligo-dT Primer	Roche, Mannheim
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Fischar, Saarbrücken
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml 10.000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Perm/Wash Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene, Amsterdam, NL
PfuTurbo Polymerase Puffer (10x)	Stratagene, Amsterdam, NL
Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel
PMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad, München
Prednisolon	Sigma-Aldrich, Serono GmbH, Darmstadt
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Protein Assay	Biorad, München
Proteinase K	VWR, Darmstadt
Proteinase-Inhibitor-Mix	Roche, Mannheim
Random-Hexamere	Roche, Mannheim
Rattenserum	Invitrogen, Darmstadt
Red Taq Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rompun 2%	Bayer Health Care, Leverkusen
RPMI 1640	Invitrogen, Darmstadt
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Promega
Slide-A-Lyser® Syringe	Pierce-Bioscience #66490
Stable peroxydase buffer	Pierce-Bioscience
Streptavidin-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Taq Polymerase Puffer (10x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Biorad, München
Tissue-Tek®	O.C.T. Compound, Sakura
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
TRI-Reagent®	Invitrogen, Darmstadt
TrisBase	Calbiochem, LaJolla, USA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA Solution 10x	Biochrom AG, Berlin
Turbo DNase	Applied Biosystems, Austin, USA
Tween20	BioChemica, AppliChem
UltraPure H ₂ O	Biochrom AG, Berlin
Xylol	J.T. Bakereventer, NL
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol 50mM	Invitrogen, Darmstadt

1.3.2 Restriktionsenzyme

BamHI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EcoRV	New England Biolabs, Frankfurt am Main
HindIII	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NotI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PacI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PmeI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Sall	New England Biolabs, Frankfurt am Main

1.3.3 Plasmide

pJet1: Dieses E.coli-Plasmid wird als positiver Selektionsvektor zur direkten Klonierung von PCR-Produkten eingesetzt. Zuvor wird der Vektor selbst mit EcoRV verdaut und die glatt endenden PCR-Produkte mit Hilfe einer Polymerase mit Korrekturlese-Eigenschaften (hier Pfu-Polymerase) hergestellt.

pJet1-hFTCD/CYP2D6/SLA: Die kodierenden Sequenzen der humanen Gene wurden mit den entsprechenden Oligonukleotiden (hFTCD Fw/Rv, CYP2D6 Fw/Rv und SLA Fw/Rv) amplifiziert und in pJet1 kloniert.

pJet1-mFTCD/mFTCD His: Die kodierenden Sequenzen des murinen FTCD wurden mit den entsprechenden Oligonukleotiden (mFTCD-Sall Fw/mFTCD-BamHI Rv und mFTCD-His Fw/Rv) amplifiziert und in pJet1 kloniert. Eine Markierung bestehend aus 6 Histidinen wurde mittels spezifischer Primer an den C-Terminus der FTCD-Sequenz angefügt.

pShuttle-CMV: Dieses Plasmid enthält eine *multiple cloning site* (MCS), die sich zwischen dem CMV-Promotor und dem SV40 Polyadenylierungssignal befindet und für die Insertion von cDNA bis zu einer Länge von 6,6kb geeignet ist. Der pShuttle-CMV Vektor besitzt zwei Regionen für die homologe Rekombination in pAdEasy-1.

pShuttle-CMV-hFTCD/CYP2D6/SLA: Die kodierende humane Sequenz der aufgeführten Gene wurde nach Verdau der pJet-Vektoren und pShuttle-CMV mittels Ligation in den Vektor kloniert.

pAdEasy-1: Dieses Plasmid enthält das Genom des humanen Spezies C Adenovirus Serotyp (Ad)5, der durch die Deletion der Gene E1 und E3 nicht replizieren kann. Das Gen E1, das für den Zusammenbau der infektiösen Viruspartikel notwendig ist, wird in vivo durch die Verpackungszelllinie 293 komplettiert. Das Gen E3 ist für die Virusherstellung entbehrlich, da es für Proteine kodiert, die beim Umgehen der Immunantwort des Wirtes wichtig sind. Durch die Entfernung der beiden viralen Gene kann die Insertion von DNA bis zu einer Länge von 7,5kb erfolgen.

pAdEasy-FTCD: Die Herstellung erfolgte durch homologe Rekombination zwischen pShuttle-CMV-hFTCD und pAdEasy-1. Das rekombinante Plasmid hat eine Größe von 42,5kb.

pAdEasy-CYP2D6: Die Herstellung erfolgte durch homologe Rekombination zwischen pShuttle-CMV-CYP2D6 und pAdEasy-1. Das rekombinante Plasmid hat eine Größe von 42,5kb.

pAdEasy-SLA: Die Herstellung erfolgte durch homologe Rekombination zwischen pShuttle-CMV-SLA und pAdEasy-1. Das rekombinante Plasmid hat eine Größe von 42,5kb.

pIRES2-EGFP: Dieser Vektor enthält eine *internal ribosomal entry site* (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus (ECMV) zwischen der MCS und der kodierenden Region des *enhanced green fluorescent protein* (eGFP). Dies erlaubt sowohl die Translation eines in die MCS klonierten Gens als auch des Gens für das grün-floureszierenden Protein. Der Vektor kann somit zur effizienten Selektion transient transfizierter Säugerzellen eingesetzt werden, welche sowohl eGFP als auch das gewünschte Protein exprimieren.

pIRES2-EGFP-mFTCD: Die kodierende murine Sequenz von FTCD wurde nach Verdau des pJet-Vektors und pIRES2-EGFP mittels Ligation in den Vektor kloniert.

pIRES2-EGFP-cMyc-mFTCD: cMyc wurde mittels PCR-Mutagenese an den N-Terminus von mFTCD in pIRES2-EGFP angefügt.

pET3a: Hierbei handelt es sich um ein Vektorsystem das zur Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen in *E.coli* eingesetzt wird. Das Plasmid trägt eine N-terminale T7-Tag® Sequenz und einen BamHI Klonierungsbereich. In pET klonierte Gene stehen unter der Kontrolle eines starken Bakteriophagen T7-Transkriptionssignals und werden mittels einer induzierbaren T7-RNA Polymerase in der Wirtszelle selektiv exprimiert.

pET3a-mFTCD-His: Die kodierende murine Sequenz von FTCD wurde nach Verdau des pJet-Vektors pJet-mFTCD His und pET3a mittels Ligation in den Vektor kloniert.

1.3.4 Oligonukleotide

Für die Sequenzierung von pShuttle-CMV:

Ad-CMV-Fw (5'-GGTCTATATAAGCAGAGCTG-3')

Ad-CMV-Rv (5'-GTGGTATGGCTGATTATGATCAG-3')

Für die Sequenzierung von pIRES2-EGFP:

IRES Rv (5'-AGGAACTGCTTCCTTCACGA-3')

pIRES Fw (5'-TACATCAATGGGCGTGGATA-3')

Für die Sequenzierung von hFTCD:

hFTCD Fw2 (5'-GCCAGGACGTCTGAAGAAAAG-3')

hFTCD Rv2 (5'-CTCGATGATCCGCTCCTTAG-3')

FTCD SQ1 (5'-CTGTACGGCGAGGCAG-3')

FTCD SQ2 (5'-CACTGCACACGGTCTAC-3')

Für die Sequenzierung von mFTCD:

mFTCD SQ1 (5'-TCCAGGGCATCGGTTG-3')

mFTCD SQ2 (5'-TGCCCCAGGAGGAGGT-3')

Für die Sequenzierung von SLA:

SLA SQ1 (5'-GCTGGCTGGTGTCCAT-3')

SLA SQ2 (5'-TGGAGTGCAGTCTTC-3')

Für die Sequenzierung von CYP2D6:

2D6 SQ1 (5'-TGTTCCCTGGCGCGCTA-3')

2D6 SQ2 (5'-TGAGCACAGGATGAC-3')

Für die Herstellung von Adenoviren:

hFTCD Fw (5'-ACGTCTCGAGCCACCATGTCCCAGCTGGTGGAAATG-3')

hFTCD Rv (5'-ACGTAAGCTTTCACTCCTGCCGGGTCTCCAAG-3')

2D6 Fw (5'-ACGTCTCGAGCCACCATGGGGCTAGAAGCACTGGT-3')

2D6 Rv (5'-ACGTAAGCTTCTAGCGGGGCACAGCACAAAG-3')

SLA Fw (5'-ACGTGCGGCCGCCACCATGAACCGCGAGAGCTTCGC-3')

SLA Rv (5'-ACGTAAGCTTTCATGAAGAAGCATCCTG-3')

Für die Herstellung von pIRES-EGFP-mFTCD:

mFTCD-Sall Fw (5'-ACTGGTCGACATGTCTCAGTTGGTGGAAATG-3')

mFTCD-BamHI Rv (5'-ACGTGGATCCTCACTCCTTTTCGGGCTTC-3')

Für die Herstellung von pIRES-EGFP-cMyc-mFTCD via PCR Mutagenese:

cMyc-mFTCD Fw (5'-TCTGAAGAAGATCTGATGTCTCAGTTGGTGGAAATG-3')

cMyc-mFTCD Rv (5'-GATGAGTTTCTGCTCCATGTTCGAGATCTGAGTCCGGTAG-3')

Für die Herstellung von rekombinantem FTCD:

mFTCD-His Fw (5'-ATGCGGATCCATGTCTCAGTTGGTGGAAATG-3')

mFTCD-His Rv (5'-ACGTGGATCCTCAGTGATGGTGGATGATGATGTGCGGCCGC-
CTCCTTTTCGGGCTTC-3')**1.3.5 Primäre Antikörper**

Antikörper (-konjugat)	Klon	Hersteller
Anti-Adenovirus		Fitzgerald, Aceton, USA
B220-Cy3	RA3-6B2	Hybridom

B220-PE-Cy5	RA3-6B2	BD Biosciences, Heidelberg
CD25-PE	PC61	BD Biosciences, Heidelberg
CD3-FITC	145-2C11	Hybridom
CD4-Alexa Fluor® 488	RM 4-5	Invitrogen, Darmstadt
CD4-Biotin		Hybridom
CD4-V450	RM 4-5	BD Biosciences, Heidelberg
CD8-Biotin	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg
CD8-Cy3	RMCD8-2	Hybridom
CD8-PerCP-Cy5.5	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg
Foxp3 Alexa Fluor® 647	MF14	Biolegend, San Diego, USA
IFN- γ Biotin	R4-6A2	eBioscience, San Diego, USA
IFN- γ , unkonjugiert	AN-16	eBioscience, San Diego, USA
IgM-Cy5		Hybridom
NKG2D-PE	CX5	eBioscience, San Diego, USA
NKp46 Alexa Fluor® 647/eF 660	29A1.4	eBioscience, San Diego, USA
TCR β -APC-AF750	H57-597	eBioscience, San Diego, USA
TCR γ -PE	GL3	BD Biosciences, Heidelberg

1.3.6 Sekundäre Antikörper

Antikörper

Anti-Ziege IgG HRP	
Anti-Maus IgG	
Anti-Maus IgG Biotin	
Anti-Maus IgG HRP	
Anti-Maus IgG-DyLight-488	
Horseradish Peroxidase Avidin D	

Hersteller

Fitzgerald, Acton, USA
Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK
Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK
Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK
Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK
eBioscience, San Diego, USA

1.3.7 Bakterien und Zelllinien

E.coli XL10-Gold	Ultrakompetente Zellen (Stratagene, Amsterdam, NL) Genotyp: TetR Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'pro AB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R] ^a
E.coli BJ 5183-AD-1s	Elektroporation-kompetente Zellen (Stratagene, Amsterdam, NL) Genotyp: endA1 sbc recBC galk met thi-1 bioT hsdR (Str ^r)[pAdEasy-1 (Amp ^R)]

293	HEK293 (<i>human embryonic kidney</i>) Zelllinie (ATCC, Wesel), humanes Nierenzellkarzinom, Produktion von adenoviralem E1-Gen in trans, Kultivierung in DMEM mit 4,5g/l Glukose, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin
293T	spezielle Variante der 293 Zellen, die das „SV40 large T-Antigen“ exprimieren, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem " <i>SV40 origin of replication</i> " ermöglicht
HepG2	Humane epitheliale Zelllinie isoliert aus Lebergewebe eines hepatozellulären Karzinoms, Kultivierung in DMEM mit 4,5g/l Glukose, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin

1.3.8 Mausstämme

Name	Herkunft
BALB/c	Charles River oder Tierlabor-Zucht MHH
C57BL/6	Charles River oder Tierlabor-Zucht MHH
DEREG	Dr. Tim Sparwasser
FVB/N	Charles River
NOD/LtJ	Eigene Zucht
NOD SCID	Eigene Zucht oder Tierlabor-Zucht MHH

1.4 Puffer

1.4.1 Molekularbiologische Arbeiten

1x TAE	40mM Tris-Acetat, pH 8,3 1mM EDTA, pH 8,0
50x TAE	2M Tris 128mM EDTA pH 8.0
Agarosegel	0,8-1,5% Agarose in 1x TAE in der Mikrowelle erhitzen auf ca. 50°C abkühlen Zusatz von 5µl Ethidiumbromid/100ml
Schwanzpuffer	50mM Tris, pH8.0 100mM EDTA

	100mM NaCl
	1% SDS
	0,5mg/ml Proteinase K
Adenovirus Präparation	
Obere Gradientenlösung 1.2	13,25g CsCl 0,5ml Tris HCl pH 7,5 Ad 50ml A.bidest Filtersterilisation Lagerung bei 4°C
2x Aufbewahrungs-Puffer	100µl 1M Tris pH 8,0 200µl 5M NaCl 10µl 1M MgCl ₂ 5ml Glycerol 4,69ml A.bidest
Dialysepuffer	100µl frisch angesetztes 10% BSA Filtersterilisation 20ml Tris pH 8,0 2ml 1M MgCl ₂ 56ml 5M NaCl Ad 2l A.bidest
OD Leerwert-Puffer	500µl 2x Aufbewahrungs-Puffer 250µl 1,2g/ml CsCl 250µl 1,4g/ml CsCl
Untere Gradientenlösung 1.4	26,75g CsCl 0,5ml Tris HCl pH 7,5 Ad 50ml A.bidest Filtersterilisation Lagerung bei 4°C
1.4.2 Proteinbiochemische und histologische Arbeiten	
10x Laufpuffer für SDS-PAGE	1,92mM Glycin 144g 250mM Tris 30,3g 0,1% SDS 10g Ad 1l A.bidest pH 8,3
10x Transferpuffer	250mM Tris 1,92M Glycin
1x Laufpuffer	100ml 10x Laufpuffer

	Ad 1l A.bidest	
1x Transferpuffer	100ml 10x Transferpuffer	
	200ml Methanol	
	2ml 10% SDS	
	Ad 1l A.bidest	
20x TBS	0,4M Tris	
	3M NaCl	
	pH 7,5	
4x Proteinprobenpuffer	3,55ml A.bidest	
	1,25ml Sammelgelpuffer pH 6,8	
	2,5ml Glycerol	
	2,0ml 10% SDS	
	0,2ml 0,2% Bromphenolblau	
Blockierungs-Puffer	5% Milchpulver in TBS-T	
Antikörper-Verdünnungspuffer	1% BSA	
	0,1% <i>cold fish skin gelatin</i>	
	0,5% Triton X-100	
	0,05% Natriumazid	
	0,01M PBS, pH 7,2-7,4	
PBS mit Proteaseinhibitoren	10ml 1x PBS	
	1 Tablette Proteinase-Inhibitor-Mix	
Protein-Lysispuffer	0,5% Triton X-100	
	40mM Tris pH 7,4	
	120mM NaCl	
	0,3% SDS	
Sammelgel	A.bidest	3,7ml
	Sammelgelpuffer	1ml
	Acrylamid (40%)	2,5ml
	SDS (10%)	100µl
	APS (10%)	100µl
	TEMED	10µl
Sammelgelpuffer	0,5M Tris-HCl	
	pH 6,8	
Stripping-Puffer	7,6g Tris	
	20g SDS	
	7ml β-Mercaptoethanol	
	Ad 1l A.bidest	

	pH 6,8	
TBS-T für Immunfluoreszenz	1x TBS	
	0,05% Tween-20	
TBS-T für Western Blots	1x TBS	
	0,1% Tween-20	
Trenngel (10% Acrylamid)	A.bidest	9,6ml
	Trenngelpuffer	5ml
	Acrylamid (40%)	5ml
	SDS (10%)	200µl
	APS (10%)	200µl
	TEMED	20µl
Trenngelpuffer	1,5M Tris-HCl	
	pH 8,8	

Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

Dialysepuffer	5mM Tris-HCl
	pH7.5
Elutionspuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ (6.90g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)
	300mM NaCl (17.54g NaCl)
	250mM Imidazol (17g Imidazol)
	Ad 1l A.bidest
	pH 8.0
Lysepuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ (6.90g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)
	300mM NaCl (17.54g NaCl)
	10mM Imidazol (0.68g Imidazol)
	pH 8.0
Waschpuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ (6.90g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)
	300mM NaCl (17.54g NaCl)
	20mM Imidazol (1.36g Imidazol)
	pH 8.0

1.4.3 Zellbiologische Arbeiten

2xHBS-Buffer	280mM NaCl
	10mM KCl
	1,5mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	12mM Dextrose (D+-Glukose)
	50mM HEPES

40% Percoll Lösung	12ml Percoll 1,2ml 10x PBS 16,8ml DMEM (5% FCS)
70% Percoll Lösung	21ml Percoll 2,1ml 10x PBS 6,9ml DMEM (5% FCS)
CaCl ₂	2,5M
DMEM	DMEM (4,5g/l D-Glukose) 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	50% DMEM 40% FCS 10% DMSO
Erythrozyten-Lysepuffer	10mM KHCO ₂ 0,15mM NH ₄ Cl 0,1mM Na ₂ EDTA Ad 1l A.bidest, Filtersterilisation pH 7,3 Lagerung bei RT
FACS Zellpuffer	2% FCS in 1x PBS
RPMI-Vollmedium	RPMI 1640 (+Glutamax™-1) 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1x NEAA 1x Natrium-Pyruvat 20mM HEPES 50µM β-Mercaptoethanol
Transfektionsmedium	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 20mM HEPES

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro* Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Segmenten (Saiki et al. 1988). Wenn nicht anders angegeben, wurden die PCR-Reaktionen in einem autoklavierten 0,2ml Eppendorf-Safelock-Gefäß angesetzt, wobei zur Vermeidung von Kontaminationen gestopfte Pipettenspitzen verwendet wurden, die ebenfalls autoklaviert waren. Ein 20µl-Einfachansatz enthielt:

1-2µl DNA- bzw. cDNA-Template

2µl Desoxyribonukleotid-Gemisch (2mM)

1,5µl Primer 1 (10µM)

1,5µl Primer 2 (10µM)

2µl 10x Taq-Reaktionspuffer

0,5µl Red Taq Polymerase

mit autoklaviertem A.bidest auffüllen. Der so zusammengestellte Ansatz wurde in einen Thermocycler überführt. Um sicher zu sein, dass entstandene PCR-Produkte spezifisch waren und nicht von der Amplifikation einer DNA-Kontamination in einem oder mehreren der verwendeten Reagenzien herrührten, wurde bei jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle mitgeführt, in der kein Template enthalten war.

Wenn nicht anders angegeben, wurde bei allen PCR-Reaktionen das folgende Temperatur-Programm verwendet:

Denaturierung: 5min 95°C

30 Zyklen à: 30sec 95°C

30sec 56°C

60sec 72°C

Elongation: 7min 72°C.

Die Identifizierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld voneinander getrennt werden. Sie erfolgt in pH-neutralen Gelen aus Agarose, deren Konzentration je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle zwischen 0,3% und 2,0% liegt. 2 bis 10µl des jeweiligen DNA-Ansatzes wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt, auf das Gel geladen und für 30 bis 60min bei 100V in 1x TAE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur näherungsweisen Bestimmung der Fragmentgröße und der ungefähren Menge einzelner Nukleinsäure-Fragmente wurden

jeweils 500ng DNA-Molekulargewichtsmarker (1kb-Leiter) mit aufgetragen. Die Visualisierung der aufgetrennten Moleküle erfolgte durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, welcher den Gelen zugesetzt wurde (Endkonzentration: 0,2 µg/ml). Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele im UV-Durchlicht unter Verwendung eines Rotfilters fotografiert.

2.1.3 Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen, Agarosegelen oder Zellen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100 bis 10.000bp erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma QIAGEN. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der unterschiedlichen DNA-Bindungsfähigkeit der Silica-Gel-Matrix in Abhängigkeit vom pH-Wert und Salzgehalt der Puffer. Alle Arbeitsschritte entsprachen den Angaben des Herstellers.

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit einer Größe von 70 bis 10.000bp erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der unterschiedlichen DNA-Bindungsfähigkeit der Silica-Gel-Matrix in Abhängigkeit vom pH-Wert und Salzgehalt der Puffer. Alle Arbeitsschritte entsprachen den Angaben des Herstellers.

Für die Isolation und Aufreinigung von DNA aus Gewebe oder Zellpellets wurden die Ausgangsmaterialien zunächst verdaut. Dem hierfür eingesetzten Schwanzpuffer wurde 0,5mg/ml Proteinase K frisch zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 55°C. Nach mehrfachem Vortexen wurden Proteine und RNA mit Hilfe von 0,4 Volumen 6M Natriumchlorid-Lösung gefällt und für 10min bei 13.000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,6-0,8 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur versetzt um eine Fällung der DNA zu erzielen. Die anschließend pelletierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen bei 30°C in autoklaviertem A.bidest resuspendiert. Die so aufgereinigte DNA wurde für PCR-Reaktionen eingesetzt und bei -20°C gelagert.

2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte unter Verwendung von 500µl Quarzküvetten (1cm Schichtdicke) in einem Spektralphotometer. Dazu wurde jeweils ein Aliquot der zu untersuchenden Lösung mit einfach destilliertem Wasser verdünnt und die Absorption bei 260nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1cm Proben-Schichtdicke etwa einer Konzentration von 50µg/ml bei doppelsträngiger DNA, 40µg/ml bei RNA, langer einzelsträngiger sowie Plasmid-DNA und 30µg/ml bei kurzkettigen Oligonukleotiden. Eventuelle Verunreinigungen der DNA oder RNA durch Proteine wurden durch eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280nm und der anschließenden Berechnung des Quotienten aus A260 und A280 ermittelt. Dieser liegt bei sehr reinen DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 1,95 sowie bei reinen RNA-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf die Anwesenheit von Proteinen

oder Verunreinigungen mit z.B. Phenol, während höhere Werte anzeigen, dass die Nukleinsäure denaturiert ist.

Neben der Bestimmung der Menge von Nukleinsäuren durch eine photometrische Messung erfolgte in einigen Fällen lediglich eine ungefähre Quantifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese und Vergleich der durch Ethidiumbromid-Färbung detektierten Banden mit denen eines DNA-Molekulargewichtsmarkers bekannter Konzentration.

2.1.5 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die sequenzspezifisch an DNA-Doppelstränge binden und diese spalten. Die entstehenden Fragmente haben durch die Lage der Schnittstelle eine definierte Länge und können durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Die Restriktionsspaltung von DNA-Fragmenten wurde zum Einen zur Kontrolle präparierter Plasmid-DNA und zum Anderen zur Erzeugung rekombinierbarer Enden für die Klonierung eingesetzt. Ein 20µl-Spaltansatz enthielt: 2µl 10x Reaktionspuffer, 2µl 10x BSA, 2U Restriktionsenzyme sowie 1-5µg Plasmid-DNA oder PCR-Produkt. Der Ansatz wurde für 1-2h bei 37°C im Heizblock inkubiert und anschließend mit dem QIAquick PCR-Purification Kit aufgereinigt.

2.1.6 Dephosphorylierung und Ligation linearisierter Vektoren

Um eine Religation linearisierter Plasmide nach dem Restriktionsverdau zu vermeiden, wurden freie 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP) entfernt. Für die Dephosphorylierung wurden 200ng DNA und 1µl SAP sowie 1µl 10x Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 10µl eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 15min bei 37°C im Heizblock. Abschließend wurde die SAP für 15min bei 65°C inaktiviert. 2,5µl des dephosphorylierten Plasmidansatzes wurden in die Ligation eingesetzt.

Bei der Ligation werden zueinander passende Enden von Nukleinsäuren miteinander verknüpft. Die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einem 3'-Hydroxylrest wird dabei von der T4-Ligase katalysiert. Ein 20µl Reaktionsansatz enthielt: 2µl 10x Reaktionspuffer, 2,5 Einheiten T4-DNA-Ligase und ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5, wobei die Gesamt-DNA-Menge maximal 1µg betrug. Die Ligation erfolgte für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Abschließend wurde die Ligase für 10min bei 65°C inaktiviert.

2.1.7 Hitzeschocktransformation

Mit Hilfe der Hitzeschocktransformation wurden Plasmide in kompetente E.coli Zellen eingeschleust. Dazu wurden 100µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20-100ng Plasmid-DNA versetzt und für 30min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 45sec bei 42°C im Wasserbad erhitzt, für 2min auf Eis inkubiert und mit 700µl antibiotika-

freiem LB-Medium versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 300rpm und 37°C wurden 100-300µl des Ansatzes auf antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und für 16h bei 37°C inkubiert. Die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien erfolgte durch die Verwendung von antibiotika-haltigem Medium.

2.1.8 Mini-Plasmidpräparation aus Bakterien

Um mit einem Plasmid-Konstrukt weitere Experimente durchführen zu können, muss dieses in damit transformierten Bakterien vermehrt und anschließend isoliert werden. Zuerst wurden die pelletierten Bakterien durch eine alkalische SDS-Lösung aufgeschlossen und anschließend die genomische DNA, Proteine sowie Membranreste durch eine neutralisierende Salzlösung ausgefällt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte durch Bindung an Glasmilchpartikel und nachfolgende Elution mit Hilfe spezieller Ionenaustausch-Säulen und Isopropanol-Präzipitation (Qiagen oder Macherey & Nagel Kit).

2.1.9 Endotoxin-freie (EF) Maxi-Plasmidpräparation aus Bakterien

Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen waren große Mengen hochreiner und vor allem Endotoxin-freier Plasmid-DNA erforderlich. Dazu wurden 250ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit Bakterien, die das gewünschte Plasmid-Konstrukt enthielten, angeimpft, kultiviert und abzentrifugiert. Das dabei erhaltene Bakterienpellet wurde anschließend unter Verwendung des Maxi-Plasmid-Isolations Kits nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die getrocknete DNA wurde in 500µl Endotoxin-freiem A.bidest aufgenommen.

2.1.10 Kryokonservierung von Bakterien

Wenn ein Plasmid-Konstrukt erfolgreich in Bakterien transformiert werden konnte, wurde ein sogenannter Glycerolstock angelegt, aus dem sich neue Flüssigkulturen animpfen und damit gewünschte Plasmid-Konstrukte in beliebig großer Menge gewinnen ließen. Zum Erhalt eines Glycerolstocks wurden 800µl einer über Nacht kultivierten 5ml Bakterienkultur in ein autoklaviertes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl sterilem Glycerol versetzt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.1.11 Aufreinigung von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Organen und adhären Zellen erfolgte mit Trizol (TRI Reagent®), einer optimierten Lösung zur Präparation von RNA, DNA und Proteinen. Für die Präparation aus adhären Zellen wurde das Kulturmedium zunächst abgesaugt und die Zellen 1x mit 3ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 500µl Trizol auf die Zellen gegeben, 5min bei RT inkubiert und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurde die Probe homogenisiert und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. 1mg des Organs wurden in 1ml

Trizol mit Hilfe eines Ultra-Turrax®-Dispergiergerätes homogenisiert und ebenfalls in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 50/100µl 1-Bromo-3-Chloropropan wurde der Ansatz für 15sec gevortext und für weitere 5min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15min, 12.000xg, 4°C) wurde die obere wässrige, RNA-haltige Phase in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Durch Zugabe von 250µl Isopropanol, einer 10-minütigen Inkubation bei RT und einer 10-minütigen Zentrifugation (12.000xg, 4°C) wurde die RNA präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit 500µl 75%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5min, 12.000xg, 4°C) und 5-10min luftgetrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen DEPC-A.bidest gelöst. Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde für die RT-PCR eingesetzt.

2.1.12 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription handelt es sich um eine Methode, bei der RNA mit Hilfe einer aus Retroviren isolierten DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, in komplementäre einzelsträngige DNA (*cDNA*) umgeschrieben werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Umschreibung der mRNA aus der präparierten Gesamt-RNA in cDNA unter Verwendung des Enzyms Transcriptor Reverse Transkriptase (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche) und Random Hexamer Primern, welche mit verschiedenen Stellen verteilt auf den mRNA-Molekülen hybridisieren können. Die so erhaltene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.13 In-vitro-Mutagenese

Mittels PCR-Mutagenese wurde cMyc an den N-Terminus von mFTCD in pIRES2-EGFP angefügt. Das verwendete Protokoll bestand aus 5 Schritten. Die beiden Elternstränge des Vektors wurden durch Hitzedenaturierung getrennt und anschließend erfolgte die Anlagerung der Oligonukleotide, welche die zu integrierende Sequenz enthielten. Während der Elongationsphase synthetisiert die PfuTurbo Polymerase die Plasmidkopien, welche die gewünschte Mutation beinhalten. Ein 100µl Reaktionsansatz enthielt: 1µl 50ng/ml DNA, je 1µl 100µM Oligonukleotide, 10µl 2,5µM dNTPs, 10µl 10x Reaktionspuffer, 2µl DMSO, 1µl PfuTurbo Polymerase, 76µl ddH₂O. Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

Denaturierung:	2min 99°C
28 Zyklen à:	20sec 99°C
	30sec 58°C
	420sec 72°C
Elongation:	7min 72°C.

Im zweiten Schritt wurde das PCR-Produkt mit 2 Volumen Isopropanol gefällt und für 15min bei 12.000xg abzentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 70% Ethanol erfolgte die Entfernung des unmutierten, methylierten DNA-Templates durch DpnI-Verdau für 2h bei 37°C. Nach der Aufreinigung der DNA über ein Agarosegel wurden die linearen Vektoren in einer gekoppelten Reaktion phosphoryliert und die Enden miteinander legiert. Das zirkuläre Einzelstrang-Plasmid wurde im Anschluss in E.coli transformiert, in welchen die Amplifikation des doppelsträngigen mutierten Vektors erfolgte.

2.1.14 Herstellung eines rekombinanten Adenovirus

Zur Herstellung der rekombinanten humanen Adenoviren wurde das AdEasy™ XL Adenoviral Vector System der Firma Stratagene verwendet. Alle Arbeitsschritte entsprachen den Anweisungen des Herstellers im dazugehörigen Handbuch. Den Ausgangspunkt dieser Methode bildete die Klonierung der kodierenden Sequenz von FTCD, CYP2D6 und SLA in einen Shuttle-Vektor (pShuttle-CMV). 2µg der entsprechenden Shuttle-Vektoren wurden durch PmeI linearisiert, aufgereinigt und dephosphoryliert. Mit Hilfe der Elektroporation (0,2-cm-Küvetten, 5ms Puls bei 200Ω, 2,5kV, 25µF) wurden 50 bis 100ng Shuttle-Vektor in E.coli BJ 5183-AD-1-Zellen transformiert. Das Gen wurde durch homologe Rekombination in das Plasmid pAdEasy-1 integriert, welches das Genom des humanen Adenovirus Serotyp 5, mit einer Deletion der Gene E1 und E3, enthält. Durch Minipräparation und PacI-Verdau wurden die Klone mit erfolgreicher Rekombination selektiert und nach Transformation in einen rekombinationsdefizienten E.coli XL10-Gold-Stamm amplifiziert. Nach Maxipräparation und Linearisierung der rekombinanten Plasmide mit dem Restriktionsenzym PacI erfolgte die Transfektion mittels Polyethylenimin in 293-Zellen (s.u.). Diese Verpackungszelllinie komplettierte das deletierte E1-Gen des Virus in vivo, so dass funktionsfähiges Virus entstand. Nach Auftreten eines deutlichen zytopathischen Effektes (4-7 Tage nach der Transfektion) wurde der primäre Virusstock präpariert. Dazu wurden die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vollständig vom Boden der Kulturschale gelöst, in 15ml-Röhrchen überführt und die Viren durch dreimaliges Einfrieren (flüssiger Stickstoff) und Auftauen (37°C, Wasserbad) geerntet. Nach einer abschließenden 10-minütigen Zentrifugation bei 2000xg wurde der gewonnene Virusüberstand („primärer Virusstock“) bei -80°C gelagert. Für eine erste Amplifikation wurden 293-Zellen in DMEM (+10% FCS/+PS) in T75cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90% mit dem primären Virusstock in 2% FCS-haltigem DMEM transduziert. Nach 36h wurde der Virus erneut geerntet und in 3 weiteren Transduktionsschritten amplifiziert. Aus insgesamt 12 T175cm² Zellkulturflaschen wurden die transduzierten Zellen vorsichtig ab gespült und nach Zentrifugation für 8min bei 1000xg in 6ml PBS resuspendiert und der Virus erneut über dreimaliges Einfrieren und Auftauen geerntet.

2.1.15 Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

Die hergestellten Adenoviren wurden über eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. In 15ml ultra-clear Zentrifugationsröhrchen der Firma Beckmann wurde ein Cäsiumgradient vorbereitet indem 3,5ml 1,2g/ml Cäsiumchloridlösung auf 3,5ml 1,4g/ml Cäsiumchloridlösung gegeben wurden. 6ml Virusüberstand wurden sehr langsam auf den Gradienten geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge für 4h bei 27.000xg und 4°C. Das komplette Virus befindet sich in der untersten Bande und wurde mit Hilfe einer Spritze abgenommen und mit 2x Aufbewahrungs-Puffer versetzt. Anschließend wurde das potentiell toxische Cäsiumchlorid durch mehrfache Dialyse eliminiert. Dazu wurde das Virus in Slide-A-Lyser® Dialyse-Kassetten überführt und zweimal für 2h bei 4°C gegen den Dialysepuffer dialysiert. Zur Feststellung der Konzentration des Virus wurde eine Virustitration durchgeführt.

2.1.16 Virustitration

Der Titer der infektiösen Partikel wurde mit dem Adeno-X™ Rapid Titer Kit von Clontech bestimmt. Das Prinzip der Quantifizierung des Virusstocks beruht auf der Expression von viralen Hexonproteinen auf der Oberfläche der infizierten Zellen. Die Virustitration wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. 200.000 293-Zellen wurden in 1ml DMEM (+FCS/+PS) in 24well Platten ausgesät und nach 24h mit 100µl verschiedener Virusverdünnungen (10^{-2} - 10^{-7} in Medium) infiziert. 48h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen für 10min bei -20°C mit 500µl eiskaltem 100%igem Methanol inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 500µl 1x PBS/1% BSA wurden die Zellen mit 250µl einer 1:400-Verdünnung des Anti-Hexon-Antikörpers für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit 500µl 1x PBS/1% BSA gewaschen und mit 250µl des anti-Maus-HRP-Antikörpers für 1h bei 37°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit 500µl 1x PBS/1% BSA wurden die Zellen mit 250µl DAB-Substratlösung für 10min bei RT inkubiert. Diaminobenzamidin (DAB) wurde von der Peroxidase in einen braunen Farbstoff umgewandelt, wodurch sich alle Zellen braun färbten, die auf ihrer Oberfläche virale Hexone exprimiert haben. Abschließend wurde die Substratlösung durch 1x PBS ersetzt. Unter dem Mikroskop wurden die gefärbten Zellen in jedem Well bei einer 20-fachen Vergrößerung ausgezählt und die infektiösen Einheiten pro Milliliter nach folgender Formel berechnet: $\text{ifu/ml} = (\text{infizierte Zellen/Feld}) * (\text{Felder/Well}) * \text{Virusvolumen (ml)} * \text{Verdünnungsfaktor}$.

2.1.17 Infektion von 293-Zellen mit rekombinanten Adenoviren

Zur Untersuchung der Überexpression der humanen Proteine wurden 500.000 293-Zellen in 5ml DMEM in 6well Platten ausgesät und nach 24h mit unterschiedlichen MOIs (50, 100,

200) in 3ml DMEM infiziert. 24h nach der Infektion erfolgte die Zellernte, die Proteinpräparation und die Analyse der Überexpression mittels Western Blot.

2.2 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Alle Arbeitsschritte zur Präparation von Gesamtzellextrakten erfolgten auf Eis. Zur Präparation von Lysaten wurden die Zellen mit 2ml gekühltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers in 500µl PBS (mit Proteaseinhibitoren-Mix) geerntet und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer einminütigen Zentrifugation (10.000×g, 4°C) wurden die pelletierten Zellen in 100 bis 200µl 1x Lysepuffer resuspendiert, 2min inkubiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen der Proteinlösung wurde das Zelllysat für 5min bei 16.000×g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung beruht auf einer Änderung des Absorptionsmaximums von Coomassie brilliant blue G-250 von 465nm auf 595nm bei einer Komplexbildung mit Proteinen. Dazu wurde die Proteinlösung 1:50 bzw. 1:100 in 800µl A.bidest verdünnt, mit 200µl Bradford-Reagenz der Firma Biorad versetzt und nach 5min die Extinktion bei 595nm gegen A.bidest als Leerwert gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde eine Eichkurve mit 1-20µg BSA als Standard erstellt.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE wurden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Dazu wurden 10 bis 50µg Protein mit 4x Proteinprobenpuffer und A.bidest zu einem Gesamtvolumen von 20µl gemischt, 5min bei 95°C denaturiert und auf ein 10%iges Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 15min bei 120V und für 90min bei 150V im 1x-Laufpuffer. Als Standard zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 10µl eines vorgefärbten Proteinmarkers der Firma Biorad mitgeführt.

2.2.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Zur Bestimmung der Qualität rekombinanter Proteine wurden die aufgetrennten Proteine nach SDS-PAGE im Gel gefärbt. Die Färbung wurde mit Coomassie® G-250 Blue der Firma Invitrogen gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5 Western Blot

Beim Western Blot werden die zuvor in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mit Hilfe von Antikörpern oder anderen, an das Zielprotein bindenden Reagenzien nachgewiesen.

Beim Transfer wurde das Gel auf die Membran und zwischen zwei Filterpapier gelegt und der Blot erfolgte in 1x Transferpuffer für 1h bei 350A und 100V. Danach wurde die Membran zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen auf einem Schüttelinkubator eine Stunde bei RT in 5% Milchpulver in 0,1% Tween-20 in 1x TBS (TBS-T) inkubiert. Die Seren oder Erstantikörper wurden in 5% Milchpulver TBS-T verdünnt und eine Stunde bei RT auf den Membranen inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen in 1x TBS-T wurde der HRP-konjugierte Detektions-Antikörper (in 5% Milchpulver in 1x TBS-T) hinzupipettiert und der Ansatz 20min lang bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte in 1x TBS-T für jeweils 15min. Danach wurden die gebundenen Peroxidase-Moleküle mittels des ECL-Systems von GE Healthcare nach den Angaben des Herstellers detektiert. Nach kurzer Exposition eines Chemolumineszenzfilms derselben Firma erfolgte die Entwicklung des Films in einem automatischen Entwickler.

Für die Inkubationen der Membran mit weiteren Antikörpern wurde sie nach der Exposition des Films 4x 5min mit TBS-T gewaschen, 30min bei 50°C in Stripping-Puffer rotierend inkubiert und anschließend 6x 5min mit TBS-T gewaschen. Abschließend wurde die Membran erneut mit 5%Milchpulver in TBS-T geblockt und zur Detektion eingesetzt.

2.2.6 Herstellung rekombinanter Proteine

Nachdem eine 6-His Markierung an den C-Terminus des murinen FTCD kloniert wurde, erfolgte die Integration in den pET3a Vektor der Firma Novagen. Die anschließende Expression und Amplifikation des rekombinanten Proteins wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufreinigung des Proteins aus BL21 E.coli-Lysaten erfolgte unter nativen (nicht denaturierenden) Bedingungen und der Verwendung von Ni-NTA His-Bind Säulen mittels Nickel-Chelat Affinitätschromatographie nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Anschließend wurde das Imidazol durch mehrfache Dialyse eliminiert. Zur Qualitätskontrolle wurden SDS-PAGE und Coomassie-Färbung durchgeführt und die Quantität mit Hilfe des Bradford Assays bestimmt.

2.3 Zellbiologische Arbeiten

2.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen (in RPMI oder DMEM) wurden in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Zur Pelletierung eukaryotischer Zellen wurden diese bei 1200rpm für 5min zentrifugiert.

2.3.2 Zelllinien und ihre Kultivierung

Leukozyten wurden in RPMI-Vollmedium, 293 sowie HepG2 Zellen wurden in DMEM kultiviert. Wenn die Kulturflaschen von einem „Monolayer“ bedeckt waren bzw. mehr als 90%ige Konfluenz hatten, wurden die Zellen bei Bedarf gewaschen und aufgeteilt.

2.3.3 Auftauen, Einfrieren und Zählen eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen können durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) für lange Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wurde ihnen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam Wasser entzogen. Mindestens 5×10^6 und maximal 2×10^7 Zellen wurden auf Eis in 1ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und auf -80°C abgekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert. Nach dem schnellen Auftauen kryokonservierter Zellen bei 37°C müssen diese mit Kulturmedium gewaschen werden.

Zur Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen wurde der Trypanausschlußtest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aktiv aus, während tote Zellen blau gefärbt werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

2.3.4 Präparation von murinen Zellen aus Milz und Lymphknoten

Die Milz einer Maus wurde herauspräpariert und in einer 6well Schale in 5ml FACS-Zellpuffer mit dem Stempel einer Spritze zerrieben. Die dabei erhaltene Zellsuspension wurde möglichst ohne Bindegewebsreste mit einem Zellsieb (70µm) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Um störende Erythrozyten zu entfernen, erfolgte anschließend eine fünfminütige Inkubation der Milzzellen in 5ml Erythrozyten-Lysepuffer. Durch Zugabe von 10ml FACS-Zellpuffer und Zentrifugation wurde die Lyse gestoppt. Die Zellen wurden schließlich in 10ml RPMI-Vollmedium resuspendiert, gezählt und für Versuche eingesetzt.

Präpariert wurden inguinale und mesenteriale Lymphknoten. Das weitere Vorgehen entspricht der Präparation von Milzzellen (s.o.), mit Ausnahme der Erythrozyten-Lyse, die dabei nicht notwendig ist.

2.3.5 Präparation von intrahepatischen Leukozyten

Die Leber einer Maus wurde herauspräpariert und in einer 6well Schale in 5ml FACS-Zellpuffer mit dem Stempel einer Spritze zerrieben. Die dabei erhaltene Zellsuspension wurde möglichst ohne Bindegewebsreste mit einem Zellsieb (70µm) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Die intrahepatischen Lymphozyten wurden danach unter Verwendung eines Percoll-Gradienten mit 70% Percoll Lösung im unteren und der Zellsuspension in 40%iger Percoll Lösung im oberen Gradienten aufgetrennt. Die Gradientenzentrifugation erfolgte bei RT für 20min bei 400xg. Um störende Erythrozyten zu entfernen, erfolgte anschließend eine fünfminütige Inkubation der Zellen in 5ml Erythrozyten-Lysepuffer. Durch Zugabe von 10ml FACS-Zellpuffer und Zentrifugation wurde die Lyse gestoppt. Die Zellen wurden schließlich in 10ml RPMI-Vollmedium resuspendiert, gezählt und für Versuche eingesetzt.

2.3.6 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Die transiente Transfektion von Zellkulturen mit Plasmid-DNA zur Herstellung adenoviraler Vektoren erfolgte mit Hilfe von PEI. PEI ist ein kationisches Polymer das negativ geladene Nukleinsäuren fällt, woraufhin diese positiv-geladenen Komplexe an anionischen Zellmembranstrukturen binden können um schließlich per Endozytose in die Zelle transportiert zu werden. Einen Tag vor der Transfektion wurden eine Million 293-Zellen in 5ml DMEM (+FCS/+PS) in 25cm²-Flaschen ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen einmal mit serumfreien DMEM (-FCS/-PS) gewaschen und anschließend mit 2ml serumfreiem Medium versetzt. Für die Transfektion wurden 7,5µg linearisierte Plasmid-DNA bzw. 15µl 1mg/ml PEI in jeweils 500µl serumfreiem DMEM verdünnt und für 5min bei RT inkubiert. Danach wurde der DNA-Ansatz durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit dem PEI-Ansatz vermischt und für 20-30min bei RT inkubiert, wobei sich Polymer-DNA-Komplexe bildeten. Der 1ml-Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken in der Flasche verteilt. Nach 4-6h wurden die 3ml Transfektionsansatz durch 3ml DMEM (+FCS/+PS) ersetzt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz, wurde das Plasmid pIRES2-EGFP eingesetzt. Die intrazelluläre Expression des grün fluoreszierenden Proteins wurde nach der Transfektion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert.

2.3.7 Stimulation von murinen T Zellen

Murine T Zellen können in der Kulturschale auf verschiedene Art und Weise stimuliert werden. Die polyspezifische Stimulation erfolgte in der Regel mit platten-gebundenem anti-CD3-Antikörper und löslichem anti-CD28-Antikörper. Der anti-CD3-Antikörper wurde 4h bei 37°C im Zellkulturinkubator an eine 96well Platte gebunden. Murine Milzzellen sind aber auch mit ConA (2,5µg/ml) oder mit PMA/Ionomycin (0,1µM/10µM) stimulierbar.

2.3.8 Anreicherung von Zellen über magnetische Zellsortierung

Eine besonders geeignete Methode zur schnellen und komfortablen Anreicherung einer großen Menge von Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenmolekül exprimieren, ist die magnetische Zellsortierung (*Magnetic-activated cell sorting*, MACS). MACS erlaubt die Markierung der anzureichernden Zellen durch Antikörper, welche entweder direkt an kleine Metallpartikel gebunden sind oder durch einen Sekundär-Antikörper an diese konjugiert werden. Mit Hilfe eines Magneten und unter Verwendung spezieller Säulen lassen sich unmarkierte Zellen durch Waschen entfernen, während die an die Metallpartikel gebundenen Zellen zurückbleiben und anschließend von der Säule eluiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die magnetische Zellsortierung verwendet, um T-Zellen aus zuvor präparierten murinen Milzzellen zu isolieren. Dazu wurden 1×10^8 Milzzellen nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec) mit dem jeweiligen Antikörper gefärbt und dann anschließend sortiert. Die Menge und Reinheit der angereicherten murinen T-Zellen wurde vor ihrer weiteren Verwendung mittels Zellzählung bzw. Durchflusszytometrie überprüft.

2.3.9 Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen

Um die Expression von Oberflächenmolekülen zu quantifizieren oder die Anteile von positiven Zellen zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Messungen (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS) durchgeführt.

Je Färbung wurden zwischen 2×10^5 und 1×10^7 Zellen in ein FACS-Röhrchen oder eine 96well Platte pipettiert und abzentrifugiert. Die Fc-Rezeptoren der Zellen wurden je nach Bedarf mit 2,5% Ratten- oder Mausserum in FACS-Puffer für 15min auf Eis blockiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde in der jeweils passenden Verdünnung in 100µl FACS-Puffer zugegeben und für 30min auf Eis oder 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper in 100µl FACS-Puffer zugegeben und für 30min auf Eis oder bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung des Fluoreszenz-konjugierten Antikörpers beurteilen zu können, wurde stets eine Negativkontrolle ohne Primär-Antikörper durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer plus 1% PFA aufgenommen. Bei Verwendung direkt markierter Antikörper wurde nach der ersten Inkubation dreimal gewaschen und die Zellen dann für die Messung in FACS-Puffer plus 1% PFA aufgenommen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers (LSRII) unter Verwendung der dazugehörigen Software (DIVA, BD Biosciences, Heidelberg).

2.3.10 Intrazelluläre Färbung für durchflusszytometrische Messungen

Für die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 wurden zunächst alle Oberflächenmarker wie oben beschrieben markiert. Die anschließende Permeabilisierung

der Zellmembranen und die Färbung wurden gemäß den Herstellerangaben mit dem Fixierungs- und Permeabilisierungskit der Firma eBioscience durchgeführt.

2.3.11 Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)

Mittels ELISPOT können zytokinproduzierende Zellen in ihrer Frequenz bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden IFN- γ -ELISPOT durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 30 μ l 35%igem Alkohol für 1min angefeuchtet und fünfmal mit 200 μ l A.bidest je Vertiefung gespült sowie der IFN- γ Fängerantikörper (IFN- γ , unkonjugiert) in PBS verdünnt (5 μ g/ml) und durch Inkubation über Nacht bei 4°C an die Membran immobilisiert (100 μ l je Vertiefung). Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden noch unbesetzte Bindungsstellen durch mindestens 30-minütige Inkubation bei 37°C in RPMI-Vollmedium blockiert (200 μ l je Vertiefung), um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurden die Vertiefungen entleert und die zu untersuchenden Zellen hineinpipettiert. Dabei wurden jeweils 100 bis 200 μ l Zellsuspension inklusive jeweiligem Stimulanz je Vertiefung eingesetzt. Die Inkubation von 18 bis 24 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) musste erschütterungsfrei erfolgen. Anschließend wurde die Platte fünfmal mit PBS gewaschen und der zweite, biotinylierte Detektionsantikörper (IFN- γ Biotin) wurde in PBS (0,5 μ g/ml) á 100 μ l in die Vertiefungen pipettiert. Der Ansatz wurde 90min bei 37°C inkubiert und dann fünfmal mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurden 100 μ l HRP-konjugiertes Avidin (1:1000 in PBS) in jede Vertiefung pipettiert und der Ansatz 45min bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von frisch angesetzter AEC Substratlösung (100 μ l je Vertiefung), welche sich in Abhängigkeit von der in den verschiedenen Vertiefungen befindlichen IFN- γ -positiven Zellen rostig rot verfärbte. Sobald Spots sichtbar wurden, wurde die Reaktion in Leitungswasser gestoppt. Danach wurde die Platte offen bei RT getrocknet und mit Hilfe eines ELISPOT-Meßgerätes ausgewertet.

2.3.12 B-Zell-Immunospot-Assay

Dieser Assay entspricht im Aufbau dem ELISPOT und wurde verwendet um die Quantität antigenspezifischer B-Zellen zu bestimmen. Im Unterschied zum regulären IFN- γ -ELISPOT wurden die Mikrotiterplatten mit rekombinantem murinem FTCD Protein oder Kontrollprotein (Ovalbumin, OVA) gekoppelt. Für die Positivkontrollen wurden anti-Maus IgG Antikörper auf den Platten immobilisiert. Nach der anschließenden Inkubation der Milzzellen erfolgte die Detektion der sezernierten Antikörper mit Hilfe eines biotinylierten anti-Maus IgG Detektionsantikörpers. Die weiteren Schritte zur Entwicklung der Spots und Auswertung des Assays erfolgten wie beim IFN- γ -ELISPOT Assay.

2.4 Histologische Arbeiten

2.4.1 Herstellung von Gewebsschnitten

Mit Hilfe der Herstellung und Anfärbung von Gewebsschnitten lässt sich die Struktur von Organen sowie der Anteil und die Lokalisierung bestimmter Zelltypen innerhalb derselben untersuchen. Um ein Gewebe schneiden zu können, muss es zuvor in ein spezielles Lagerungsmedium (Paraffin) bzw. Einfriermedium (TissueTek) eingebettet werden.

Zur Analyse von einer Gewebeschicht mittels H&E-Färbung eignet sich die Paraffineinbettung von diversen Organen (z.B. Leber). Hierbei wurde das Organ zunächst für 24 Stunden bei 4°C in 4% PFA fixiert. Darauf folgte eine Entwässerung über eine Alkoholreihe und abschließend ein Xylolbad bevor das Organ mit 58°C heißem Paraffin in eine dafür vorgesehene Kassette eingebettet wurde. Nach dem Aushärten bei Raumtemperatur wurden die Objekte mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten und die 4-6µm dicken Schnitte wurden auf Objektträger transferiert.

Gefrierschnitte (Kryoschnitte) haben gegenüber Geweben, die in Paraffin eingebettet wurden, den Vorteil, dass sie sich wesentlich besser für immunhistologische Färbungen eignen, da aufgrund der speziellen Schnitt- und Fixierungsbedingungen sowie der anschließenden Probenlagerung bei -70°C ein Großteil der Antikörper-Epitope erhalten bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Lebern und Milzen aus verschiedenen Mäusen Gefrierschnitte angefertigt. Dazu wurde eine halbe Milz, und Teile des linken lateralen Lobus der Leber in ein Einbettgeschälchen überführt, für 6 Stunden in 2% PFA fixiert und anschließend über Nacht in 30% Saccharoselösung inkubiert. Darauffolgend wurden die Organe in Einfriermedium eingebettet und bei -70°C gelagert. Von einer auf diese Art eingefrorenen Probe wurden anschließend mit Hilfe eines Kryotoms 7µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Superfrost-Objektträger transferiert. Nachdem die Objekte getrocknet waren, wurden sie bei -20°C gelagert und für Fluoreszenzfärbungen eingesetzt.

2.4.2 H&E-Färbung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte mussten zuerst entparaffinisiert werden, indem die Schnitte zweimal 10min in dem organischen Lösungsmittel Xylol, dann je 1mal 3min in 100%-, 90%-, 80%- und 70%igem Alkohol getaucht und zum Schluss 5min in A.bidest gewässert wurden. Danach erfolgte eine dreiminütige Färbung mit gefiltertem Hämalaun, wonach die Objekte für 10min mit Leitungswasser und nachfolgend mit A.bidest gewaschen wurden. Der zweite Färbeschritt erfolgte für 1min in 1%igem Eosin. Gewaschen wurde mit A.bidest. Nun wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90%, 100%) je 5min entwässert und anschließend dreimal für 2min in dem Xylol getaucht, damit der Schnitt zum Schluss mit Entellan (auf Xylolbasis) eingedeckelt werden konnte. Die Schnitte sollten mindestens über

Nacht unter einem Abzug getrocknet werden, damit das Xylol verdampfen und das Entellan aushärten kann.

2.4.3 Versilberung von Paraffinschnitten

Die Färbung von retikulären Fasern in der Leber erfolgte mittels Versilberung nach Gomori. Diese Färbung ist dazu geeignet Fibrose, d.h. die krankhafte Vermehrung von Bindegewebe im Gewebe (v.a. Leber), festzustellen. Die Versilberung der Leberparaffinschnitte wurde im Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und anschließend am Mikroskop ausgewertet.

2.4.4 Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Für die Fluoreszenzfärbungen in dieser Arbeit wurden die Gefrierschnitte nach dem Auftauen und Trocknen 5min in einem eiskalten Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) fixiert. Die fixierten Schnitte wurden 10min bei RT getrocknet und zur Rehydrierung für 15min in TBS-T inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger auf Plastik-Immunfärbekammern aufgelegt und in einen Plastik-Färbeständer eingesetzt. Alle Durchführung der Schritte der Antikörper-Färbungen erfolgte bei RT. Zunächst wurden auf jeden Kapillarspalt 150µl TBS-T + 5% Serum (Rattenserum oder Ziegenserum) gegeben und die Gefrierschnitte durch 20-minütige Inkubation geblockt. Die Antikörper wurden in ihrer jeweiligen Verdünnung in 150µl TBS-T pro Schnitt aufgetragen und 1h inkubiert. Nach der Inkubation folgten drei Waschschriffe mit jeweils 2ml TBS-T. Um eine bessere Übersicht über das jeweilige Gewebe zu bekommen, wurde die DNA der Zellkerne hochspezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) angefärbt, mit einer Inkubationszeit von 5min. Nach einem abschließenden Waschschriff (zweimal 2ml TBS-T) zur Beseitigung von Resten der DAPI-Lösung, wurden die Immunfluoreszenz-gefärbten Gefrierschnitte in Mowiol eingebettet. Die Auswertung der Immunhistologie und die Bildbearbeitung erfolgten am Axio Imager M1 mit der Mikroskop-Software Axiovision Rel. 4.8 der Firma Zeiss.

2.4.5 Foxp3-Färbung auf Kryoschnitten

Neben der Oberflächenfärbung der Lymphozyten im Gewebe erfolgte auch eine intrazelluläre Färbung zur Detektion von Foxp3. Hierfür wurden die Objektträger nach der Fixierung mit Methanol-Aceton 30min lang in 1% Triton X-100 vorbehandelt, damit die Zellwände durchlässig werden. Anschließend erfolgten eine Behandlung mit 5% Rattenserum für 30min bei RT und ein zweiter Blockierungsschriff mit Ziege-anti-Maus IgG für eine Stunde. Die Primärantikörper für die Oberflächenfärbung wurden in einem Antikörper-Verdünnungspuffer mit BSA und Gelatine 30min lang bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBST erfolgte ein Waschschriff mit PBS plus 0,1% Triton X-100. Der Foxp3-Antikörper wurde in PBS-Triton X-100 verdünnt, eine Stunde lang auf den

Schnitten inkubiert und danach wiederholt mit PBS-Triton X-100 gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (s.o.).

2.4.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Rattenschnitten

Das Autoantikörperlabor der Medizinischen Hochschule Hannover hat die Objektträger mit 3 Rattengewebe (Magen, Niere und Leber) bereitgestellt, welche auch in der Routinediagnostik bei humaner AIH eingesetzt werden. Nach dem Auftauen der Gefrierschnitte wurden unspezifische Bindungsstellen bei einer 20-minütigen Inkubation mit 5% BSA und 10% Ziegen Serum in TBS-T geblockt. Die murinen Seren sind in dem gleichen Puffer verdünnt (1:150 bis 1:300) und für 45min auf den Schnitten inkubiert worden. Dreimaliges Waschen mit TBS-T wurde zur Beseitigung unspezifisch gebundenen Antikörpern durchgeführt. Die Detektion der murinen Antikörper erfolgte mit Dylight488-gekoppeltem anti-Maus Sekundärantikörper. Der Antikörper wurde 1:300 in TBS-T verdünnt und für 20min auf die Schnitte gegeben. Die anschließenden Waschschrte und die DAPI-Färbung erfolgten wie bereits bei Punkt „Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten“ beschrieben.

2.4.7 Ishak Score

Die H&E Färbungen der Lebern wurden im Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover von Herrn Dr. med. J. Schlué mikroskopisch analysiert und bewertet. Die Bewertung erfolgte mittels Ishak Scoring, dem sogenannten modifizierten HAI-Score (Scheuer 1991; Longerich et al. 2008). Dafür wurden die portale und intra-azinare Entzündung, die periportale Abschnürung und Zerstörung der Hepatozyten (z.B. Piecemealnekrosen oder Interface-Hepatitis) sowie die Rosettenbildung und Einzelzell- und Gruppennekrosen der Hepatozyten im Läppchen bestimmt. Der summierte Score liegt zwischen 0 und 18.

2.5 Mausversuche

2.5.1 Tierhaltung

Die Arbeiten an Mäusen wurden in Übereinstimmung mit dem derzeit geltenden Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Für die Experimente bei denen ein adenoviraler Transfer erforderlich war, wurden die Tiere in der Infektionsbarriere des zentralen Tierlabors der MHH gehalten.

2.5.2 Anästhesie bei der Maus

Eine Maus wird mit einem Gemisch aus Rompun®, Ketanest und NaCl in Narkose versetzt. Der Wirkstoff Xylazin wird in der Tiermedizin als Xylazinhydrochlorid eingesetzt und im Handel als Rompun® bezeichnet. Es handelt sich hierbei um einen zentralen und peripheren

α 2-Adrenorezeptor-Agonisten, der eine ausgeprägte Sedierung und Hypnose, sowie eine muskelrelaxierende Wirkung und Analgesie erzeugt. Ketamin ist ein Cyclohexanderivat und wird als Arzneistoff in der Human- und Tiermedizin zur Behandlung von Schmerzen, zur Einleitung einer Narkose eingesetzt. Es dient der Erzeugung von Schlaf und Schmerzfreiheit. Das 10 μ l/g der folgenden Lösung wurde intraperitoneal verabreicht:

Rompun® (2%) →500 μ l

Ketanest (100mg/ml) →500 μ l

NaCl →4,5ml

Da eine Maus keinen Lidreflex besitzt, wurden die Augen während der Narkose mit Bepanthen Augensalbe (Bayer) vor dem Austrocknen geschützt.

2.5.3 Serumgewinnung bei der Maus

Den Mäusen wurde durch Punktion der Vena facialis (Unterkieferbereich) Blut entnommen. Die zellulären Bestandteile des Blutes wurden nach Koagulation abzentrifugiert und die davon abgetrennten Seren anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.4 Blutzucker-Bestimmung

Mit Hilfe eines Blutzuckermessgerätes der Firma LifeScan wurde die Blutzuckerkonzentrationen der NOD-Mäuse in einem Tropfen Blut aus der Schwanzvene bestimmt.

2.5.5 Intravenöse und intraperitoneale Injektion bei der Maus

Die intravenöse Injektion erfolgte mit einer U-100 Spritze der Firma BD mit einem maximalen Volumen von 200 μ l. Injiziert wurde in die obere Schwanzvene.

Bei intraperitonealer Injektion wurde mit einer U-100 Spritze der Firma BD mit maximalem Volumen von 1ml injiziert. Die Injektion erfolgte in den unteren Bauchraum im Leistenbereich.

2.5.6 Hydrodynamischer Transfer von Plasmiden

Der hydrodynamische Transfer von Plasmid-DNA über die Schwanzvene ist eine sehr einfache und effektive Technik um Gene in die Leber von Mäusen zu transferieren. Hierbei wurden 10-20 μ g Plasmid-DNA in 2ml Gesamtvolumen verdünnt und innerhalb von 5-7 Sekunden in die Schwanzvene injiziert. Die transiente Genexpression erfolgte v.a. in den Hepatozyten. Der hydrodynamische Transfer erfolgte unter Anästhesie.

2.5.7 Adoptiver Transfer von T-Lymphozyten oder Serum

Mit Hilfe von adoptivem Zelltransfer wurden die Milzzellen einer Maus, die bereits eine autoimmune Hepatitis zeigte, in eine kongene immundefiziente Maus transferiert. Die Zellen wurden in PBS verdünnt und intravenös appliziert.

Mit Hilfe des adoptiven Transfers von Serum sollte gezeigt werden, ob die Erkrankung der Maus auch ohne die zellulären Bestandteile des Blutes (v.a. Antikörper) in kongene immundefiziente Tiere übertragen werden kann. 100µl des Serums wurden intravenös appliziert.

2.5.8 Behandlung mit Diphtherietoxin (DT)

Die Depletion der regulatorischen T-Zellen in DEREK-Mäusen erfolgte durch eine Behandlung mit DT der Firma Merck. An Tag 1, 5 und zum Teil an Tag 13 und 16 nach der Gabe der Adenoviren wurden 1µg DT intravenös appliziert.

2.5.9 Partielle Hepatektomie

Die partielle Hepatektomie wurde genutzt um den aktuellen Stand der chronischen autoimmunen Hepatitis vor Beginn der Therapie festzustellen. Der chirurgische Eingriff unter Anästhesie erfolgte nach dem Protokoll von Wellenbring et al (Mitchell et al. 2008). Es wurde jedoch nur der linke seitliche Leberlappen (Lobus lateralis sinister) entfernt und für histologische Untersuchungen verarbeitet.

2.5.10 Therapie mit Kortikoiden

Als Standardtherapie der AIH beim Menschen wird eine Behandlung mit dem klassischen Glukokortikoid Prednisolon genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden NOD Mäuse, die bereits eine chronische autoimmune Hepatitis entwickelt hatten, ebenfalls mit diesem Medikament behandelt. Hierzu wurde den Tieren 8 Wochen nach dem Transfer von Ad-FTCD 8 Wochen lang eine tägliche Dosis von 1mg/kg Prednisolon über das Trinkwasser verabreicht. Die Kontrolltiere wurden nicht behandelt.

2.5.11 Klinische Parameter

Die quantitative Bestimmung von Alaninaminotransferase und Aspartataminotransferase in murinen Seren erfolgte mit einem kinetischen UV-Test in OLYMPUS-Analysengeräten. Bei dem Testprinzip handelt es sich um einen Enzym-Aktivitätsassay, der auf den Empfehlungen der IFCC (*International Federation for Clinical Chemistry*) basiert. Die Auftrennung der Serumproteine erfolgte mittels Kapillarelektrophorese mit einem Analysegerät der Firma Sebia. Die dabei ermittelten relativen Konzentrationsangaben der Gammoglobuline wurden durch Messung der Gesamtproteinmenge erweitert und in absolute Werte umgerechnet. Alle klinischen Parameter wurden im Institut für Klinische Chemie der MHH durchgeführt.

2.6 Statistiken

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Auswertung der Daten mit der GraphPad Prism Analyse-Software. Für die statistische Analyse der Daten wurde ein 2-seitiger Student's t-Test angewandt: *, Unterschied ist signifikant mit $p \leq 0,05$; **, Unterschied ist signifikant mit $p \leq 0,005$; ***, Unterschied ist signifikant mit $p \leq 0,0005$.

C. ERGEBNISSE

1 Leberspezifische Expression humaner Autoantigene mit Hilfe adenoviraler Vektoren

Hinsichtlich der Initiierung von leberspezifischer Autoimmunität wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Gefahrensignal (Matzinger 1994) in Kombination mit einem heterologen Autoantigen (*Altered Self*) die Toleranz der Leber brechen kann. Damit eine starke Stimulation des Immunsystems in der Leber erreicht wird, werden Adenoviren verwendet. Die eingesetzten adenoviralen Konstrukte (*human species C adenovirus serotype (Ad)5*) sind nicht replizierend und infizieren vorrangig die Hepatozyten (Hegenbarth et al. 2000; Kalyuzhniy et al. 2008; Waddington et al. 2008). Die kodierende Sequenz von drei bekannten Autoantigenen der humanen autoimmunen Hepatitis wurde mit Hilfe des AdEasy™XL Adenoviralen Vektorsystems von Stratagene in den pAdEasy-1 Vektor kloniert und die Viren in der Verpackungszelllinie 293 produziert (siehe Abbildung 5a). FTCD und CYP2D6 sind bekannte leberspezifische Proteine, gegen die Autoantikörper von Patienten mit dem AIH Typ-2 gefunden wurden. SLA ist ein bekanntes ubiquitär exprimiertes Autoantigen der AIH Typ-1. Diese humanen Gene haben mit den murinen Genen Homologie von 81% (FTCD und CYP2D6) bzw. 87% (SLA) (nicht gezeigt, Verwendung von BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)). Als Kontrolle wurde die kodierende Sequenz des verstärkten grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP) in den viralen Vektor kloniert.

Die fertigen Adenoviren Ad-(e)GFP, Ad-FTCD, Ad-2D6 und Ad-SLA wurden durch Transduktion von HepG2-Zellen getestet. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden nach der Transduktion der Zelllinie mit Ad-GFP grün-fluoreszierende Zellen beobachtet (ohne Abbildung). Die transduzierten Zellen wurden lysiert und die Proteine via SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen übertragen. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe von positiven Autoantikörperseren von AIH-Patienten verschiedener Typen getestet und mit HRP-gekoppelten anti-humanen Sekundärantikörpern detektiert. Das Serum eines gesunden Spenders diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Western Blot-Streifen von Virus transduzierten Zellen. Es kann eine Expression von FTCD (58kDa), CYP2D6 (54kDa) sowie SLA (48kDa) nach Virustransduktion festgestellt werden (siehe Abbildung 5b).

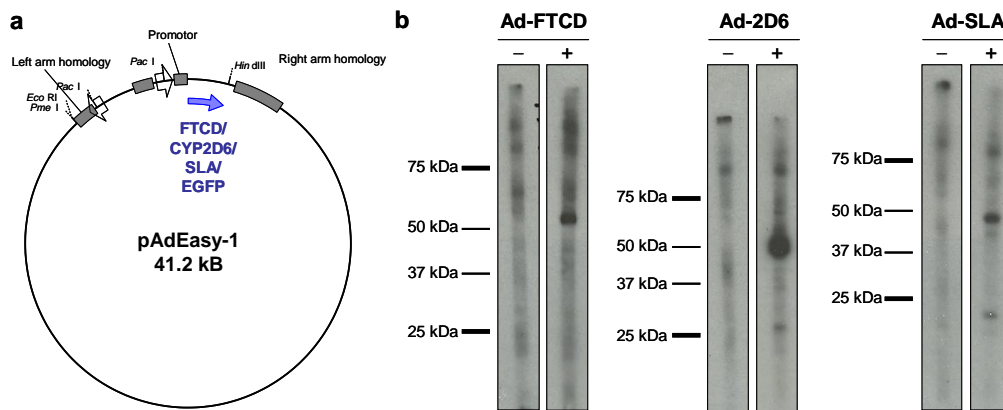


Abbildung 5: Die adenviralen Vektoren mit eGFP oder den humanen Genen FTCD, CYP2D6 bzw. SLA führen zur Expression des Proteins in transduzierten Zellen. a) Dargestellt ist die Vektorkarte des replikations-defizienten Adenovirus (Ad5), in welchen die kodierende Sequenz jeweils eines der humanen Antigene kloniert wurde. b) Die Lysate Virus-transduzierter HepG2 Zellen wurden im Western Blot überprüft. Dargestellt ist die Expression von humanem FTCD, CYP2D6 und SLA, welche mit Hilfe von Autoantikörper-positiven humanen Seren (+) und anschließender Inkubation mit HRP-gekoppeltem anti-humanem Antikörper detektiert wurden. Das Serum eines gesunden Spenders wurde als Kontrolle eingesetzt (-).

Zum Nachweis der spezifischen Genexpression in der Leber nach Infektion mit Adenoviren wurden 1×10^{10} infektiöse Viruseinheiten (ifu, *infectious units*) Ad-GFP in Mäuse intravenös (i.v.) appliziert. Nach 5 und 20 Tagen wurden die Lebern dieser Tiere in Tissue-Tek® zur Kryokonservierung eingebettet. Die Zellkerne der Kryoschnitte wurden mit DAPI gegengefärbt. Die fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Lebern zeigt eine GFP-Expression in den Hepatozyten 5 Tage nach der Virusgabe. Am Tag 20 nach Applikation des Ad-GFP ist kein GFP mehr detektierbar (siehe Abbildung 6).

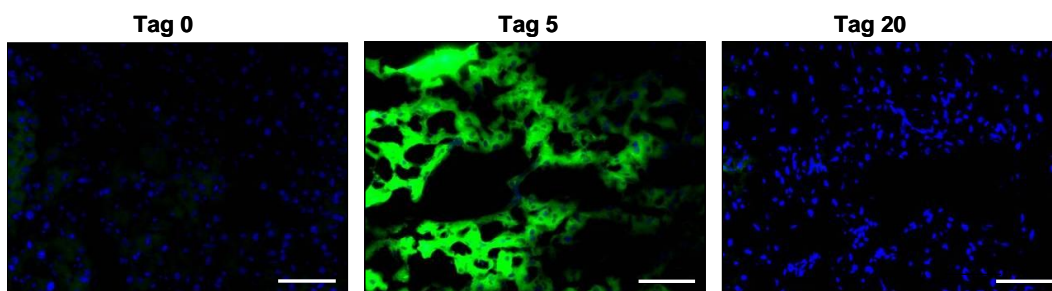


Abbildung 6: Die intravenöse Applikation adenviraler Vektoren führt zu einer transienten Genexpression. Die Gefrierschnitte muriner Leber vor sowie 5 oder 20 Tage nach i.v. Injektion von Ad-GFP sind dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Messbalken, 100 µm.

Außerdem kann die Virus-DNA 12 Wochen nach der Infektion nicht mehr in der Leber nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7). Es handelt sich somit um eine selbst-limitierte Infektion.

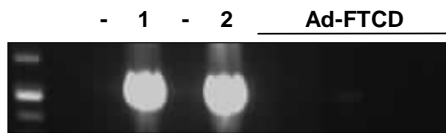


Abbildung 7: 12 Wochen nach der Infektion mit Adenoviren ist die Virus-DNA nicht mehr detektierbar. DNA wurde aus Leberproben verschiedener NOD-Tiere 12 Wochen nach der Infektion mit Ad-FTCD aufgereinigt und in einer PCR eingesetzt. Neben A.bidest als Negativkontrolle (-) wurden der Vektor pShuttle-CMV-hFTCD (1) sowie die DNA von Ad-FTCD transduzierten 293-Zellen (2) als Positivkontrollen verwendet. Die PCR erfolgte mit den Oligonukleotiden Ad-CMV-Fw und hFTCD Rv2. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 1100bp und wurde im Agarosegel aufgetrennt.

2 Transiente Antwort gegen den Adenovirus

Eine Erhöhung der Aspartat- und Alaninaminotransaminasen (AST, ALT) im Serum von Patienten ist ein Indiz für eine Hepatozytenschädigung. Daher wurden 1, 2, 7, 8, 12 und 13 Wochen nach dem Transfer von 1×10^{10} ifu der adenoviralen Vektoren die Seren von Mäusen gesammelt und die AST sowie ALT bestimmt. Abbildung 8 zeigt den Konzentrationsverlauf der Transaminasen von Ad-GFP und Ad-FTCD-infizierten NOD-Mäusen. Die Serumkonzentrationen der AST stiegen in der ersten Woche nach Virusgabe auf das drei- bzw. achtfache (Ad-GFP bzw. Ad-FTCD) und der AST auf das 35- bzw. 10-fache (Ad-GFP bzw. Ad-FTCD) der Ausgangswerte an und senkten sich in den darauffolgenden 6 Wochen wieder auf die Normalwerte ab. Im folgenden Untersuchungszeitraum bis 13 Wochen nach der Behandlung blieben die Transaminasenkonzentrationen in den beiden getesteten Gruppen konstant.

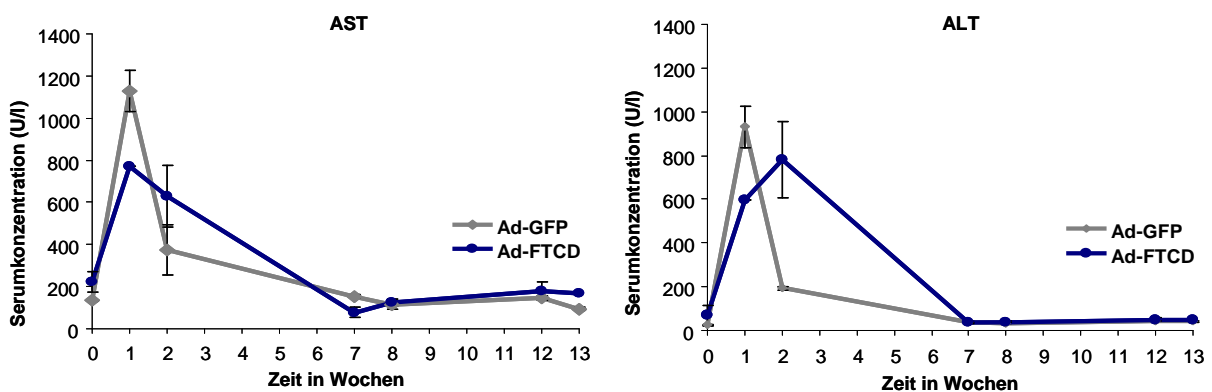


Abbildung 8: Die Infektion mit Ad-GFP und Ad-FTCD führt zu einem kurzzeitigen Transaminase-Anstieg. Seren von NOD-Mäusen wurden 1, 2, 7, 8, 12 und 13 Wochen nach dem Virustransfer gesammelt (n=3). Die Serumkonzentration der Aspartataminotransaminase (AST) und Alaninaminotransaminase (ALT) wurden gemessen und die Mittelwerte (\pm SD) bestimmt.

Parallel zu den genannten Laborparametern wurde auch die Leberhistologie untersucht. 4 Wochen nach der i.v. Applikation der viralen Vektoren wurden kleinere intralobuläre Leukozyteninfiltrate und vereinzelte Zelluntergänge (Nekrosen) aber keine akute Entzündung beobachtet (siehe Abbildung 9).

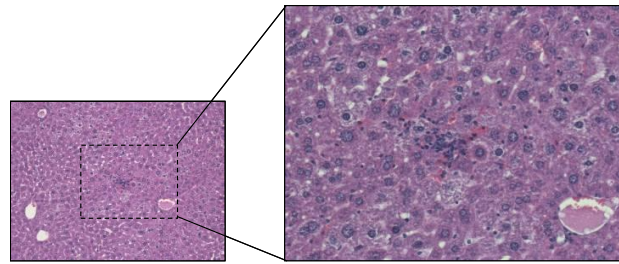


Abbildung 9: Die Adenovirusinfektion führt zu einer transienten milden Hepatitis. Repräsentative H&E-Färbung von Leberschnitten einer NOD-Maus 4 Wochen nach der selbst-limitierenden Infektion mit Ad-GFP. Vergrößerung: 10 bzw. 20-fach.

3 Bruch der humoralen Toleranz nach Infektion mit Ad-FTCD, Ad-2D6 und Ad-SLA

In vielen Patienten mit AIH werden eine Hypergammaglobulinämie und leberspezifische Autoantikörper beobachtet. Die Bestimmung der Menge an Gammaglobulinen und der Nachweis der Autoantikörper sind damit weitere wichtige Laborparameter der Diagnostik bei AIH (Alvarez et al. 1999).

Zu den Autoantikörpern der AIH Typ-1 zählen ANA, anti-SMA und anti-SLA. Etwa 74% der Patienten mit SLA-Autoantikörpern haben auch anti-ANA und anti-SMA Antikörper (Strassburg et al. 2002). Autoantikörper beim Typ-2 sind anti-LKM-1 und anti-LC1, welche spezifisch für CYP2D6 bzw. FTCD sind. Verschiedene Mausstämme (FVB/N, BALB/c, NOD/LtJ) wurden mit 1×10^{10} i.f.u. der 4 vorgestellten adenoviralen Vektoren behandelt. 12 Wochen nach der i.v. Applikation wurden die Seren der Tiere abgenommen und die Existenz von leberspezifischen Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung auf Rattenschnitten und Western Blot getestet. Im Menschen gilt ein Autoantikörpertiter von 1:80 als erhöht. In den nachfolgenden Versuchen wurden daher die Seren in einer 1:150 Verdünnung für Immunfluoreszenz bzw. 1:333 im Western Blot eingesetzt.

Im Vergleich zu den Ad-GFP-behandelten Kontrolltieren konnte mit Ad-FTCD, Ad-2D6 und Ad-SLA ein deutlicher Bruch der humoralen Toleranz in den drei getesteten Stämmen erreicht werden. Quantitative Bestimmungen ergaben, dass nach der Infektion mit Ad-GFP nur 10% der FVB/N Mäuse sowie 5% der NOD-Mäuse zytosolische Antikörper hatten und 5% der NOD-Mäuse zusätzlich ANA aufwiesen. Ad-FTCD führte zu zytosolischen Antikörper bei 83% der FVB/N Mäuse, 50% der BALB/c sowie 77% der NOD. Nur bei 14% der NOD-Mäuse wurden ANA nach Infektion mit Ad-FTCD festgestellt. In 50% der FVB/N Mäuse, 75% der BALB/c und 50% der NOD/LtJ konnten zytosolischen Antikörper nach Infektion mit Ad-2D6 nachgewiesen werden. Bei 25% der NOD-Mäuse wurden nach Infektion mit Ad-2D6 ANA festgestellt. In 25% der BALB/c und NOD/LtJ konnten zytosolischen Antikörper nach Infektion mit Ad-SLA nachgewiesen werden. Bei 75% der NOD-Mäuse wurden zudem ANA

nach Infektion mit Ad-SLA festgestellt. In FVB/N Mäusen wurde kein Bruch der humoralen Toleranz durch Ad-SLA beobachtet (siehe Abbildung 10). Außerdem konnten in BALB/c und FVB/N-Mäusen keine anti-nukleären Antikörper nach der viralen Immunstimulation beobachtet werden (ohne Abbildung).

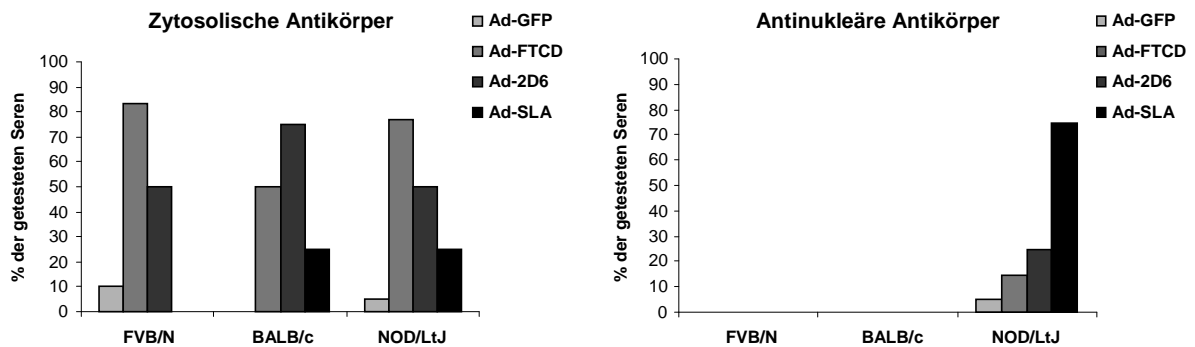


Abbildung 10: Bruch der humoralen Toleranz. Verschiedene Mausstämme wurden mit Ad-GFP, Ad-FTCD, Ad-2D6 oder Ad-SLA behandelt. 12 Wochen nach der Virusgabe wurden die Seren auf Rattenschnitten getestet und die Anzahl positiver Autoantikörperseren wurde in Relation zur Gesamtzahl der jeweils untersuchten Gruppe gesetzt. (Anzahl der getesteten Seren der FVB/N: Ad-GFP: n=10, Ad-FTCD: n=6, Ad-2D6: n=6 und Ad-SLA: n=6; BALB/c: Ad-GFP: n=0, Ad-FTCD: n=4, Ad-2D6: n=4 und Ad-SLA: n=4; NOD/LtJ: Ad-GFP: n=20, Ad-FTCD: n=35, Ad-2D6: n=4 und Ad-SLA: n=4).

In Abbildung 11 sind die Immunfluoreszenzaufnahmen repräsentativer Leberschnitte von Ratten dargestellt, wie sie in der humanen Diagnostik eingesetzt werden, nach der Inkubation mit murinen Seren. Die Anwesenheit Hepatozyten-spezifischer Autoantikörper im Serum der mit Ad-FTCD oder Ad-2D6 behandelten NOD-Mäuse und nicht in den Seren der Kontrolltiere (Ad-GFP) ist zu erkennen. Die dargestellten Färbungen der Lebern 12 Wochen nach Applikation von Ad-2D6 und Ad-SLA zeigen zudem die Existenz von antinukleären Antikörpern (ANA) (siehe Abbildung 11).

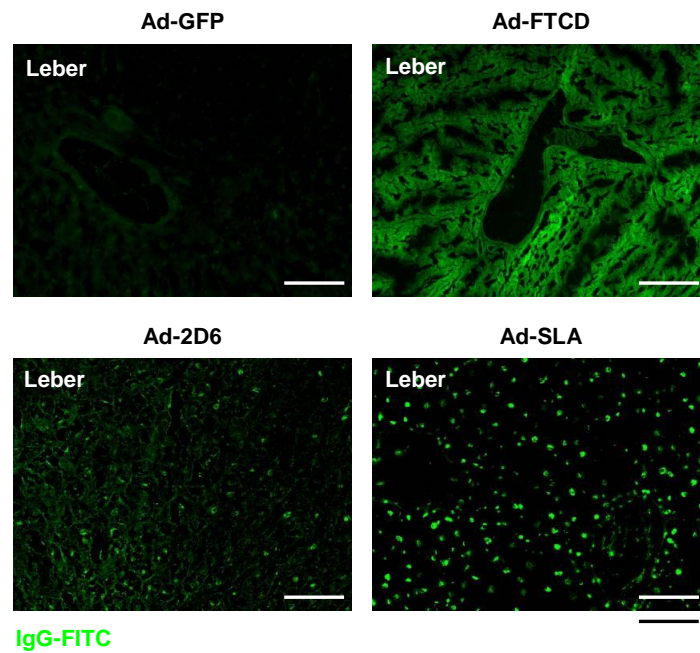


Abbildung 11: Bruch der humoralen Toleranz. Leberschnitte einer Ratte wurden mit Seren von NOD-Mäusen 12 Wochen nach Virustransfer inkubiert und die gebundenen Autoantikörper mit FITC-anti-Maus IgG detektiert. Dargestellt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen mit NOD-Seren aller beschriebenen adenoviralen Vektoren. Messbalken, 100 μ m.

Die Bestimmung der Antigen-spezifität der Autoantikörper in den Seren der behandelten Mäuse erfolgte mit Hilfe eines Western Blots. Dazu wurden, wie schon bei Abbildung 5b beschrieben, HepG2-Zellen mit dem jeweiligen Adenovirus transduziert und die Zelllysate elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Die PVDF-Membranen wurden in Streifen geschnitten, geblockt und mit Seren von verschiedenen Mäusen inkubiert, welche 12 Wochen zuvor mit Ad-GFP, Ad-FTCD, Ad-2D6 oder Ad-SLA infiziert wurden. Die Detektion antigenspezifischer Antikörper erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus Antikörpern. Die Seren von NOD-Mäusen nach der Infektion mit Ad-GFP zeigten keine Reaktion gegen eines der Antigene im Versuch. Alle getesteten Seren von Ad-FTCD-infizierten NOD-Mäusen reagierten mit dem 58kDa großen FTCD-Protein in einer Verdünnung von 1:333. Die Autoantikörper in den Seren von NOD-Mäusen nach Ad-2D6-Infektion bzw. Ad-SLA detektierten die Expression von CYP2D6 mit einer Größe von 54kDa und SLA mit 48kDa (siehe Abbildung 12).

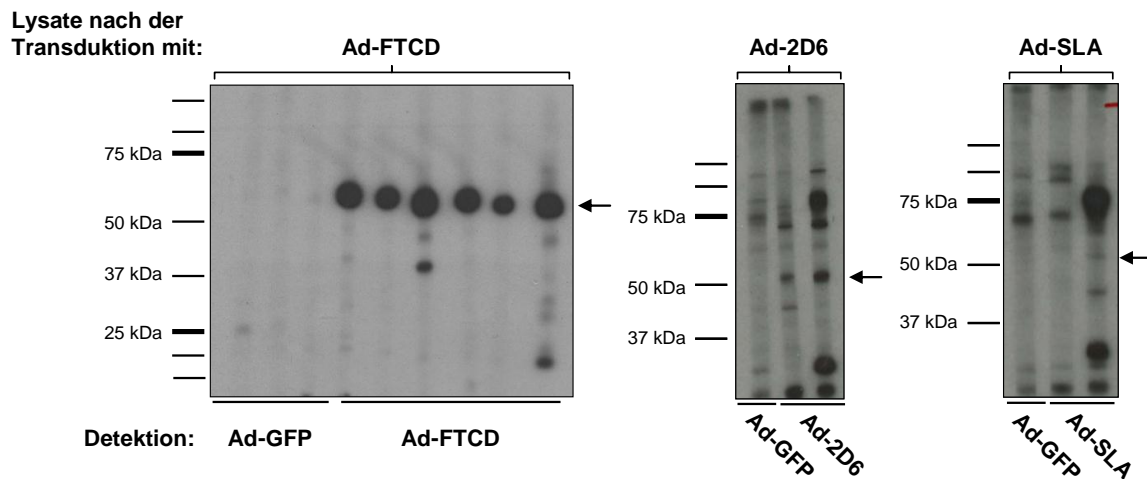


Abbildung 12: Detektion von Autoantikörpern. Lysate von HepG2-Zellen, die mit Ad-FTCD, Ad-2D6 oder Ad-SLA transduziert wurden, wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Autoantikörper in den murinen Seren von NOD-Mäusen 12 Wochen nach der Infektion mit Ad-GFP, Ad-FTCD, Ad-2D6 oder Ad-SLA erfolgte im Western Blot unter Verwendung eines HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörpers und Chemolumineszenz. Diese repräsentativen Aufnahmen zeigen antigenspezifische Antikörper in den Seren von Ad-FTCD, Ad-2D6 und Ad-SLA behandelten Mäusen, aber keine spezifischen Autoantikörper in den Seren Ad-GFP infizierten NOD-Mäuse nach 12 Wochen.

In Zusammenarbeit mit der klinischen Chemie der MHH wurde die absolute Menge an Gammaglobulinen in den Seren der Ad-GFP und Ad-FTCD-infizierten NOD-Mäuse bestimmt. 12 Wochen nach der Infektion mit Ad-FTCD waren die Gammaglobuline mit einer mittleren Konzentration von 3,8mg/ml signifikant erhöht gegenüber den Kontrolltieren mit 2,5mg/ml. (siehe Abbildung 13).

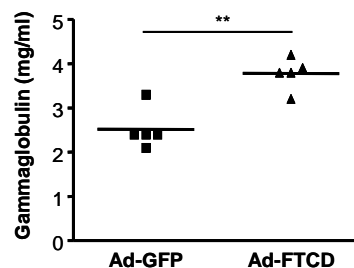


Abbildung 13: Die Gammaglobulin-Konzentration ist in Ad-FTCD behandelten NOD-Mäusen signifikant erhöht. Gammaglobuline wurden mittels Kapillarelektrophorese bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der absoluten Gammaglobulin-Konzentration und die Schwankungen um den Mittelwert. Die Gammaglobulinmenge in Seren von Tieren 12 Wochen nach Infektion mit Ad-FTCD liegt im Mittel bei 3,8mg/ml und in den Kontrolltieren bei 2,5mg/ml. n=5 Tiere pro Experiment. **, Unterschied ist signifikant mit $p \leq 0,001$.

Die bisher gezeigten Daten zeigen, dass die intravenöse Applikation der Adenoviren unabhängig von dem integrierten Antigen zu einer transienten Genexpression und einer akuten, kurzzeitigen Hepatitis mit Transaminasenanstieg sowie minimalen Leberinfiltraten führt. In verschiedenen Mausstämmen konnte zudem ein Bruch der humoralen Toleranz mit den Adenoviren erreicht werden, die verschiedene heterologe Autoantigene kodieren. Dieser

Bruch der humoralen Toleranz wurde in allen drei getesteten Stämmen beobachtet. Allerdings bilden sich ANAs nur in NOD/Ltj Mäusen, was bereits auf eine genetische Prädisposition der ANA-Entwicklung hindeutet.

4 Die Rolle der genetischen Prädisposition und des immunogenen Antigens

In verschiedenen Studien beim Menschen wird die Entstehung der AIH mit spezifischen MHC-Allelen oder Polymorphismen anderer Nicht-MHC Gene in Zusammenhang gebracht (Beland et al. 2009). Um die Assoziation zwischen der Induktion der AIH und einem bestimmten genetischen Hintergrund zu untersuchen, wurden verschiedene Mausstämme mit den bereits genannten Adenoviren infiziert. Die verwendeten Inzuchtstämme unterscheiden sich dabei neben zahlreichen nicht MHC Genen auch in ihrem MHC-Haplotyp. BALB/c haben den Haplotyp H-2^d, FVB/N H-2^q, C57BL/6 H-2^b und NOD/LtJ H-2^{g7} (www.biolegend.com; www.jaxmice.jax.org). NOD-Mäuse wurden schon in anderen Studien eingesetzt, um die genetische Prädisposition von autoimmunen Erkrankungen zu untersuchen, da sie u.a. spontan einen Typ-1 Diabetes entwickeln (Vyse und Todd 1996) und besonders empfänglich für die Induktion einer Experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) sind (Maron et al. 1999).

Über einen Zeitraum von 12 Wochen wurde die Histologie der Lebern nach adenoviraler Infektion beobachtet. In BALB/c, FVB/N oder auch C57BL/6 Tieren wurde keine Hepatitis nach selbst-limitierender Infektion mit den drei Adenoviren Ad-FTCD, Ad-2D6 oder Ad-SLA beobachtet (ohne Abbildung). Nur eine Infektion von NOD-Mäusen mit Ad-FTCD führte über 12 Wochen zu einer starken Anreicherung von Zellinfiltraten in der Leber. Weder Ad-2D6 noch Ad-SLA zeigten einen Bruch der zellulären Toleranz in dem genetisch prädisponierten Mausstamm (siehe Abbildung 14).

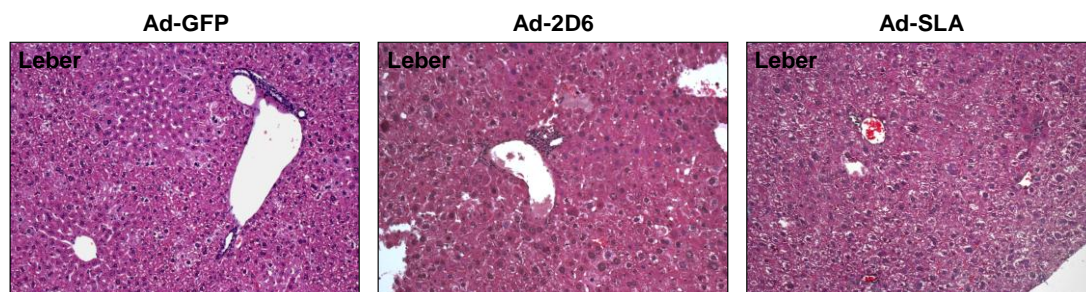


Abbildung 14: Ad-2D6 und Ad-SLA führen nicht zum Bruch der zellulären Toleranz. Repräsentative H&E Färbung von Leber-Paraffinschnitten zweier NOD-Mäuse 12 Wochen nach Injektion von Ad-GFP, Ad-2D6 oder Ad-SLA. Vergrößerung, 10-fach.

In Abbildung 15 sind repräsentative Mikroskopaufnahmen von H&E-Färbungen dargestellt, die den Unterschied zwischen den negativen Kontrolllebern nach Ad-GFP-Behandlung und

der massiven Entzündung nach Infektion mit Ad-FTCD zeigen (siehe Abbildung 15 a und b). Die periportal Leberinfiltrate in den NOD-Tieren nach der Infektion mit Ad-FTCD bestehen zum größten Teil aus Plasmazellen und zeigen eine beginnende Zerstörung der Grenzlamelle und Mottenfraßnekrosen im angrenzenden Parenchym (siehe Abbildung 15 c). Dieses histologische Bild wird auch als *Interface Hepatitis* bezeichnet. Des Weiteren kam es zur Entstehung von lobulären Infiltraten und Einzelzellnekrosen im Leberparenchym (siehe Abbildung 15 d).

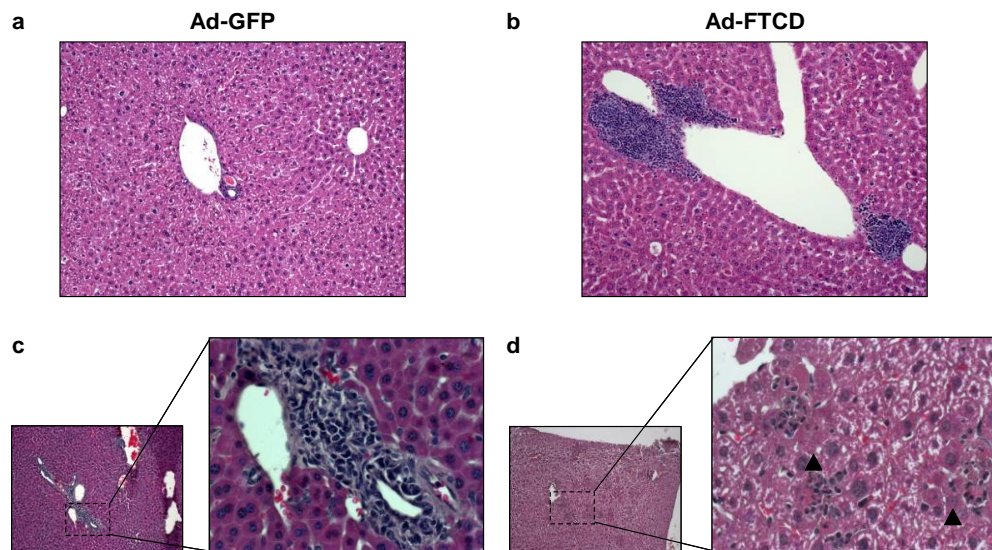


Abbildung 15: Inflammatorische Infiltrate als Zeichen chronischer autoimmuner Hepatitis in Ad-FTCD-infizierten NOD-Mäusen. Repräsentative H&E Färbung von Leber-Paraffinschnitten einer NOD-Maus 12 Wochen nach Adenovirus-Injektion. Ad-FTCD führt zu einer massiven Entzündung im Portalraum (b). Die 20-fache Vergrößerung zeigt den hohen Gehalt an Plasmazellen in den periportal Infiltraten (c) bzw. lobuläre Infiltrate und Einzelzellnekrosen (▲) im Leberparenchym (d). Im Gegensatz dazu sind keine Infiltrate in Lebern von Mäusen nach Behandlung mit Ad-GFP zu erkennen (a). Vergrößerung, 10-fach bzw. 20-fach.

Im Institut für Pathologie der MHH wurden die Gewebeschnitte der einzelnen Gruppen der NOD-Tiere von Herrn Dr. Schlué verblindet begutachtet und nach dem Ishak Scoring bewertet (Longerich et al. 2008). Die mittleren Ishak Scores und die zugehörigen Einzelwerte sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Lebern der Tiere nach Ad-FTCD Infektion zeigen mit Abstand den größten Score (3,5), der zudem noch signifikant höher ist gegenüber den Kontrolltieren und den Tieren mit einer Infektion durch Ad-2D6 oder Ad-SLA sowie NOD-Mäusen ohne Behandlung (Wildtyp) (siehe Abbildung 16a). Eine quantitative Auswertung der Infiltratfläche anhand der mikroskopischen Aufnahmen wird in Abbildung 16b gezeigt. Die mittlere Infiltratfläche 12 Wochen nach Ad-FTCD-Infektion in NOD-Mäusen weist ebenfalls einen signifikanten Unterschied zu den anderen NOD-Gruppen auf und bestätigt damit die Bewertung mittels Ishak Scoring.

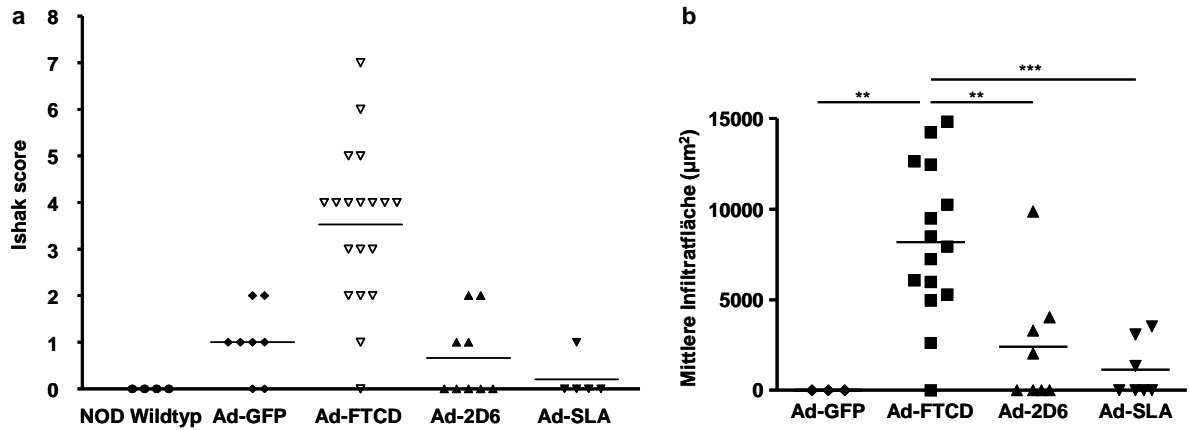


Abbildung 16: Die H&E Färbungen der Leberschnitte wurden histologisch bewertet nach dem Ishak Scoring System für chronische Hepatitis oder durch Bestimmung der Infiltratgröße. a) In dieser Grafik sind die Mittelwerte der Ishak Scores aller Gruppen (NOD Wildtyp bzw. Ad-GFP, Ad-FTCD, Ad-2D6 oder Ad-SLA behandelte NOD-Mäuse 12 Wochen nach Adenovirustransfer) sowie die Einzelwerte angegeben. Der mittlere Ishak Score der Ad-FTCD infizierten Mäuse liegt bei 3,5 und ist damit hoch signifikant ($p \leq 0,0005$) verschieden zu den Werten der anderen Gruppen (Wildtyp=0; Ad-GFP=1,0; Ad-2D6=0,7; Ad-SLA=0,2). b) Quantitative Bestimmung der autoimmunen Hepatitis durch Messung der Infiltratfläche. Die mittlere Infiltratfläche ist signifikant höher in Ad-FTCD infizierten Tieren ($8165 \mu\text{m}^2$) im Vergleich mit den anderen Gruppen (Ad-GFP= $0 \mu\text{m}^2$; Ad-2D6= $2403 \mu\text{m}^2$; Ad-SLA= $1138 \mu\text{m}^2$). $n=3-19$ Tiere pro Experiment. **, Unterschied ist signifikant mit $p \leq 0,005$; ***, $p \leq 0,0005$.

Bei der AIH im Menschen ist eine geschlechtliche Assoziation mit der Erkrankung bekannt, d.h. Frauen und Mädchen sind häufiger betroffen als Männer. Dieser Aspekt der Ätiologie einer AIH wurde auch im vorliegenden Mausmodell berücksichtigt und untersucht. Je eine Gruppe weiblicher und männlicher NOD-Mäuse wurden mit Ad-FTCD behandelt und die Leberhistologie 12 Wochen nach dem Transfer bewertet. Die Ishak Scores der Männchen sind mit einem Mittelwert von 3,9 deutlich über dem Mittel der Weibchen (2,3). Der Unterschied ist mit $p \leq 0,05$ signifikant (siehe Abbildung 17).

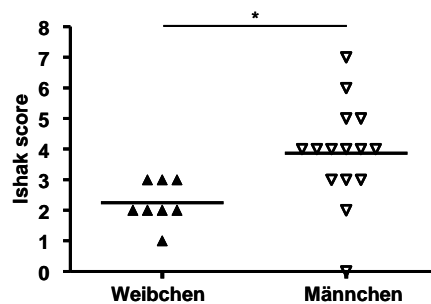


Abbildung 17: Die Empfänglichkeit für die Induktion der chronischen autoimmunen Hepatitis durch Ad-FTCD ist geschlechtsabhängig. Der Ishak Score von männlichen NOD-Mäusen 12 Wochen nach Gabe von Ad-FTCD liegt im Mittel bei 3,9, während der gemittelte Ishak Score der weiblichen Tiere bei 2,3 liegt. $n=8-16$ Tiere pro Experiment. *, Unterschied ist signifikant mit $p \leq 0,05$.

Die NOD-Maus, ist ein bekanntes Mausmodell zur Untersuchung der genetischen Prädisposition bei der Entwicklung einer autoimmunen Erkrankung. 60-80% der weiblichen Tiere entwickeln einen spontanen autoimmunen Diabetes mellitus Typ-1 (Anderson et al. 2005). Die NOD-Mäuse im vorliegenden Modell entwickelten unabhängig vom verwendeten Adenovirus viel später einen Diabetes mit Blutzuckerwerten oberhalb von 200mg/dl als der Wildtyp und es wurden nur knapp 50% aller Mäuse diabetisch im Vergleich zu 75% der Wildtypmäuse (siehe Abbildung 18).

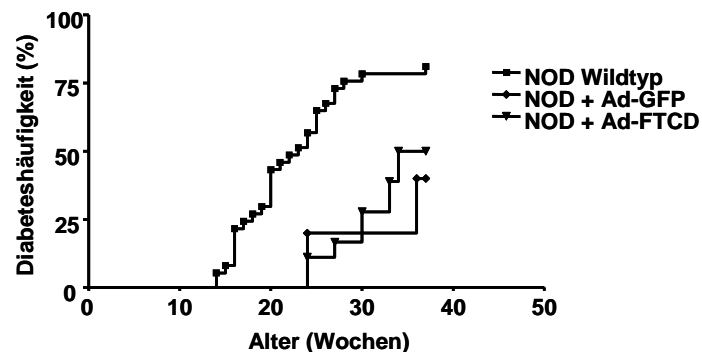


Abbildung 18: Diabeteshäufigkeit nach Behandlung mit Adenoviren. Diese Überlebenskurve zeigt die Diabeteshäufigkeit in der jeweils untersuchten Gruppe mit zunehmendem Alter der NOD-Mäuse. 75% aller Wildtyp-NOD entwickeln zwischen der 14. und 38. Woche einen spontanen Diabetes mellitus Typ-1 mit Blutzuckerwerten oberhalb von 200mg/dl. Im Alter von 6-10 Wochen wurden die Adenoviren appliziert. Der Eintritt eines Diabetes verschiebt sich um knapp 10 Wochen und betrifft nur 48-50% der untersuchten Tiere der Ad-GFP oder Ad-FTCD infizierten Tiere. Anzahl der Tiere pro Gruppe: Wildtyp, n=19; Ad-GFP, n=10; Ad-FTCD, n=18.

5 Die Ad-FTCD induzierte AIH ist chronisch und führt zu Fibrose

Patienten mit einer chronischen AIH entwickeln neben plasmazellreichen Infiltraten und der *Interface Hepatitis* auch periportale Fibrosen. Dabei handelt es sich um die krankhafte Vermehrung des Bindegewebes der Leber d.h. eine starke Anreicherung retikulärer Fasern, welches zur Abschnürung von Hepatozyten führen kann. In 40-80% aller unbehandelten Patienten und bei einem Teil der Patienten mit Steroidtherapie kann sich daraus eine Leberzirrhose entwickeln und es kommt zum Organversagen (Oo et al. 2010).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines chronischen Mausmodells der AIH und daher sollte auch das Fortschreiten der induzierten AIH beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde einige Wochen nach der Feststellung der AIH-Induktion durch Ad-FTCD eine weitere Gruppe von NOD-Mäusen analysiert, um den späteren Status der Entzündung der Leber festzustellen. Die H&E-Färbungen der Lebern von NOD-Mäusen 28 Wochen nach dem adenoviralen Transfer wurden wie schon die Lebern nach 12 Wochen ebenfalls unabhängig und doppelt blind bewertet und die Ishak Scores bestimmt. Abbildung 19a zeigt eine repräsentative Färbung der Leber zum späteren Untersuchungszeitpunkt. Die chronische autoimmune Hepatitis ist 28 Wochen nach dem Transfer von Ad-FTCD deutlich stärker als

nach 12 Wochen. Die pathologische Bewertung durch Ishak Scoring unterstützt diese Aussage. Der Mittelwert der Ishak Scores aus der Gruppe von NOD-Mäusen 28 Wochen nach der Infektion mit Ad-FTCD ist stark erhöht zu dem Score 12 Wochen nach der Induktion der chronischen AIH (siehe Abbildung 19b).

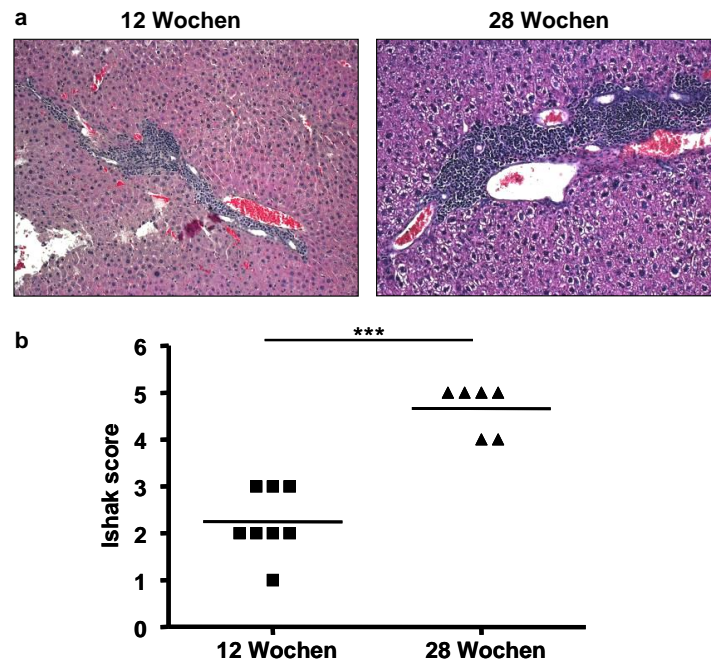


Abbildung 19: Die chronische Hepatitis ist 28 Wochen nach Behandlung der NOD-Mäuse mit Ad-FTCD noch ausgeprägter. a) Die repräsentativen H&E Färbungen von Leberschnitten zeigen große periportale Infiltrate in den Mäusen, die Ad-FTCD erhalten haben. Vergrößerung, 10-fach. b) Der Ishak Score der NOD-Mäuse die Ad-FTCD erhalten haben, ist 28 Wochen nach Behandlung signifikant höher (4,7) als nach 12 Wochen (2,3). n=6-8 Tiere pro Experiment. ***, Unterschied ist signifikant mit $p \leq 0,0005$.

Mittels Versilberung nach Gomori können retikuläre Fasern in Geweben sichtbar gemacht werden. Die gefärbten Lebern einer Kontrolle 12 Wochen nach Ad-GFP-Infektion bzw. nach der Gabe von Ad-FTCD wurden mit den Lebern 30 Wochen nach der Injektion von Ad-FTCD verglichen. Keine bzw. nur wenige retikuläre Fasern sind in den Lebern von Kontrolltieren zu erkennen. Eine minimale Vermehrung von Kollagenfasern ist dabei schon zum Zeitpunkt 12 Wochen nach der Applikation von Ad-FTCD erkennbar. Nach fast 30 Wochen zeichnet sich eine beginnende Fibrose mit einer periportalen Anreicherung von retikulären Fasern ab, welche zur Ablösung einzelner Hepatozyten führt (siehe Abbildung 20).

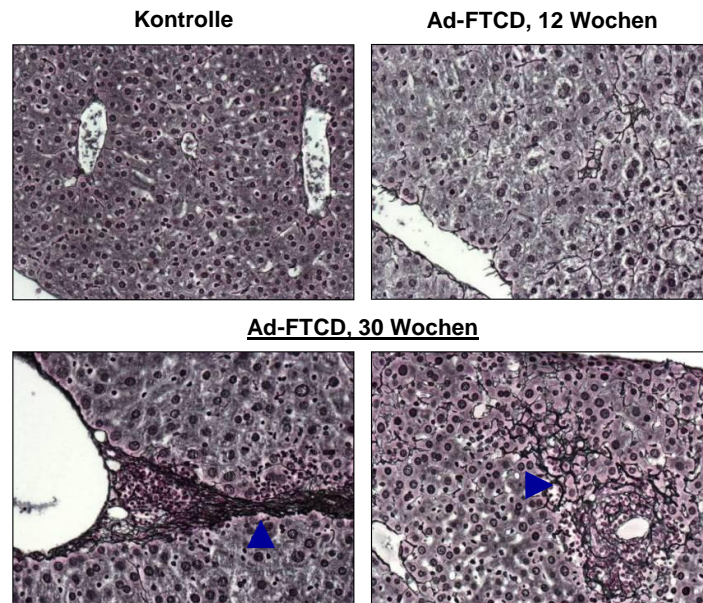


Abbildung 20: Die Lebern von Mäusen ~30 Wochen nach i.v. Injektion von Ad-FTCD zeigen Zeichen einer beginnenden Fibrose und eine periportale Anreicherung von retikulären Fasern (*), welche zur Ablösung einzelner Hepatozyten führen. Dargestellt sind repräsentative Bilder von Leber-Paraffinschnitten mit Silberfärbung nach Gomori eines Kontrolltieres und von NOD-Mäusen 12 oder 30 Wochen nach Gabe von Ad-FTCD. Vergrößerung, 10-fach.

Zusammengefasst konnte in NOD-Mäusen durch Ad-FTCD Infektion neben der humoralen auch die zelluläre Toleranz gegenüber dem Autoantigen gebrochen werden. Dieses zeigte sich im histologischen Bild mit starken periportalen Leukozyteninfiltraten und lobulären Einzelzellnekrosen sowie einer beginnenden Fibrose.

6 Die Rolle des Gefahrensignals bei der Induktion der AIH

In dem neuen Modell einer chronischen autoimmunen Hepatitis wird die Autoimmunerkrankung durch die Kombination aus einem heterologen Antigen mit dem Adenovirus als Gefahrensignal induziert. Ein Experiment, bei dem die virale Komponente fehlt, soll zeigen, ob das Gefahrensignal in diesem Modell von Bedeutung ist. Hierzu wurde eine Methode angewandt bei dem ein Expressionsvektor, welcher die kodierende Sequenz von humanem FTCD enthält, in die Hepatozyten eingebracht wird, um den Weg der Adenoviren zu imitieren. Die so genannte hydrodynamische Transfektion wurde verwendet, bei der ein großes Volumen in kürzester Zeit i.v. verabreicht wird um so zu einem Überdruck in den Lebervenen zu führen. Die längere Verweilzeit des enthaltenden Plasmides und der ausgeübte Druck führen dabei zu einer Transfektion der Hepatozyten (Liu et al. 1999; Zhang et al. 1999). Die Transfektionseffizienz wurde mit einem eGFP-kodierenden Kontrollplasmid getestet. Die i.v. Applikation von pIRES-eGFP führt zu einer leberspezifischen Genexpression, während andere gut durchblutete Organe wie Niere und Lunge keine GFP-Expression aufweisen (siehe Abbildung 21).

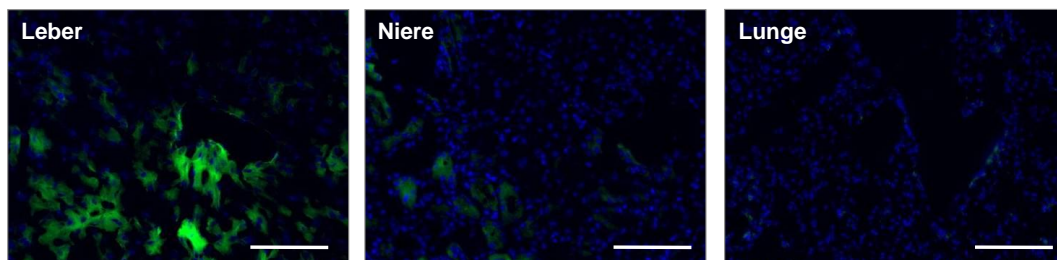


Abbildung 21: Die hydrodynamische Transfektion führt zu einer leberspezifischen Expression. Ein Expressionsvektor, der für das humane FTCD kodiert, aber keine viralen Komponenten enthält, wurde via hydrodynamischer Transfektion in die NOD-Mäuse transferiert. Dargestellt sind Kryoschnitte von muriner Leber, Niere oder Lunge 8 Tage nach hydrodynamischer Transfektion mit pIRES-eGFP. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Messbalken, 100µm.

Parallel wurde eine weitere Gruppe von NOD-Mäusen mit pShuttle-CMV-hFTCD hydrodynamisch transfiziert. Innerhalb von 12 Wochen entwickelte keines der Tiere eine Hepatitis. Ohne die Anwesenheit eines Gefahrensignals konnten weder leberspezifische Autoantikörper im Serum (ohne Abbildung) noch Entzündungsinfiltrate in der Leber festgestellt werden (siehe Abbildung 22).

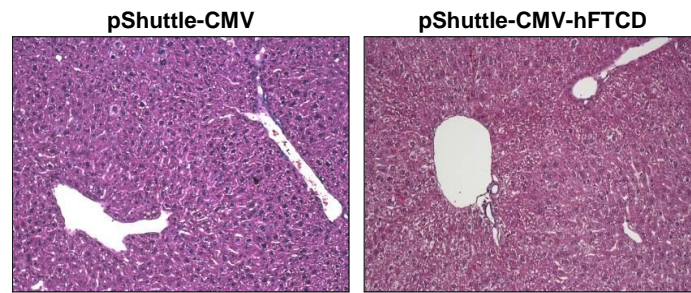


Abbildung 22: Induktion der autoimmunen Hepatitis ist abhängig vom Gefahrensignal (*danger signal*). Diese repräsentativen H&E Färbungen zeigen die Leber einer NOD-Maus 12 Wochen nach dem hydrodynamischen Transfer von pShuttle-CMV bzw. pShuttle-CMV-hFTCD. Vergrößerung, 10-fach.

7 Charakterisierung der intrahepatischen Lymphozyten

Die Entwicklung einer chronischen autoimmunen Hepatitis ist abhängig von immunpathologischen Ereignissen. Eine Beteiligung von CD4+ und CD8+T-Zellen, sowie B- oder auch NK-Zellen werden in der Literatur beschrieben. Um die Immunpathologie in dem neuen Modell der chronischen autoimmunen Hepatitis zu klären, wurden Immunfluoreszenzfärbungen und *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analysen durchgeführt. Abbildung 23 zeigt repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der Milz und Leber einer NOD-Maus, die hinsichtlich Histologie und Autoantikörpern 12 Wochen nach der Infektion mit Ad-FTCD eine chronische Hepatitis aufwies. Die in dieser Färbung eingesetzten Antikörper färben in der Milz die weiße Pulpa mit den B-Zellfollikeln (B220 positive Zellen) und die T-Zellareale um die Arteriolen herum (CD4 und CD8 positive Zellen). In der Leber ist ein periportales Infiltrat dargestellt, das sowohl aus B-Zellen als auch aus vielen CD4+ und wenigen CD8+T-Zellen besteht.

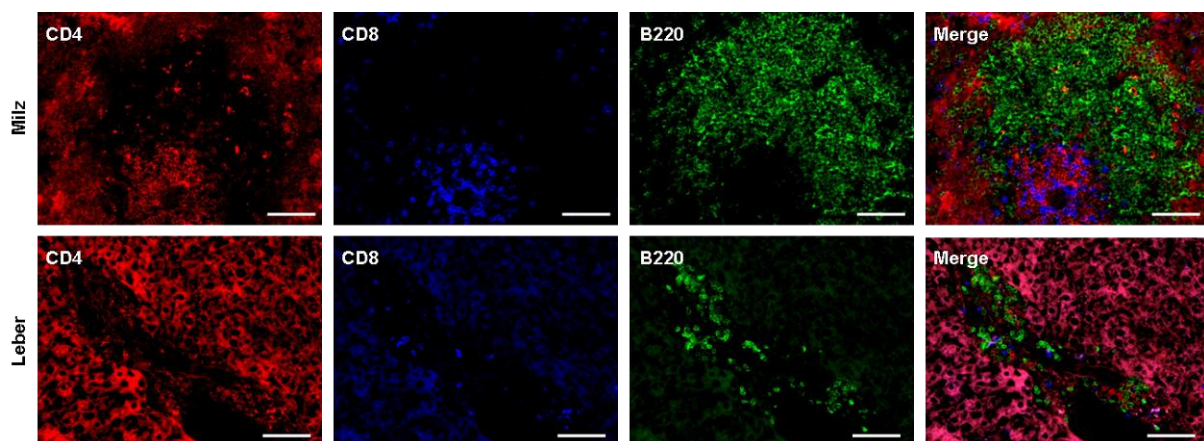


Abbildung 23: Leberinfiltrate enthalten mehr CD4+T-Zellen und B-Zellen als CD8+T-Zellen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Färbungen von Gefrierschnitten aus Milz und Leber einer NOD-Maus 12 Wochen nach der Injektion von Ad-FTCD. Die Organe wurden kryokonserviert, geschnitten und mit folgenden Antikörper gefärbt: CD4-Alexa Fluor®488, CD8-Cy3, B220-Cy5. Der verwendete anti-CD4 Antikörper reagiert außerdem in Gefrierschnitten mit Hepatozyten und Sinusoiden kreuz. Messbalken, 100µm.

Tregs spielen für die periphere Toleranz eine wichtige Rolle. Inwiefern Tregs bei der Ausbildung der AIH von Bedeutung sind, soll im folgenden Experiment untersucht werden. In Abbildung 24 sind Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt, in denen neben den CD4+ und CD8+T-Zellen die Tregs mit Hilfe eines Foxp3-Antikörpers in Milz und Lebern von NOD-Mäusen gefärbt wurden. Die repräsentativen Aufnahmen zeigen zum einen die Milz, mit periarteriolen Lymphozytenbereich, in dem eine gleichmäßige Verteilung der Tregs zu sehen ist und zum anderen die Leber einer NOD-Maus mit induzierter chronischer AIH. Im dargestellten Leukozyteninfiltrat ist die intrazelluläre Färbung von Foxp3 in einigen CD4+T-Zellen deutlich zu erkennen. Der Anteil an Tregs im Infiltrat ist sehr gering.

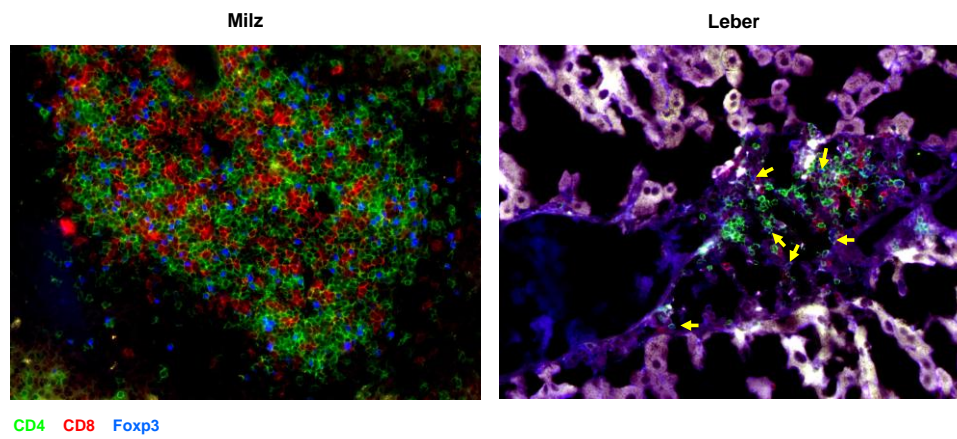


Abbildung 24: Leberinfiltrate enthalten CD4+Foxp3+T-Zellen (gelbe Pfeile). Dargestellt sind Immunofluoreszenz-Färbungen von Gefrierschnitten aus Milz und Leber einer NOD-Maus 12 Wochen nach der Injektion von Ad-FTCD. Die Organe wurden kryokonserviert, geschnitten und mit folgenden Antikörper gefärbt: CD4-Alexa Fluor®488, CD8-Cy3, Foxp3-Alexa Fluor®647.

In Ergänzung zu den Immunfluoreszenzfärbungen wurden die intrahepatischen Lymphozyten (IHL) isoliert, fluoreszenzmarkiert und anschließend die verschiedenen Populationen durchflußzytometrisch analysiert. Verglichen wurden die Populationen in den Kontrolltieren (Ad-GFP) mit denen der Ad-FTCD-behandelten Tiere 12 Wochen nach dem Virustransfer. In Abbildung 25 sind die FACS-Plots des ersten von drei Färbeansätzen für zwei NOD-Mäuse exemplarisch dargestellt. Die CD4+ und CD8+T-Zellpopulationen sind in den IHL der beiden Tiere gleich stark vertreten (siehe Abbildung 25 links). Die CD4+T-Zellen wurden in einem weiteren FACS Plot getrennt gegen Foxp3 aufgetragen (siehe Abbildung 25 rechts). Die Population der Tregs ist mit 13% nach der Induktion der AIH deutlich höher als in der Kontrollmaus, bei der der Anteil von Tregs bei 11% liegt. In der Milz ist der Anteil von Foxp3+CD4+T-Zellen in beiden Mäusen unverändert (ohne Abbildung).

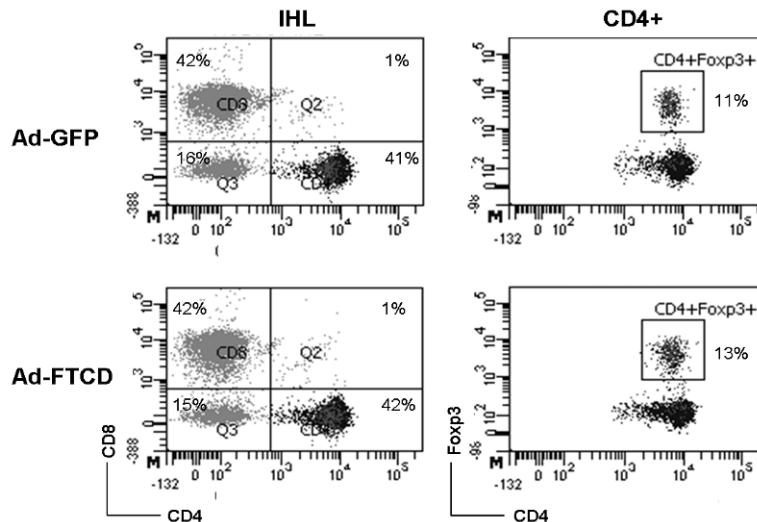


Abbildung 25: Der Anteil von Tregs an der CD4+T-Zellpopulation ist nach Infektion mit Ad-FTCD erhöht. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots nach Färbung von IHL einer Ad-GFP und einer Ad-FTCD-behandelten NOD-Maus 12 Wochen nach der i.v. Injektion. Folgende Antikörper wurden eingesetzt: CD4-Pacific Blue, CD8-Percp-Cy5.5, Foxp3-PE, 42% aller IHL der Ad-GFP oder Ad-FTCD-Maus sind CD8+T-Zellen, 41% bzw. 42% aller IHL der Ad-GFP oder Ad-FTCD-Maus sind CD4+T-Zellen. Der Anteil an Foxp3+Tregs in dieser Zellpopulation liegt bei 11% in dem Kontrolltier bzw. 13% im AIH-induzierten Tier.

Im zweiten Färbeprotokoll für die Durchflusszytometrie wurde der Anteil an NK und NKT-Zellen in den IHL untersucht. Ein Antikörper gegen NKG2D wurde zur Differenzierung zwischen diesen Zellpopulationen eingesetzt. NKG2D ist ein NK-Zellrezeptor der sowohl von NK als auch von NKT-Zellen exprimiert wird. NKT-Zellen sind auf der Stufe zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem und exprimieren zusätzlich zu den bekannten NK-Zellmarkern noch TCR und CD3 auf der Zelloberfläche, d.h. CD3 und NKG2D doppelpositive Zellen sind NKT-Zellen. Einige FACS-Plots der Färbung sind in Abbildung 26 dargestellt. Der Anteil von NK- und NKT-Zellen an den IHL ist in der Maus nach AIH-Induktion 10% respektive 25% und in dem Kontrolltier 7% bzw. 18% (siehe Abbildung 26).

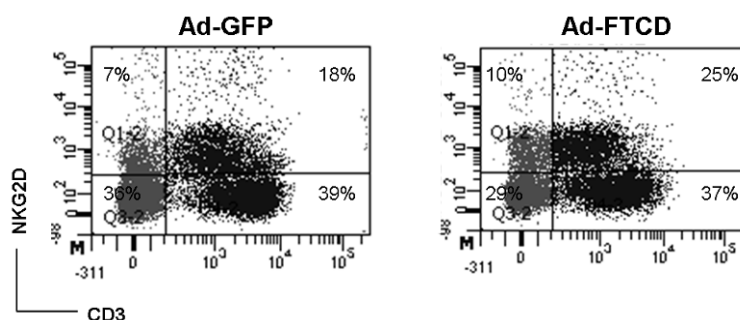


Abbildung 26: Der Anteil von NKT-Zellen an den IHL ist nach Infektion mit Ad-FTCD leicht erhöht. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots nach Färbung von IHL einer Ad-GFP und einer Ad-FTCD-behandelten NOD-Maus 12 Wochen nach der i.v. Injektion. Folgende Antikörper wurden eingesetzt: CD3-FITC, NKG2D-PE. 7% bzw. 10% aller IHL der Ad-GFP oder Ad-FTCD-Maus sind NK-Zellen. 18% bzw. 25% aller IHL der Ad-GFP oder Ad-FTCD-Maus sind NKT-Zellen.

Die Leber zeigt relativ einen sehr grossen Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die Rolle von $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der AIH ist noch weitgehend unbekannt. In einer weiteren FACS-Färbung wurde das Verhältnis zwischen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht. Der Anteil an $\alpha\beta$ -T-Zellen in der Leber ist zwischen den beiden repräsentativen untersuchten Tieren 12 Wochen nach der Virusbehandlung unverändert. 75% aller IHL in dem repräsentativen Kontrolltier bzw. 77% im AIH-induzierten Tier sind CD3+ $\alpha\beta$ TCR+T-Zellen und damit ist deren Anteil an den IHL unverändert. 2,9% aller CD3+T-Zellen in der Maus nach Ad-GFP Infektion sind positiv für den $\gamma\delta$ -TCR (siehe Abbildung 27). In der Ad-FTCD-behandelten Maus ist der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an den CD3+T-Zellen 3,6%.

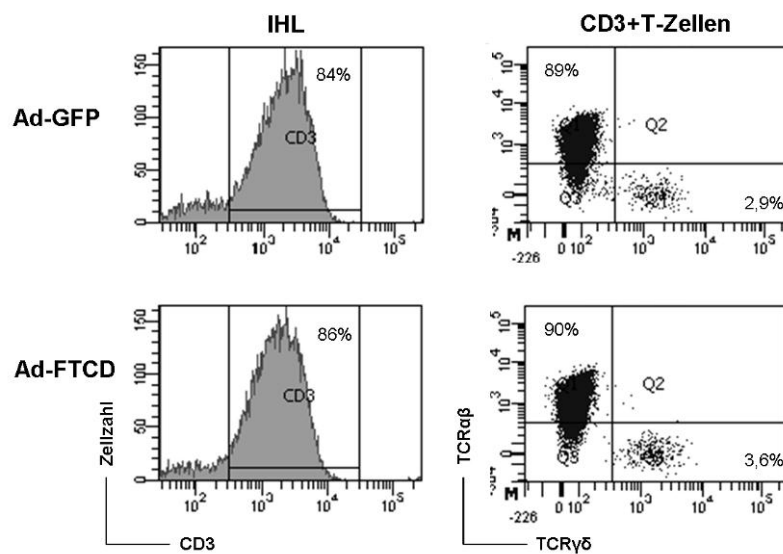


Abbildung 27: Der Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen an den IHL ist nach Infektion mit Ad-FTCD unverändert. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots nach Färbung von IHL einer Ad-GFP und einer Ad-FTCD-behandelten NOD-Maus 12 Wochen nach der i.v. Injektion. Folgende Antikörper wurden eingesetzt: CD3-APC, TCR β -APC-Cy7, TCR γ -PE. Der Anteil an $\alpha\beta$ -T-Zellen der Leber beträgt 89% der CD3+T-Zellen in dem Kontrolltier bzw. 90% der CD3+T-Zellen im AIH-induzierten Tier. 2,9% aller CD3+T-Zellen von Ad-GFP- bzw. 3,6% der CD3+T-Zellen von Ad-FTCD-Mäusen sind $\gamma\delta$ -T-Zellen. Gruppengröße: Ad-GFP, n=5; Ad-FTCD, n=9.

Die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellpopulationen in der Leber in allen Tieren der beiden untersuchten Gruppen wurden gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt. Die graphische Übersicht ist in Abbildung 28 dargestellt. Verglichen wurden: CD3+, CD4+ und CD8+T-Zellen sowie die gesamten $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen, der Anteil der NK- und NKT-Zellen sowie CD4+Foxp3+Tregs. Eine statistische Analyse der einzelnen Populationen erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test für zwei unabhängige Stichproben. Die Mäuse mit induzierter AIH haben eine signifikante Erhöhung der Tregs und der NK-Zellen sowie eine geringe aber nicht signifikante Erhöhung der NKT-Zellen im Vergleich mit den Kontrolltieren (siehe Abbildung 28). Der Anteil von CD3+, CD4+ und CD8+T-Zellen sowie von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -

T-Zellen an den IHL zwischen Ad-GFP und Ad-FTCD infizierten NOD-Mäusen ist unverändert. Die Gesamtzellzahl nach Isolation der IHL war in allen Tieren gleich.

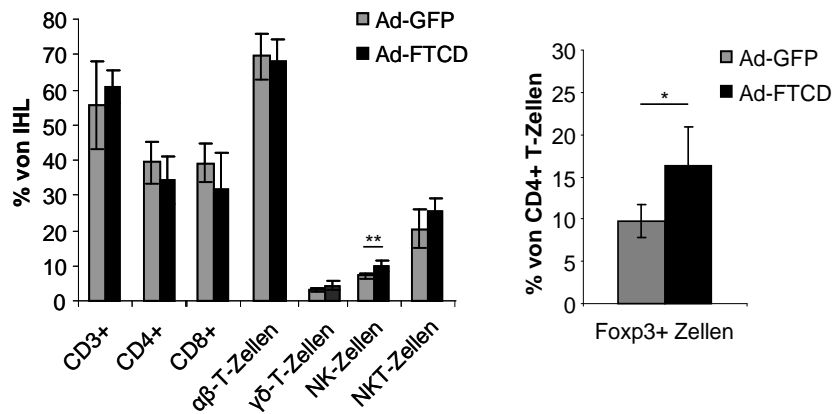


Abbildung 28: Die Tiere mit induzierter chronischer Hepatitis haben eine veränderte Zusammensetzung der IHL. Die Charakterisierung der IHL erfolgte via Durchflusszytometrie und anschließender Quantifizierung verschiedener Lymphozytenpopulationen. Im linken Diagramm sind die mittleren prozentualen Anteile der einzelnen Populationen an IHL (± SD) in den NOD-Mäusen 12 Wochen nach Ad-GFP oder Ad-FTCD-Injektion dargestellt. Das rechte Diagramm zeigt den Anteil an Tregs in der CD4+T-Zellpopulation.

Mittelwerte der Ad-GFP-Gruppe: CD3+=56%; CD4+=39%; CD8+=39%; αβ-T-Zellen=68%; γδ-T-Zellen=3%; NK-Zellen=7%; NKT-Zellen=20%; CD4+Foxp3+=10%.

Mittelwerte der Ad-FTCD-Gruppe: CD3+=61%; CD4+=34%; CD8+=32%; αβ-T-Zellen=67%; γδ-T-Zellen=4%; NK-Zellen=10%; NKT-Zellen=25%; CD4+Foxp3+=16%. Anzahl pro Gruppe: Ad-GFP, n=5; Ad-FTCD, n=9. **, Unterschied ist signifikant mit p≤0,005; *, p≤0,05.

In den oben beschriebenen Färbungen für Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass die Leberinfiltrate von NOD-Tieren nach AIH-Induktion mit Ad-FTCD einen hohen Anteil an CD4+T-Zellen und B-Zellen sowie etwas weniger CD8+T-Zellen und nur vereinzelte Tregs aufweisen. Nach der Induktion der AIH war die zelluläre Zusammensetzung der gesamten IHL nur moderat verändert mit einem signifikanten Anstieg der Tregs und NK-Zellen.

8 Adoptiver Transfer der induzierten AIH

Anhand der gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen liegt eine Beteiligung der T-Zellen an der Entstehung der induzierten chronischen AIH nahe. Die Diskrepanz zwischen der Ausbildung von Autoantikörpern in Ad-2D6 oder Ad-SLA-behandelten Mäusen und fehlender Entstehung einer chronischen zellulären Immunantwort in der Leber im Vergleich mit Ad-FTCD-Tieren sprechen ebenfalls dafür.

Im nächsten Experiment sollte daher die adoptive Transferierbarkeit der induzierten AIH auf immundefiziente Tiere untersucht werden. Zunächst wurden 1×10^{10} ifu Ad-FTCD in NOD-Mäuse i.v. gespritzt und die Leukozyten aus der Milz und den Lymphknoten bzw. Serum nach 12 Wochen isoliert. 100 μ l des Serums wurden unverdünnt in NOD SCID-Mäuse i.v. injiziert. 12 Wochen später konnten keine Leberinfiltrate oder Autoantikörper in den Empfängertieren festgestellt werden (ohne Abbildung). Ein Teil der Milzzellen wurde mit CD4- oder CD8-spezifischen Antikörpern gefärbt und an magnetische Partikel gekoppelt um anschließend über *Magnetic activated cell sorting* (MACS)-Säulen aufgetrennt zu werden. 2 bis 6×10^6 CD4+ oder CD8+T-Zellen sowie Gesamtzellen ohne Sortierung wurden vor oder nach 48-stündiger Stimulation mit ConA in weitere NOD SCID-Mäuse transferiert. Die Auswertung der Transfereffizienz erfolgte 4 bis 12 Wochen später (siehe Schema in Abbildung 29).

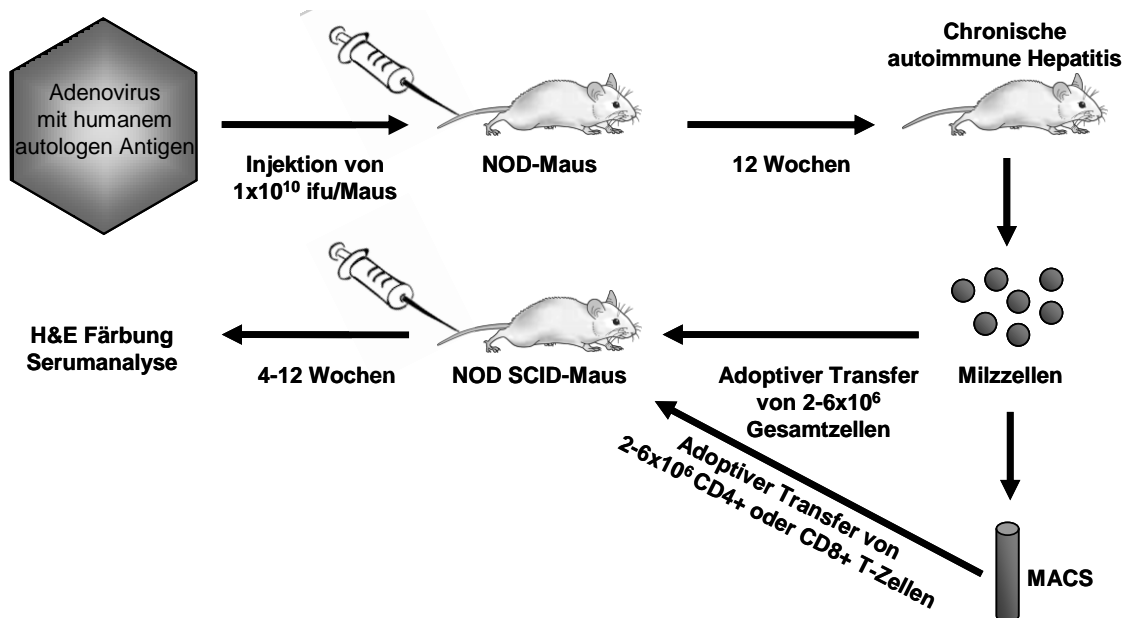


Abbildung 29: Schematische Darstellung des adoptiven Transfers der chronischen autoimmunen Hepatitis in NOD-SCID Mäuse. 12 Wochen nach der Injektion von 1×10^{10} ifu Ad-FTCD in NOD-Mäuse wurden die Milzzellen isoliert. Ein Teil der NOD SCID-Mäuse erhielt 2-6 $\times 10^6$ Milzzellen i.v. appliziert. Eine andere Gruppe erhielt die gleiche Menge an Zellen, welche allerdings zuvor nach CD4+ oder CD8+T-Zellen sortiert wurden. Einige Wochen nach dem Transfer wurden die Lebern und Seren der Tiere analysiert.

Ein Transfer der zellulären Immunität gegen Leberparenchym, d.h. chronische periportale Infiltrate mit hepatozellulären Nekrosen, wurde nur mit naiven oder aktivierten CD4+T-Zellen erreicht (siehe Abbildung 30). Weder aktivierte noch naive CD8+T-Zellen oder nicht sortierte naive Milzzellen waren in der Lage, die induzierte chronische AIH auf immundefiziente NOD SCID-Mäuse zu übertragen. Außerdem konnte auch in Transferexperimente mit naiven oder aktivierten IHL die chronische AIH des Spenders nicht auf NOD SCID übertragen werden.

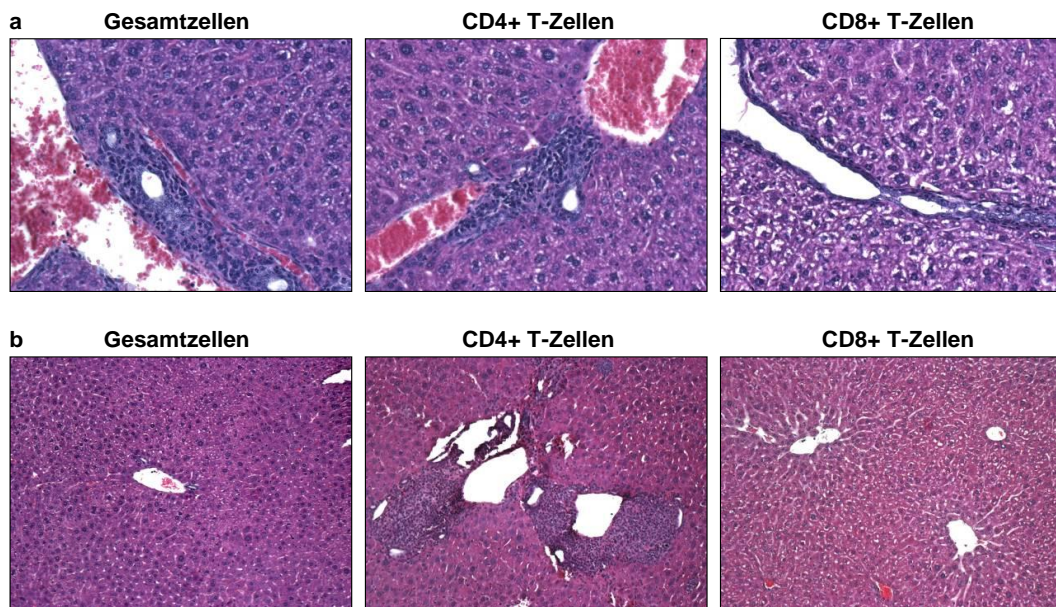


Abbildung 30: Die mittels Ad-FTCD induzierte Inflammation in der Leber ist T-Zell-abhängig und kann adoptiv transferiert werden. a) Adoptiver Transfer von $4-6 \times 10^6$ Con-A stimulierten Milzzellen aus NOD-Mäusen mit chronischer autoimmuner Hepatitis in immundefiziente NOD SCID-Mäuse. Repräsentative H&E Färbung von Leberschnitten 4 Wochen nach dem adoptiven Transfer. Vergrößerung, 20-fach. b) Adoptiver Transfer von 4×10^6 naiven Milzzellen aus NOD-Mäusen mit chronischer Hepatitis in immundefiziente NOD SCID-Mäuse. Repräsentative H&E Färbung von Leberschnitten 12 Wochen nach dem adoptiven Transfer. Vergrößerung, 10-fach.

9 Antigenpezifität der AIH-vermittelnden T-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse inklusive der adoptiven Transferexperimente zeigen, dass CD4⁺T-Zellen bei der Entstehung der chronischen AIH im vorliegenden Modell wichtig sind. Die Antigenpezifität der aktivierten T-Zellen in den NOD-Tieren nach AIH-Induktion mit Ad-FTCD und den Kontrolltieren wurde mit Hilfe eines ELISPOT Assay untersucht. Dabei wird die IFN- γ Produktion einzelner T-Zellen, nach deren Aktivierung durch spezifische TCR-MHC-Peptid-Komplexbildung oder nach polyspezifischer Aktivierung, mit Hilfe von IFN- γ Antikörpern nachgewiesen und damit die Zahl aktivierter T-Zellen bestimmt.

Für die Analyse der FTCD-spezifischen Immunantworten wurde zunächst rekombinantes murines FTCD Protein mit Hilfe des pET-Vektorsystems hergestellt. Abbildung 31 zeigt ein Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel nach erfolgreicher Elution des rekombinanten Proteins. Mehrere Eluate (Eluate 2-4) wurden vereinigt und dialysiert. Das hergestellte Protein wurde anschließend im ELISPOT eingesetzt, wo es von APC aus der Milz prozessiert und mittels MHC-II auf deren Oberfläche den Lymphozyten präsentiert wird.

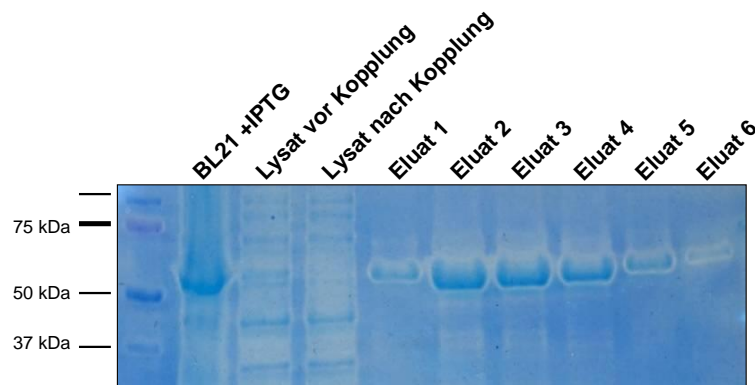


Abbildung 31: Herstellung des rekombinanten murinen FTCD Proteins unter Verwendung des pET-Vektor Systems. Die Qualität des aufgereinigten Proteins wurde mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Aufgetragen wurde zum Einen ein Aliquot der BL21 *E.coli* Zellen nach Transformation mit pET-mFTCD, anschließender Amplifikation und Stimulation mit IPTG. Nach Pelletierung der Bakterienkultur wurden die Bakterien lysiert. Das Lysat vor und nach der Kopplung an Ni-NTA Sepharose ist ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt worden. Nach mehrmaligem Waschen der gekoppelten Sepharose über eine Säule wurde das His-markierte Protein eluiert. Die einzelnen Eluate wurden auf das Gel aufgetragen.

Für den IFN- γ -ELISPOT wurden Milzzellen von NOD-Mäusen 14 Tage nach dem Transfer von Ad-GFP oder Ad-FTCD isoliert und 4×10^5 Zellen mit dem rekombinanten FTCD oder Ovalbumin (OVA) als Kontrolle 20 Stunden lang auf den vorbereiteten Platten inkubiert. Zur Verifizierung des Tests wurden die Zellen außerdem mit ConA polyspezifisch aktiviert. In Abbildung 32 sind die Mittelwerte der Anzahl IFN- γ produzierenden Zellen aus 2 unabhängigen Experimenten mit $n=4$ nach Abzug der nicht aktivierten Negativkontrolle angegeben. Die Anzahl IFN- γ -produzierenden Milzzellen nach Stimulation mit FTCD ist in Ad-FTCD infizierten Tieren deutlich höher als in den Kontrolltieren. Nach polyspezifischer

Aktivierung und Stimulation mit dem Kontrollprotein OVA war die Anzahl IFN- γ -produzierender Milzzellen in beiden Kontrollgruppen gleich groß bzw. gering.

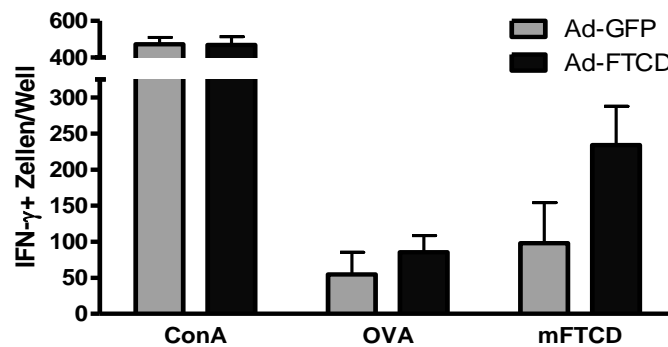


Abbildung 32: Ad-FTCD führt zu einer T-Zell-vermittelten Inflammation der Leber. Für diesen IFN- γ -ELISPOT wurden Milzzellen von Ad-GFP oder Ad-FTCD behandelten NOD-Mäusen verwendet. Die Zellen wurden 14 Tage nach der Injektion der adenoviralen Vektoren isoliert. Für die Stimulation der Zellen wurden entweder 25 μ g/ml rekombinantes murines FTCD oder Kontrollprotein (OVA) zu den 4×10^5 Milzzellen hinzugegeben. Für die Positivkontrollen wurde eine polyspezifische Aktivierung mit ConA verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) nach Abzug der Negativkontrollen aus 2 unabhängigen Experimenten mit $n=4$.

Ein weiterer Immunospot-Assay wurde in Form eines IgG-ELISPOT durchgeführt um Informationen über die Beteiligung antigenspezifischer B-Zellen an der Entwicklung der AIH zu erlangen. Die mit rekombinatem murinem FTCD Protein oder Kontrollprotein (OVA) gekoppelten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit 1×10^5 bis 2×10^6 Milzzellen von Ad-GFP oder Ad-FTCD-infizierten NOD-Mäusen 12 Wochen nach der Infektion inkubiert. Die mit Anti-IgG gekoppelten Vertiefungen dienten als Positivkontrolle und wurden mit 1×10^4 bis 1×10^5 Milzzellen inkubiert. Im Vergleich mit den Kontrollen können in den drei untersuchten Mäusen mit induzierten AIH keine antigenspezifischen (d.h. FTCD-spezifischen) B-Zellen nachgewiesen werden. Die Zahl IgG-produzierender Zellen nach Aktivierung mit FTCD oder OVA liegt nur leicht oberhalb des detektierbaren Bereichs (>10 Zellen/Well) (siehe Abbildung 33). Der fehlende Nachweis FTCD reaktiver B-Zell Klone liegt wahrscheinlich an fehlender Konformität, Glykosilierung des in E. Coli hergestellten Proteins.

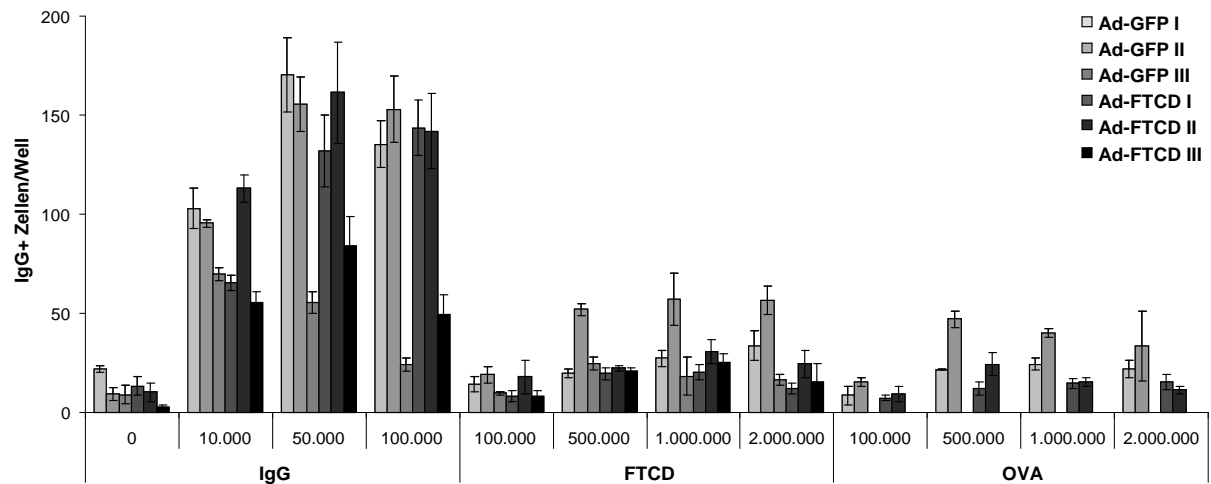


Abbildung 33: Die B-Zell-vermittelte Immunantwort wurde in einem Immunospot Assay analysiert. Für diesen Assay wurden Mikrotiter-Platten mit 0,5µg/ml murinem FTCD oder dem Kontrollprotein OVA gekoppelt und mit einer unterschiedlichen Zahl (1×10^5 - 2×10^6) an Milzzellen inkubiert. Die IgG-produzierenden B-Zellen wurden mit Biotin-gekoppelter anti-Maus IgG Antikörpern detektiert. Als Positivkontrolle dienten Vertiefungen, die mit 5µg/ml anti-IgG Antikörpern gekoppelt wurden und auf denen 1×10^4 - 1×10^5 Milzzellen inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) der gemessenen Triplikate von 3 Tieren jeweils 12 Wochen nach der Infektion mit Ad-GFP oder Ad-FTCD.

10 Die Induktion der AIH ist abhängig von regulatorischen T-Zellen

Die Anzahl an Tregs ist in Lebern der NOD-Mäuse 12 Wochen nach der Induktion der AIH durch Ad-FTCD signifikant erhöht. Möglicherweise spielen Tregs in der frühen Induktionsphase der AIH bzw. beim Erhalt der Lebertoleranz eine entscheidende Rolle. Die DEREK-Maus ist ein geeignetes Mausmodell um die Funktion von Foxp3+Tregs zu untersuchen. In dieser transgenen Maus werden GFP und Foxp3 koexprimiert und Foxp3+T-Zellen können mittels Diphtherietoxin (DT) depletiert werden, da diese Tiere ein DT-Rezeptor-eGFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3-Genlokus tragen (Lahl et al. 2007) und Wildtyp-Mäuse keinen DT-Rezeptor exprimieren. An Tag 1 und 5 nach der Infektion mit Ad-FTCD wurden die DEREK-BALB/c Tiere mit jeweils 1µg DT behandelt. Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung von Rattenschnitten mit den Seren der DEREK-Mäuse 9 Wochen nach der Applikation von Ad-FTCD konnte nur in den Seren der Mäuse mit DT-Behandlung leberspezifische Autoantikörper detektiert werden (siehe Abbildung 34).

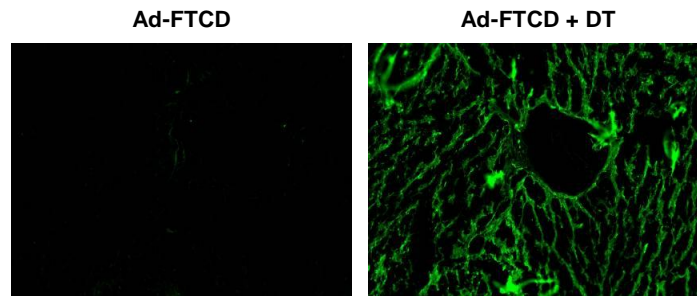


Abbildung 34: Bruch der humoralen Toleranz nach Depletion von Tregs in BALB/c-Mäusen. BALB/c-DEREG Mäuse wurden an Tag 1 und 5 nach der Infektion mit Ad-FTCD mit 1 μ g DT pro Tier behandelt. Dargestellt sind repräsentative IF-Färbungen auf Rattenschnitten 9 Wochen nach der Behandlung. Anzahl der Mäuse mit positiven Seren: ohne DT, 0 von 2; mit DT, 5 von 5. Vergrößerung, 20-fach.

Zum gleichen Zeitpunkt wurden auch die Lebern der Tiere untersucht und nur in den Mäusen mit DT-Behandlung wurden periportale Infiltrate festgestellt (siehe Abbildung 35). Somit wurde durch die Depletion der Tregs neben der humoralen auch die zelluläre Toleranz in Ad-FTCD infizierten Mäusen gebrochen.

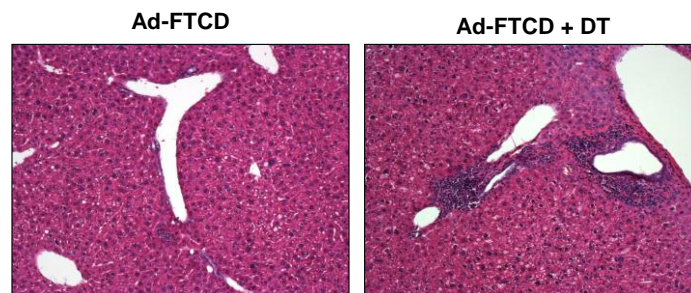


Abbildung 35: Induktion einer Ad-FTCD-vermittelten chronischen autoimmunen Hepatitis nach Depletion von Tregs in BALB/c-Mäusen. BALB/c-DEREG Mäuse wurden an Tag 1 und 5 nach der Infektion mit Ad-FTCD mit 1 μ g DT pro Tier behandelt. Dargestellt sind repräsentative H&E-Färbungen 9 Wochen nach der Behandlung. Anzahl der Mäuse mit periportal Infiltraten: ohne DT, 0 von 2; mit DT, 3 von 5. Vergrößerung, 10-fach.

11 Therapie der induzierten AIH mit Steroiden

Ein weiteres Kriterium der AIH beim Menschen ist das Ansprechen der Erkrankung auf eine Therapie mit Steroiden bei circa 80-90% der erkrankten Patienten. Um zu zeigen, dass das vorliegende Modell ein gutes präklinisches Modell mit vielen Gemeinsamkeiten zur humanen AIH ist, wurde zunächst geklärt, ob die NOD-Mäuse nach AIH-Induktion auch auf eine klassische Steroidbehandlung ansprechen. Dazu wurden zwei Gruppen von NOD-Mäusen mit Ad-FTCD infiziert und 8 Wochen nach der Virusinfektion wurde ein Teil der Leber operativ entfernt. Die Mäuse mit vorliegender Infiltration der Leber und leberspezifischen Autoantikörpern wurden im Anschluss für weitere 8 Wochen mit 1mg/kg Prednisolon im Trinkwasser behandelt. Abbildung 36 zeigt repräsentative H&E-Färbungen von NOD-Lebern eines unbehandelten Tieres und einer Maus vor bzw. nach der Gabe von Prednisolon. In den Paraffinschnitten von der therapierten Maus wurden im Gegensatz zu der unbehandelten Maus keine Leberinfiltrate beobachtet. Eine Remission der AIH nach der Gabe von Prednisolon liegt vor (siehe Abbildung 36).

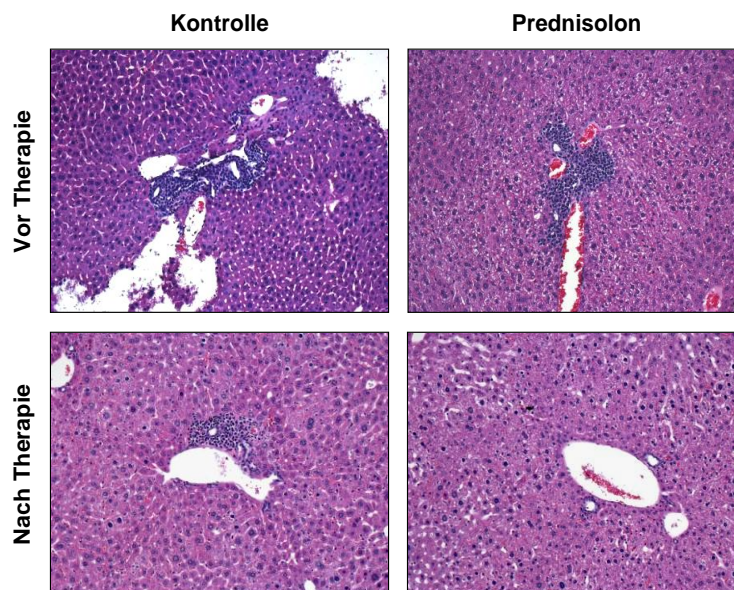


Abbildung 36: Kortikoidtherapie führt zu Remission bestehender autoimmuner Hepatitis im vorliegenden Modell. NOD-Mäuse wurden 8 Wochen nach i.v. Applikation von Ad-FTCD partiell hepatektomiert um den Status der Lebererkrankung zu bestimmen. In den darauffolgenden 8 Wochen erfolgte eine Therapie mit 1mg/kg Prednisolon. Dargestellt sind repräsentative H&E Färbungen der Leber eines Kontrolltieres, welches keine Therapie bekam, sowie die Lebern behandelter NOD-Mäuse vor und nach der Therapie. Vergrößerung, 10-fach.

In zwei unabhängigen Experimenten wurden mehrere NOD-Mäuse therapiert oder unbehandelt gelassen. Insgesamt wurde in 67% aller NOD-Tiere, die nicht behandelt wurden, nach 16 Wochen eine chronische autoimmune Hepatitis festgestellt, während es in

der Gruppe mit Prednisolon nur 14% aller Mäuse waren. Prednisolon führte danach bei 80% der NOD-Mäuse zu einer Remission (siehe Tabelle 3).

	Kontrolle	Prednisolon
n pro Gruppe	6	7
AIH-positiv (%)	67%	14%

Tabelle 3: Kortikoidtherapie führt zu Remission bestehender autoimmuner Hepatitis. Übersicht über die Gruppengröße der therapierten Tiere und dem Anteil der Tiere mit chronischer AIH im histologischen Bild nach der Therapie. n ist die Summe der NOD-Mäuse pro Gruppe aus 2 unabhängigen Experimenten.

Die 8-wöchige Therapie mit Prednisolon führt nicht zur Verbesserung der klinischen Parameter, d.h. sowohl die gemessene Konzentration der Gammaglobuline (ohne Abbildung) als auch die Autoantikörper waren nach der Behandlung unverändert. Die leberspezifischen Antikörper wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz in allen getesteten Seren von Ad-FTCD-infizierten Mäusen unabhängig von der Behandlungsgruppe (d.h. unbehandelte Kontrolltiere und Prednisolongruppe) gezeigt (siehe Abbildung 37).

Die induzierte chronische AIH ist demnach mit der klassischen Steroidtherapie behandelbar, d.h. es kommt zur Remission mit histologischer Verbesserung. Für die Absenkung der Hypergammaglobulinämie sind wahrscheinlich längere Therapien notwendig.

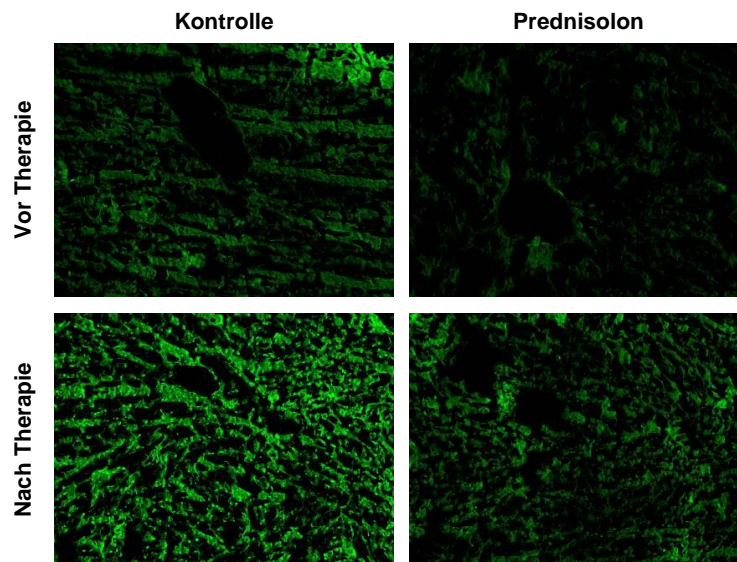


Abbildung 37: Bestimmung von leberspezifischen Autoantikörpern vor und nach der Behandlung mit Kortikoiden. Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen von Leberschnitten einer Ratte mit Seren von Ad-FTCD-infizierten Mäusen vor und nach der Therapie mit Prednisolon oder ohne Kortison-Behandlung (Kontrolle). Vergrößerung, 10-fach.

D. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde erstmalig im Tiermodell eine chronische AIH induziert, welche der AIH im Menschen stark ähnelt. Als auslösende Mechanismen konnten Umweltfaktoren wie limitierte hepatische Infektionen sowie ein verändertes Selbstantigen identifiziert werden. Daneben konnte die Autoimmunerkrankung nur in genetisch prädisponierten Stämmen ausgelöst werden. Damit wird die bisherige Hypothese der Pathogenese von leberspezifischen Autoimmunerkrankungen durch die Ergebnisse in diesem polyklonalen Modell erstmalig bestätigt. Zusätzlich wurde zum ersten Mal ein Toleranzverlust CD4+T-Zellen bei AIH gezeigt sowie die Rolle von regulatorischen T-Zellen (Tregs) in der AIH geklärt. Während ein Fehlen von Tregs auch eine Autoimmunität in genetisch nicht prädisponierten Mausstämmen ermöglicht, scheint die chronische AIH durch eine vermehrte Tregs Regulation gekennzeichnet zu sein.

1 Identifikation der auslösenden Mechanismen der AIH mit Hilfe des neuen Modells

In den vergangenen Jahrzehnten gab es mehrere Versuche, Tiermodelle zu entwickeln, welche der humanen AIH ähneln. Dabei war es jeweils sehr schwierig, die immunologische Toleranz gegen Leberantigene zu durchbrechen und diagnostische Kriterien einer AIH zu erfüllen (Lapierre et al. 2004; Holdener et al. 2008; Zierden et al. 2010). Zum ersten Mal konnte nun in der vorliegenden Arbeit eine starke Ähnlichkeit der hier etablierten experimentellen murinen AIH (emAIH) mit der humanen Erkrankung unter Verwendung des AIH-Scores gezeigt werden (Alvarez et al. 1999). Zu den entscheidenden Kriterien zählen der Anstieg der Gammaglobuline, ein hoher Titer sowie die Anwesenheit Hepatozyten- bzw. AIH-spezifischer Autoantikörper, die Leberhistologie und der Ausschluss einer Virushepatitis. Nach Induktion der emAIH durch Infektion von NOD-Mäusen mit Ad-FTCD wurde ein signifikanter und >1,5-facher Anstieg der Serumkonzentration der Gammaglobuline beobachtet (siehe Abbildung 13). Hepatozyten-spezifische Antikörper mit einem Titer oberhalb von 1:80 konnten ebenso detektiert werden wie FTCD-spezifische Autoantikörper (Abbildung 11 und 12). Die Histologie der Lebern mit periportalen plasmazellreichen Infiltraten, *Interface Hepatitis* sowie einer Erhöhung des verblindet ermittelten Ishak Scores führt zu einem weiteren Anstieg des AIH-Scores. Des Weiteren kann eine Virushepatitis durch die transiente Infektion mit nicht replizierenden Adenoviren (Benihoud et al. 1999), dem Nichtauftreten einer Erkrankung bei Ad-GFP Kontrollmäusen und PCR-Analysen (Abbildung 7) ausgeschlossen werden. Die emAIH im vorliegenden Modell erreicht damit einen AIH-Score von über 15, bei dem man im Menschen von einer gesicherten AIH spricht (Alvarez et al. 1999).

Das neue Mausmodell der emAIH besitzt nicht nur starke Ähnlichkeit zur humanen AIH, sondern mit Hilfe des Modells können erstmals in einem Modell die Mechanismen der Initiierung dieser Autoimmunerkrankung aufgezeigt und verstanden werden. Nur die hepatische Überexpression von humanem FTCD mittels adenoviraler Infektion in den genetisch prädisponierten NOD-Mäusen induzierte eine chronische autoimmune Hepatitis. Zur Induktion einer chronischen Hepatitis wurde das humane Protein FTCD, ein Autoantigen der AIH Typ-2, in der murinen Leber im Rahmen einer selbst-limitierten adenoviralen Infektion überexprimiert. Das humane Antigen FTCD hat mit dem murinen Protein eine Homologie von 84%. Das bedeutet, dass die beiden Proteine sich sehr ähnlich aber nicht identisch sind. Zentrale Toleranzmechanismen eliminieren vorrangig T-Zellen, welche eine hohe Affinität zu Proteinen aufweisen, die mit körpereigenen strukturell gleich sind (Abbas et al. 2007; Murthy et al. 2008). Die Ähnlichkeit und nicht Identität des Antigens zur Induktion der autoimmunen Erkrankung mit dem körpereigenen Leberprotein in der Maus ist daher vermutlich für den Toleranzbruch entscheidend. Das Konzept der *Molecular Similarity* (oder auch *altered self*) wurde dabei erstmals als Auslöser einer AIH identifiziert. Bisher wurde von anderen Arbeitsgruppen als Mechanismus zur Induktion von Autoimmunität im Mausmodell eher das Modell der *Molecular Identity* (Oldstone et al. 1991) oder *Mimikry* (Holdener et al. 2008) beschrieben. Das Prinzip des *altered self antigen* (des veränderten körpereigenen Antigens) wird auch zur Induktion einer effizienteren Tumorimmunität verwendet. Veränderte Tumorantigene können dabei eine stärkere adaptive Immunantwort induzieren als das Wildtypprotein (Dyall et al. 1998; Slansky et al. 2000; Guevara-Patino et al. 2003; Dionne et al. 2004).

Als Auslöser einer AIH im Menschen werden Umweltfaktoren wie Medikamente und Infektionen angesehen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Viren wie HAV, HBV, HIV und Masern mit der Induktion einer chronischen autoimmunen Reaktion in der Leber in Verbindung stehen (Robertson et al. 1987; Laskus et al. 1989; Berk et al. 1991; Vento et al. 1991). Beispielsweise traten charakteristische Autoantikörper der AIH im Menschen im Zusammenhang mit Antikörpern gegen Hepatitis A, B oder C auf (Czaja 1979). In dem hier präsentierten Modell der emAIH wurde nun erstmalig die limitierte hepatische Infektion als Auslöser einer leberspezifischen Immunantwort nachgewiesen. Die eingesetzten Adenoviren des Serotyp 5 infizieren Hepatozyten (Hegenbarth et al. 2000; Kalyuzhnyi et al. 2008) und integrieren die kodierende Sequenz des Antigens via extrachromosomaler Episomen (Thomas et al. 2003). Vermutlich präsentieren die virusinfizierten Hepatozyten oder DC nach Apoptose von Hepatozyten das Antigen und sind an der Induktion der leberspezifischen Immunantwort in dem neuen Modell beteiligt. Zusätzlich werden Adenoviren über PRR als Gefahr erkannt. Über die Aktivierung von MyD88- und TLR9-abhängigen Signalwegen können Adenoviren angeborene Immunantworten und damit der Synthese von pro-

inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF α induzieren (Yamaguchi et al. 2007; Hartman et al. 2008). Der endosomale PRR TLR9 wird beispielsweise von plasmazytoiden DC exprimiert, die in der Leber vermehrt vorkommen (Pillarisetty et al. 2004). Das Ausbleiben einer hepatischen Inflammation nach hydrodynamischer Transfektion mit Expressionsvektoren in Abbildung 22 macht deutlich, dass die virale Komponente als Gefahrensignal für die Induktion der AIH in den NOD-Mäusen unentbehrlich ist. Die Bedeutung von Infektionen bakteriellen oder viralen Ursprungs beim Bruch der Lebertoleranz wurde bisher nur in transgenen Mausmodellen mit molekularer Identity demonstriert (Limmer et al. 1998; Voehringer et al. 2000). Beispielsweise konnte dabei gezeigt werden, dass die Stimulation von TLR9 allein nicht ausreichend ist, um autoreaktive Zellen zu aktivieren und eine chronische Immunreaktion zu initiieren (Sacher et al. 2002). Die meisten dieser transgenen Modelle führten jedoch nur zu transienten Leberschäden und im Gegensatz zum vorliegenden Modell zeigte keines dieser Modelle eine klinische Relevanz hinsichtlich der autoimmunen Lebererkrankung.

Für die Initiierung einer autoimmunen Hepatitis sind nicht nur das heterologe Autoantigen und eine limitierte Virusinfektion entscheidend, sondern anhand des neuen Modells konnte zudem gezeigt werden, dass für die Entstehung der emAIH die autoimmune Prädisposition wichtig ist. Nur in NOD-Mäusen wurde nach der Infektion mit Ad-FTCD eine chronische Leberentzündung beobachtet (siehe Abbildung 15). Dieser genetisch prädisponierte Stamm trägt den Haplotyp H-2^{g7}, der mit der spontanen Entwicklung einer Typ-1 Diabetes in Verbindung steht (Wicker et al. 1995; Tisch et al. 1996). NOD-Mäuse entwickeln aber auch sehr leicht andere autoimmune Erkrankungen wie z.B. Autoimmune Thyreoiditis (Many et al. 1996). Dem speziellen Polymorphismus der I-A Subregion im MHC-II Locus wird der stärkste Einfluss auf die Diabetes-Empfindlichkeit zugeschrieben (Ridgway et al. 2001). Neben dem spezifischen Haplotyp, wurden in diesem Stamm weitere so genannten *Insulinitis dependent diabetes (Idd)* Loci mit den autoimmunen Reaktionen in Verbindung gebracht (Ridgway 2006). Dazu gehört ein einzigartiger genetischer Polymorphismus in dem Molekül CTLA-4 (Ueda et al. 2003), welches T-Zellen negativ reguliert, sowie Genvarianten in IL-2 und CD137 (Lyons et al. 2000; Lyons et al. 2000). Beim Menschen sind ebenfalls Assoziationen zwischen bestimmten MHC-Allelen, wie z.B. im MHC-I Locus HLA-A2 und -B8, im MHC-II Locus DR3 und DR4 sowie Polymorphismen von Nicht-MHC Genen wie CTLA-4 aber auch bei dem proinflammatorischen Zytokin TNF α mit dem erhöhten Risiko einer AIH gezeigt worden (Cookson et al. 1999; Donaldson 2004; Teufel et al. 2006; Beland et al. 2009). Die Induktion einer emAIH in den NOD-Mäusen lässt sich somit auch auf den spezifischen genetischen Hintergrund dieses Stammes zurückführen. Das Ausbleiben einer autoimmunen Hepatitis nach Infektion von weiteren Mausstämmen (BALB/c, C57BL/6, FVB/N) mit Ad-

FTCD bestätigt, dass die Genetik für die Entstehung einer AIH eine entscheidende Rolle spielt (ohne Abbildung).

Ein Zusammenhang zwischen dem genetischen Hintergrund und der Induktion einer AIH wurde auch in einem murinen Modell der AIH Typ-2 von Alvarez et al. beobachtet (Lapierre et al. 2006). Mittels DNA-Immunisierung wurde hierbei in C57BL/6-Mäusen eine stärkere antigenspezifische Immunantwort mit Leberinfiltraten und transienten antigenspezifischen Autoantikörper induziert als in BALB/c-Mäusen oder 129/Sv-Mäusen (Lapierre et al. 2004). In den Mausmodellen von Lohse und Mori war die Hepatitis ebenfalls in C57BL/6 besonders ausgeprägt (Mori et al. 1984; Lohse et al. 1990). Im Gegensatz zu den NOD-Mäusen haben C57BL/6-Tiere den Haplotyp H-2^b und es sind keine besonderen Polymorphismen von Autoimmungenen in Hinsicht auf autoimmune Erkrankungen bekannt. Beiden Stämmen fehlt allerdings das MHC-II Molekül I-E, welches in den NOD-Mäusen eine Rolle bei der murinen Typ-1 Diabetes spielt (Nishimoto et al. 1987).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in dem neu etablierten Modell einer chronischen autoimmunen Hepatitis zum ersten Mal der Einfluss bekannter Autoimmunitätsloci auf die Entwicklung einer AIH gezeigt wurde. Desweiteren wurden sowohl Umweltfaktoren als auch die Ähnlichkeit aber nicht Identität zwischen dem Autoantigen und einem z.B. pathogenen Molekül, als auslösende Faktoren einer AIH identifiziert.

2 Mechanismen der Chronizität der emAIH

Mit Hilfe des neuen Modells der emAIH wurden nicht nur die Transaminasen und humoralen Immunantworten analysiert um die Mechanismen der Entstehung und Progression einer AIH besser zu verstehen. Vielmehr noch wurden CD4⁺T-Zellen erstmalig als Treiber der Autoimmunen Erkrankung identifiziert und intrahepatische Immunzellen charakterisiert.

Eine mögliche AIH wird beim Menschen aufgrund klinischer Symptome oder dem Anstieg von spezifischen Laborparametern festgestellt (Desmet et al. 1994). Zu den charakteristischen Messwerten im Serum gehört neben erhöhten Gammaglobulinen auch ein Anstieg der Transaminasen AST und ALT. In dem neuen Mausmodell wurde innerhalb der ersten Wochen nach der Infektion mit Ad-FTCD zunächst eine akute Erhöhung der Transaminasen auf >1000 U/l beobachtet. Während ein signifikanter Anstieg der Gammaglobuline, Hepatozyten-spezifische Autoantikörper und zahlreichen Leberinfiltrate in der chronischen Phase der emAIH vorliegen, sind die Transaminasen hier nicht mehr erhöht. Der akute Anstieg der Transaminasen ist eine Folge der transienten Immunantwort nach Infektion mit Adenoviren (Muruve et al. 1999; Holdener et al. 2008) und wurde auch nach Infektion mit dem Kontrollvirus Ad-GFP gemessen. In dieser Phase findet zudem eine akute Leberschädigung in Form kleinerer intralobulärer Leberinfiltrate sowie hepatozelluläre

Nekrosen statt (siehe Abbildung 9). Unveränderte bis hin zu minimal erhöhten Serumkonzentrationen der ALT wurden u.a. auch in den Modellen von Holdener, Alvarez und Zierden sowie in den frühen Immunisierungsmodellen gezeigt (Scheiffarth et al. 1967; Lapierre et al. 2004; Holdener et al. 2008; Zierden et al. 2010). Da all diese Modelle chronische Leberschädigungen und z.T. antigenspezifische Autoantikörper aufweisen, ist fraglich, ob Transaminasen in chronischen Mausmodellen überhaupt adäquate diagnostische Parameter darstellen.

Autoantikörper sind hingegen ein wichtiges Kriterium für die Erkennung einer gebrochenen humoralen Toleranz. Dabei erfolgt durch Antigenerkennung eine Aktivierung von B-Zellen, sodass antigenspezifische Antikörper produziert werden (Abbas et al. 2007). Hepatozyten-spezifische Antikörper und damit ein Bruch der humoralen Toleranz wurden in den Seren von NOD/LtJ, BALB/c und FVB/N-Mäusen 12 Wochen nach der Behandlung mit Ad-FTCD festgestellt (siehe Abbildung 10). Die Kombination aus der adenoviralen Infektion der Leber und gleichzeitigen Expression eines heterologen Antigens führt demnach zu einer humoralen Immunantwort, die jedoch unabhängig von der Auslösung einer AIH ist, da nur in den NOD-Mäusen eine chronische AIH induziert wurde. Damit kann erneut die genetische Prädisposition als entscheidender Auslöser einer chronischen autoimmunen Hepatitis identifiziert werden. Obwohl ein Bruch der humoralen Immunität vorliegt, konnten FTCD-spezifische B-Zell-Klone nach der Induktion einer emAIH in NOD-Mäusen nicht nachgewiesen werden. Sehr wahrscheinlich liegt das an der fehlenden Konformität und Glykosylierung des in *E. coli* hergestellten Proteins, welches im B-Zell-Immunospot-Assay eingesetzt wurde, wodurch das Epitop nicht vom B-Zellrezeptor erkannt werden kann.

Aufgrund der geringen Frequenz autoreaktiver Zellen im Modell der emAIH (siehe ELISPOT) aber auch bei Autoimmunerkrankungen im Menschen (Reijonen et al. 2004) sowie der Unkenntnis über deren Epitopspezifität, sind die gegen das körpereigene Protein reagierenden T-Zellen nur schwer detektierbar. Bisher wurden in Mausmodellen die leberspezifischen und hepatitis-vermittelnden T-Zellen kaum charakterisiert. Dabei wurden eher TCR-transgene CD8+T-Zellen als wichtigste Zellen bei der autoimmunen Zerstörung der Hepatozyten gezeigt (Limmer et al. 1998; Zierden et al. 2010) und nur in wenigen Fällen wurde eine Prädominanz der CD4+T-Zellen in periportalen Infiltraten beschrieben (Lapierre et al. 2004; Holdener et al. 2008). Auch in der menschlichen AIH wurden bislang im wesentlichen nur HLA-A2 restringierte T Zellen, d.h. autoreaktive CD8+T-Zellen, untersucht, da dieser MHC-I Typ bei zahlreichen Patienten und Kontrollen vorkommt (Longhi et al. 2007). Die Krankheitsassoziation besteht jedoch bei der humanen AIH mit MHC-II. Insofern ist es von grosser Bedeutung, dass wir mit unseren Experimenten zeigen konnten, dass MHC-II restringierte CD4+T-Zellen als treibende Kraft bei der AIH-Entstehung wichtig sind.

Mittels IFN- γ -ELISPOTs wurden zum ersten Mal antigenspezifische T-Zellen nach der Induktion einer chronischen autoimmunen Lebererkrankung gezeigt (siehe Abbildung 32). Die APC der eingesetzten Milzzellen haben in dem Assay das rekombinante murine Protein phagozytiert, prozessiert, auf MHC-II präsentiert und somit die IFN- γ -Produktion der antigenspezifischen CD4+T-Zellen aktiviert (Murthy et al. 2008). In diesem Assay konnte sowohl ein Toleranzbruch gegen das Selbstprotein als auch eine MHC-II restriktive Immunität identifiziert werden. Darüber hinaus konnte nur durch CD4+T-Zellen und nicht durch CD8+T-Zellen oder Serum die chronische autoimmune Hepatitis auf immundefiziente Empfänger adoptiv transferiert werden. Eine Übertragbarkeit der AIH auf syngene Empfänger (d.h. adoptiver Transfer) wurde bisher nur unter Verwendung mononukleärer Zellen, ConA-aktivierter Milzzellen oder vor Thy1.2-Depletion mit Milzzellen demonstriert (Scheiffarth et al. 1967; Mori et al. 1984; Mori et al. 1985; Araki et al. 1987; Lohse et al. 1990). Im Unterschied zu dem vorliegenden Mausmodell der AIH wurden in keinem der o.g. Modelle die leberspezifischen und Hepatitis-vermittelnden T-Zellen weiter charakterisiert. Somit wurde in dem vorliegenden Mausmodell erstmalig gezeigt, dass CD4+T-Zellen die Treiber der Immunantwort einer AIH sind und die AIH gleichzeitig durch diese übertragbar ist, obwohl auch wenige CD8+T-Zellen in den Leberinfiltraten detektiert wurden (siehe Abbildung 23).

Durch die Entwicklung einer emAIH mit starken Ähnlichkeiten zur AIH im Menschen war es nun erstmals möglich, intrahepatische Immunzellen funktionell und phänotypisch zu charakterisieren. Dies ist deshalb von besonderer Bedeutung, da sich bisherige Analysen im Wesentlichen auf Zellen des peripheren Blutes konzentriert haben (Longhi et al. 2010). Beobachtet wurden im Menschen und in anderen Mausmodellen z.B. ein Anstieg der Zahl an aktivierten CD8+T-Zellen, CD4+T-Zellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. eine Verringerung des Anteils an NKT-Zellen und kontroverse Daten zur Änderungen der Frequenz regulatorischer T-Zellen bei Infektionen der Leber und AIH (Gossmann et al. 1995; Matsui et al. 1997; Tseng et al. 2001; Longhi et al. 2004).

In unserem emAIH-Modell ergab die Bestimmung verschiedener Lymphozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie eine moderate Veränderung in den analysierten immunmodulierenden Zellpopulationen zwischen den NOD-Mäusen mit emAIH und den Kontrolltieren (siehe Abbildung 25-28). Die Gesamtzellzahl nach Isolation der IHL blieb allerdings unverändert (ohne Abbildung). Im Vergleich mit anderen Daten zu Lymphozyten-Subpopulationen in IHL der Maus zeigen sich ähnliche Anteile an $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK- und NKT-Zellen sowie B-Zellen in den Kontrolltieren (ohne Abbildung) (Klugewitz et al. 2004). In dem Modell der emAIH wurden in der Leber nur eine tendenzielle Erhöhung der NKT-Zellen und ein signifikanter lokaler Anstieg der NK-Zellen sowie der Tregs in den Tieren nach AIH-Induktion gezeigt. Die Rolle der Tregs bei der Induktion und Progression der

autoimmunen Hepatitis wird in einem separaten Teil weiter unten analysiert. Eine Erhöhung der NK-Zellen kann indes als ein Hinweis auf einen aktiven Regulationsmechanismus verstanden werden. Dieses erklärt sich mit Hinblick auf die Assoziation der NK-Zellen bei operationaler Toleranz nach Lebertransplantation (Kroemer et al. 2008; Martinez-Llordella et al. 2008), welche jedoch kontrovers diskutiert wird (Li 2010; Van Leest 2011).

Die chronische autoimmune Hepatitis in der vorliegenden Arbeit ist in männlichen NOD-Tieren signifikant stärker ausgeprägt als in Weibchen (siehe Abbildung 17). Wohingegen die geschlechtliche Prädominanz der humanen AIH genau umgekehrt ist. Vor allem Mädchen und junge Frauen sind betroffen (Gregorio et al. 1997; Beland et al. 2009). Auch in dem Modell der Xenoinmunisierung von C57BL/6-Mäusen der Gruppe von Alvarez wurde eine Geschlechtsspezifität beschrieben (Lapierre et al. 2010). Starke periphere Toleranzmechanismen und die Entwicklung von Tregs wurden dabei als mögliche Hauptfaktoren bei der geringeren Entstehung einer Leberentzündung in den männlichen Tieren beschrieben. Eine mögliche Ursache dafür, dass in dem vorliegenden Mausmodell der AIH weibliche Tiere weniger stark von den chronischen Leberantworten betroffen sind, sind konkurrierende Autoimmunantworten. In NOD-Mäusen entwickeln vorrangig weibliche Tiere einen spontanen Diabetes mellitus Typ-1 (Leiter et al. 1987). Während die Diabetesinzidenz nach Infektion mit Ad-FTCD in den weiblichen Tieren im Vergleich mit Ad-GFP infizierten Tieren unverändert ist, könnte die gleichzeitige Betazellimmunreaktion die Entwicklung einer 2. Autoimmunerkrankung in den prädiabetischen Weibchen einschränken. Daneben wurden eine Verzögerung des Eintritts und eine Senkung der Diabeteshäufigkeit in Zusammenhang mit der adenoviralen Infektion der NOD-Mäuse beobachtet (siehe Abbildung 18). Da sowohl die Infektion mit Ad-GFP als auch Ad-FTCD zu einer verzögerten Betazellimmunität führten, spielt hier nicht die Entwicklung der AIH, sondern vielmehr die Virusinfektion eine Rolle d.h. heterologe Immunität (Chen et al. 2001; Wedemeyer et al. 2001).

Wenn beim Menschen die AIH unbehandelt bleibt bzw. die Patienten therapieresistent sind, entsteht eine Fibrose der Leber, welche in eine Zirrhose fortschreiten kann (Mistilis et al. 1968). In den unbehandelten männlichen und weiblichen NOD-Mäusen ist nach Induktion der emAIH auch ein Fortschreiten der Erkrankung, d.h. eine chronische Entwicklung der AIH, beobachtet worden. Dafür sprechen die Zunahme der periportalen plasmazellreichen Infiltrate sowie die beginnende Fibrose. Nach Färbung von retikulären Fasern in den Lebern von NOD-Mäusen 7 Monate nach der Injektion von Ad-FTCD wurde dabei eine periportale Fibrose mit Hepatozyten-Abschnürungen sowie Brücken-Fibrose, der so genannten *Bridging Fibrosis* beobachtet (siehe Abbildung 20). Diese Chronizität einer AIH konnte bisher noch in keinem anderen Mausmodell gezeigt werden. Während in dem Mausmodell von Zierden et al. nur Collagenanreicherungen in einem transgenen Modell gezeigt wurden, konnte die Arbeitsgruppe von Holdener et al. in ihrem CYP2D6-Modell lediglich subkapsuläre Fibrosen

beobachten (Holdener et al. 2008; Zierden et al. 2010). Letztere traten zudem nur nach der gleichzeitigen i.v. und i.p. Infektion von CYP2D6-transgenen FVB/N-Mäusen mit Adenoviren auf, die für CYP2D6 kodieren, während zur Induktion der emAIH lediglich eine i.v. Injektion erforderlich ist. Eine subkapsuläre Fibrose stellt außerdem kein klassisches Charakteristikum einer AIH dar (Petrelli et al. 1967). Des Weiteren wurden in der Arbeit nur humorale Immunantworten mit Autoantikörpern gegen CYP2D6 gezeigt und im Unterschied zum Modell der emAIH keine T-Zellantworten und kein Pathomechanismus charakterisiert. Die Unterschiede in der Lebererkrankung zwischen dem Adenovirus-Modell von Holdener et al. und unserem neuen emAIH-Modell sind möglicherweise auf die unterschiedlichen verwendeten humanen Antigene (CYP2D6 bzw. FTCD) und den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen (FVB/N bzw. NOD/LtJ).

3 Die Rolle von Tregs bei der Induktion und Progression von AIH

Für die Suppression von autoimmunen Reaktionen wird den Tregs eine wichtige Funktion zugeschrieben (Sakaguchi et al. 1995). In unserem neuen Mausmodell konnte nun erstmalig nachgewiesen werden, dass Tregs sowohl die Induktion als auch den chronischen Verlauf einer AIH beeinflussen.

Unsere Experimente in DREG-Mäusen weisen darauf hin, dass Tregs Autoimmunität verhindern können (Abbildung 35). Die Depletion von Tregs während der Induktionsphase der AIH führte zur Entstehung periportal Infiltrate in einem Mausstamm, der BALB/c-Maus, bei dem zuvor keine Hepatitis induziert werden konnte. Durch die temporäre Entfernung der Tregs in der Primingphase wurde somit der Schwellenwert zur Induktion der chronischen Lebererkrankung herabgesetzt. Ein anderes Mausmodell unterstützt unsere Daten, da dort eine stärkere Hepatitis durch die neonatale Entnahme des Thymus erreicht wurde (Watanabe et al. 1987). Die Autoren schlossen daraus, dass leberspezifische T-Zellantworten normalerweise durch Tregs unterdrückt werden, die im Thymus entstehen (Asano et al. 1996).

Neben der Funktion der Tregs während der Induktionsphase konnten wir trotz des niedrigen Anteils intrahepatischer Tregs einen überproportionalen Anstieg der Tregs nach Induktion der emAIH beobachten, während die Tregs-Zahl in der Milz unverändert ist (ohne Abbildung). Das bedeutet, dass die Tregs nicht nur die Induktionsphase sondern auch die chronische Phase der AIH regulieren können. Im Gegensatz dazu haben einige Studien bei Autoimmunerkrankungen im Menschen wie PBC, Typ-1 Diabetes oder AIH eine allgemeine Reduktion der Zahl an Tregs beobachtet (Kukreja et al. 2002; Longhi et al. 2004; Lan et al. 2006). Hierbei wurden jedoch vorrangig die humanen PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*) zur Analyse der überwiegend pädiatrischen Proben herangezogen. Neuere Daten zeigen dagegen keinen Unterschied in der Zahl CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen zwischen

gesunden und AIH-Patienten sowie Patienten mit Typ-1 Diabetes (Brusko et al. 2007) und eine unveränderte Frequenz von Tregs im Blut von AIH Patienten (persönliche Kommunikation mit Richard Taubert, (Peiseler et al. 2011)). Sehr häufig beschreiben diese und weitere Studien zudem einen lokalen Anstieg von Tregs bei Patienten mit AIH, chronischem HCV, inflammatorischen Darmerkrankungen, Psoriasis oder rheumatoider Arthritis (Maul et al. 2005; Mottonen et al. 2005; Ward et al. 2007; Zhang et al. 2010). Der Anstieg der Tregs ist meist proportional zum lokalen Anstieg proinflammatorischer Zellen, so dass das Treg/Teff Verhältnis kaum verändert ist. Wir zeigen nun erstmals einen überproportionalen lokalen Anstieg der Tregs. Dabei ist nicht nur die Zahl, sondern vielmehr noch der Anteil der Tregs an der CD4+T-Zellfraktion erhöht. Damit liegt hier vermutlich ein aktiver Regulationsprozess vor, in dem die Tregs die Zahl CD4+T-Effektorzellen regulieren. Diese Daten widersprechen den Daten von Vergani und Mitarbeitern, welche aber wie gesagt an PBMCs erhoben wurden und auch nicht von allen Gruppen reproduzierbar sind. Diese lokale Kontrolle der Immunantwort wurde bisher noch nicht für die AIH gezeigt, aber bereits bei alloreaktiven Immunantworten beobachtet (Schenk et al. 2005; Li et al. 2008). Die Daten unterstreichen auch die Bedeutung der Analyse intrahepatischer Lymphozytenpopulationen zum besseren Verständnis der Pathophysiologie.

4 emAIH – ein präklinisches Modell zur Entwicklung von Therapien

Eine Remission der AIH mit Verbesserung bzw. Normalisierung des histologischen Bildes tritt in 80% aller Patienten nach einer Behandlung mit Prednisolon auf (Czaja et al. 2002). Eine mehrwöchige Behandlung mit der klassischen Prednisolon-Therapie hat auch bei NOD-Mäusen funktioniert, bei denen eine chronische autoimmune Hepatitis mit Ad-FTCD induziert wurde (siehe Abbildung 36). Der Behandlungserfolg liegt in unserem Modell ebenfalls bei 80% (siehe Tabelle 3) und die täglichen Dosis von 1mg/kg Prednisolon, die von den Tieren über das Trinkwasser aufgenommen wurde, entspricht der initialen Dosis von 60mg/Tag beim Menschen (Manns und Strassburg 2001). Als diagnostische Maßnahmen zur Feststellung der Therapieerfolge werden beim Menschen neben der Leberbiopsie v.a. klinische Parameter untersucht. Dazu gehören die Lebertransaminasen und Gammaglobuline (Strassburg und Manns 2009). Da wir in unserem chronischen Mausmodell keine Erhöhung der Transaminasen beobachtet haben, kommt dieser klinische Parameter für die Analyse nicht in Frage. Wir haben allerdings vor und nach der Therapie zusätzlich die Titer der leberspezifischen Autoantikörper untersucht. Weder die Serumkonzentration der Gammaglobuline (ohne Abbildung) noch die Hepatozyten-spezifischen Autoantikörper waren nach der Therapie mit Prednisolon vermindert (siehe Abbildung 37). Eine Verringerung der Immunglobuline ist beim Menschen ein Kennzeichen des Therapieansprechens, das allerdings erst nach einer längeren Therapiedauer beobachtet wird. Da die Therapie der

NOD-Mäuse nur 8 Wochen lang erfolgte, kann man hier noch keine Normalisierung feststellen. Weiterhin sind Autoantikörper in der Regel kein Parameter für Therapieansprechen und daher kann eine Veränderung auch in unserem Modell nicht beobachtet werden (Strassburg und Manns 2002). Einzige Ausnahme sind die ASGPR-Antikörper (Asialoglykoprotein Rezeptor Antikörper), welche als Marker des Therapieerfolges geeignet sind (Poralla et al. 1991; Treichel et al. 1993).

Zusammengefasst hat die klassische Therapie der AIH bestens funktioniert, um die emAIH in unserem Mausmodell zu behandeln. Somit stellt unser neues Mausmodell ein geeignetes präklinisches Modell zur Untersuchung neuer Therapien der AIH dar. Ähnliches Therapieansprechen auf klassische immunsuppressive Therapie war bislang in keinem anderen experimentellen AIH-Modell beobachtet worden.

5 Die Effekte der Antigene CYP2D6 und SLA im Modell

Eine chronische persistierende Hepatitis wurde nur mit Ad-FTCD in NOD-Mäusen beobachtet. Der Bruch der humoralen Toleranz scheint hingegen leichter zu sein, da unter Verwendung von CYP2D6 oder SLA als Antigen keine chronische Hepatitis aber zytosolische, z. T. sogar antigenspezifische Autoantikörper und in NOD-Mäusen zusätzlich ANAs detektiert wurden (siehe Abbildungen 10). 75% der Ad-SLA infizierten NOD-Tiere hatten ANAs und weitere 25% zytosolische Antikörper während nur bei 14% bzw. 25% der NOD-Mäuse nach Injektion von Ad-FTCD respektive Ad-2D6 ANAs detektiert wurden. Dies zeigt erstmalig, dass SLA, welches der humanen O-phosphoseryl-tRNA:selenocysteinyl-tRNA Synthase (SepSecS) entspricht (Yuan et al. 2006), ein Treiber der ANA Antworten in Patienten mit AIH Typ-1 sein könnte. Daneben zeigte sich aber auch, dass insbesondere die Entwicklung streng an eine genetische Prädisposition assoziiert ist, da ANAs nur in NOD Mäusen gesehen wurden, was zuvor beim Menschen nur vermutet wurde (Bittencourt et al. 1999). Autoantikörper gegen SLA stellen den einzigen erkrankungsspezifischen Antikörper der AIH im Menschen dar und es wurden HLA-A2 restringierte T Zell Epitope gegen SLA beschrieben (Mix et al. 2008). Umso erstaunlicher ist es, dass trotz humoralem Toleranzverlust gegen SLA keine AIH in den Mäusen zu induzieren war. Dies könnte an einer speziellen genetischen Prädisposition oder an einer anderen Bedeutung von SLA oder einer anderen Epitopräsentation in Mäusen liegen. Damit fehlt jedoch weiterhin der Beweis, dass Immunantworten gegen SLA wirklich eine pathophysiologische Bedeutung in der Immunantwort gegen Hepatozyten haben.

Eine Erklärung für den Bruch humoraler Toleranz könnte die Aktivierung von autoreaktiven T-Helferzellen in der Leber durch die Kombination aus der leberspezifischen Expression eines heterologen Antigens und einem TLR-Signal sein. Ein Hinweis darauf ist die Abwesenheit von Hepatozyten-spezifischen Antikörpern beim Fehlen der Viruskomponente

nach hydrodynamischer Transfektion (ohne Abbildung). Trotz der vergleichbaren rund 80%igen Homologie der jeweiligen humanen Antigene zu den murinen Proteinen und Verwendung der gleichen Mausstämme induziert nur eine Infektion mit Ad-FTCD und nicht mit Ad-SLA oder Ad-2D6 in NOD-Mäusen eine chronische autoimmune Hepatitis mit Leukozyteninfiltraten und Fibrose. Unter Verwendung des originalen Ad-2D6 Stammes von Holdener konnte ebenfalls keine chronische Lebererkrankung in FVB/N-, BALB/c- oder NOD-Mäusen hervorgerufen werden (ohne Abbildung). Die Diskrepanz zu den Daten von Holdener et al. könnte mit der Verwendung von FVB/N-Mäusen unterschiedlicher Herkunft erklärt werden, da unsere Mäuse von Charles Rivers stammen und die FVB/N-Mäuse von Urs Christen von der Firma Harlan Laboratories kommen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ich habe in dieser Arbeit ein neues Mausmodell entwickelt, das den Kriterien der AIH des Menschen nahezu entspricht. Durch eine limitierte Virusinfektion von genetisch prädisponierten NOD-Mäusen mit Adenoviren, welche das humane Autoantigen FTCD leberspezifisch exprimieren, wurden spezifische Antikörper- und T-Zellantworten gegen das murine FTCD induziert. Mit Hilfe des Modells der experimentellen murinen AIH (emAIH) konnten nun erstmalig Fragen hinsichtlich der Induktion und Genetik der Entwicklung einer AIH geklärt und mögliche Regulations- und Pathomechanismen der chronischen Phase nachgewiesen werden. Dabei wurden Tregs als Regulatoren der Initiierung und Chronizität einer AIH sowie die besondere Rolle der CD4+T-Zell-vermittelten Immunantwort identifiziert. Insbesondere durch die starke Ähnlichkeit zur humanen Erkrankung sind diese gewonnenen Erkenntnisse auch im Hinblick auf die humane AIH überaus wichtig. Die Therapierbarkeit der chronischen Erkrankung mit der klassischen Steroid-Therapie ergänzt die besondere Eignung des neuen Mausmodell als präklinisches Modell zur Entwicklung neuer Therapien. Als auslösende Mechanismen der AIH wurden die Adenoviren als Umweltfaktor sowie das eingesetzte heterologe Selbstantigen nachgewiesen. Das identifizierte Prinzip der *Molekularen Similarity*, d.h. Ähnlichkeit und nicht Identität der Proteine, die bei der Induktion einer AIH eine Rolle spielen, sollte in fortführenden Experimenten als entscheidendes Kriterium für den Toleranzbruch in der Leber geprüft werden. Dazu werden derzeit Adenoviren im Labor hergestellt, die das murine FTCD exprimieren und somit identisch zum Selbstprotein in der murinen Leber sind. Auch die Funktion des s.g. *Fertile Fields* bei der AIH-Induktion sollte durch Infektion der NOD-Mäuse mit Ad-GFP und zeitlich knapp versetzter hydrodynamischer Transfektion mit einem Expressionsvektor, der die Sequenz des humanen FTCD enthält, analysiert werden. Mit *Fertile Field* ist dabei das pro-inflammatorische Milieu der Leber nach adenoviraler Infektion gemeint.

Weiterhin könnte das neue Mausmodell dazu genutzt werden, um die Rolle von Tregs sowie NK- und NKT-Zellen bei den Pathomechanismen der AIH zu untersuchen. In meiner Arbeit habe ich bereits die Funktion der Tregs bei der Initiierung der emAIH identifiziert und einen lokalen Anstieg der Tregs in der chronischen Phase der Erkrankung beobachtet. In weiteren Versuchen könnte man den Einfluss der Tregs auf die Chronizität der AIH in der DEREK-Maus testen. Die Depletion der Tregs einige Zeit nach der Infektion mit Ad-FTCD könnte die Frage klären, ob Tregs auch in einer späteren Phase der AIH-Entwicklung die Immunantwort unterdrücken und dadurch stärkere Organschäden bei der Autoimmunerkrankung verhindern. Die Funktion von NKT-Zellen bzw. NK-Zellen könnten u.a. durch die Verwendung von CD1-defizienten Mäusen oder NK-depletierenden Antisera gegen asialo-GM1 bestimmt werden (Chen et al. 1997; Yoshino et al. 2000). Des Weiteren könnte das neue Modell mechanistische Fragen beantworten. Die Frage nach dem Ort der primären T-Zellaktivierung könnte man durch die Entnahme der Milz und Bandlung der NOD-Mäuse mit Ad-FTCD untersuchen.

Darüber hinaus bietet das neue Modell der emAIH die Möglichkeit neue Therapieansätze zu testen. Diese sollten möglichst zu einer Verringerung der Medikamenten-bedingten Komplikationen führen oder durch Modulation der adaptiven Immunantwort eine langfristige Verbesserung des klinischen Bildes erzeugen. Eine erste alternative Therapiemaßnahme zu dem klassischen Regime ist die Behandlung mit dem synthetischen Steroid Budesonid, das zu weniger Nebenwirkungen führt als Prednisolon und zudem in der Kombination mit Azathioprin eine bessere Wirkung hat (Manns et al. 2010). In dieser Arbeit wurde in adoptiven Transferexperimenten und IFN- γ -ELISPOTs zum ersten Mal gezeigt, dass CD4+T-Zellen für die Immunantwort der AIH eine wichtige Rolle spielen. Für die Therapieentwicklung sollte die CD4+T-Zellantwort bei der AIH-Entwicklung ebenso wie der beschriebene lokale Anstieg von Tregs berücksichtigt werden. Immunmodulierende Therapien, welche die T-Zellantworten beeinflussen, wie z.B. anti-CD3 oder anti-CD25, könnten daher wirkungsvolle Therapieoptionen sein. Bei Patienten mit Typ-1 Diabetes wurde bereits ein humanisierter anti-CD3 Antikörper (Otelixizumab bzw. Teplizumab) erfolgreich getestet. Die nicht mitogene Form des Antikörpers hatte wenige toxische Nebenwirkungen und eine kurzfristige Behandlung verbesserte die Insulinproduktion und senkte den Insulinbedarf für mindestens 12 Monate (Herold et al. 2002; Keymeulen et al. 2005; Keymeulen et al. 2010). Auch in den diabetogenen NOD-Mäusen verzögert eine Behandlung mit anti-CD3 das Eintreten der Erkrankung oder führte zu einer kompletten Remission der Diabetes (Chatenoud et al. 1990). Ein länger anhaltender Schutz vor Diabetes wurde dabei in Zusammenhang mit der Expansion von zuvor unterdrückten Treg Populationen gebracht (Nishio et al. 2010). Anti-CD25 (Daclizumab) wird bereits in ersten Studien zur Behandlung von multipler Sklerose eingesetzt und wirkt dabei durch Depletion oder Modulation von

CD25⁺Tregs bzw. Effektorzellen (Couper et al. 2007; Wynn et al. 2010). Das anti-CD3 F(ab)₂ Fragment oder ein anti-CD25 Antikörper (PC61) bzw. F(ab)₂ Fragment sollten nach etablierter Autoimmunhepatitis in den NOD-Mäusen getestet werden. Antigen-spezifische Interventionen wie z.B. antigen-spezifische Tregs sind derzeit im Fokus der Forschung zur Behandlung von Transplantatabstoßungen und anderen Autoimmunerkrankungen und stellen eine weitere Therapieoption dar (Longhi et al. 2010; Edinger et al. 2011; Wright et al. 2011).

Durch meine Arbeiten ist es erstmals gelungen eine AIH zu induzieren, welche in sehr vielen Aspekten mit der menschlichen AIH vergleichbar ist. Damit wurden erstmalig Mechanismen des Toleranzbruchs gegen Leberantigene durch Umweltfaktoren, sowie der Einfluss der genetischen Prädisposition genauer beschrieben. Die Bedeutung der bisher bekannten Autoantikörper scheint am ehesten diagnostisch zu sein, eine pathogenetische Rolle war in den Versuchen nicht zu erkennen. Hingegen wurden CD4⁺T Zellen als Treiber der chronischen Autoimmunantwort und die regulatorische Funktion der Tregs erstmals schlüssig identifiziert. Das Modell öffnet somit ganz neue Möglichkeiten zum Verständnis der Pathophysiologie des Toleranzbruchs gegen hepatische Antigene sowie zur chronischen Effektorphase und deren Regulation. Es macht darüber hinaus die Entwicklung neuer immunmodulierender oder antigen-spezifischer Therapien zur Behandlung von AIH möglich. Dadurch könnte den Patienten unter Umständen eine chronische, lebenslange Immunsuppression mit ihren Nebenwirkungen erspart bleiben.

Literaturverzeichnis

- Aaltonen, J., P. Björnses, et al. (1997). "An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains." Nat Genet 17(4): 399-403.
- Abbas, K. A., A. H. Lichtman, et al. (2007). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia.
- Alvarez, F., P. A. Berg, et al. (1999). "International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis." J Hepatol 31(5): 929-38.
- Alvarez, F., M. Ciocca, et al. (1999). "Short-term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children." J Hepatol 30(2): 222-7.
- Anderson, M. S. und J. A. Bluestone (2005). "The NOD mouse: a model of immune dysregulation." Annu Rev Immunol 23: 447-85.
- Aqel, B. A., V. Machicao, et al. (2004). "Efficacy of tacrolimus in the treatment of steroid refractory autoimmune hepatitis." J Clin Gastroenterol 38(9): 805-9.
- Araki, K., H. Yamamoto, et al. (1987). "Studies on the pathogenesis of murine experimental autoimmune active hepatitis: sensitized T cell involvement in its induction." Clin Exp Immunol 67(2): 326-34.
- Asano, M., M. Toda, et al. (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med 184(2): 387-96.
- Behar, A. J. und C. Tal (1959). "Experimental liver necrosis produced by the injection of homologous whole liver with adjuvant." J Pathol Bacteriol 77(2): 591-6.
- Beland, K., P. Lapiere, et al. (2009). "Influence of genes, sex, age and environment on the onset of autoimmune hepatitis." World J Gastroenterol 15(9): 1025-34.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, et al. (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function." Annu Rev Immunol 15: 535-62.
- Benihoud, K., P. Yeh, et al. (1999). "Adenovirus vectors for gene delivery." Curr Opin Biotechnol 10(5): 440-7.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet 27(1): 20-1.
- Benten, D., A. Widjaja, et al. (2001). "Autoimmune hepatitis associated with coagulation disorders and immunethyropathy." Z Gastroenterol 39(10): 837-40.
- Berk, L., S. W. Schalm, et al. (1991). "Severe chronic active hepatitis (autoimmune type) mimicked by coinfection of hepatitis C and human immunodeficiency viruses." Gut 32(10): 1198-200.
- Bertolino, P., A. Schrage, et al. (2005). "Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice." Hepatology 42(5): 1063-71.
- Bertolino, P., M. C. Trescol-Biemont, et al. (1998). "Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival." Eur J Immunol 28(1): 221-36.
- Bertolino, P., M. C. Trescol-Biemont, et al. (1999). "Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance." Int Immunol 11(8): 1225-38.
- Biron, C. A. (1998). "Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections." Semin Immunol 10(5): 383-90.
- Bittencourt, P. L., A. C. Goldberg, et al. (1999). "Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2." Am J Gastroenterol 94(7): 1906-13.
- Boberg, K. M., E. Aadland, et al. (1998). "Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population." Scand J Gastroenterol 33(1): 99-103.
- Bogdanos, D. P., P. Invernizzi, et al. (2008). "Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges." World J Gastroenterol 14(21): 3374-87.

- Bowen, D. G., M. Zen, et al. (2004). "The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity." J Clin Invest 114(5): 701-12.
- Brusko, T., C. Wasserfall, et al. (2007). "No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes." Diabetes 56(3): 604-12.
- Cabillic, F., N. Rougier, et al. (2006). "Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response." J Hepatol 44(3): 552-9.
- Calne, R. Y., R. A. Sells, et al. (1969). "Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts." Nature 223(5205): 472-6.
- Casals, J. und P. K. Olitsky (1946). "Tests for hepatic dysfunction of mice." Proc Soc Exp Biol Med 63(2): 383-90.
- Chatenoud, L., C. Ferran, et al. (1990). "In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids." Transplantation 49(4): 697-702.
- Chen, H. D., A. E. Fraire, et al. (2001). "Memory CD8+ T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung." Nat Immunol 2(11): 1067-76.
- Chen, Y. H., N. M. Chiu, et al. (1997). "Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice." Immunity 6(4): 459-67.
- Cianciara, J. und T. Laskus (1995). "Development of transient autoimmune hepatitis during interferon treatment of chronic hepatitis B." Dig Dis Sci 40(8): 1842-4.
- Cook, G. C., R. Mulligan, et al. (1971). "Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis." Q J Med 40(158): 159-85.
- Cookson, S., P. K. Constantini, et al. (1999). "Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis." Hepatology 30(4): 851-6.
- Couper, K. N., D. G. Blount, et al. (2007). "Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice." J Immunol 178(7): 4136-46.
- Crispe, I. N. (2003). "Hepatic T cells and liver tolerance." Nat Rev Immunol 3(1): 51-62.
- Czaja, A. J. (1979). "Serologic markers of hepatitis A and B in acute and chronic liver disease." Mayo Clin Proc 54(11): 721-32.
- Czaja, A. J., H. A. Carpenter, et al. (1993). "Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis." Gastroenterology 105(5): 1502-7.
- Czaja, A. J., R. M. dos Santos, et al. (1998). "Immune phenotype of chronic liver disease." Dig Dis Sci 43(9): 2149-55.
- Czaja, A. J. und D. K. Freese (2002). "Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis." Hepatology 36(2): 479-97.
- Czaja, A. J., M. Kruger, et al. (1997). "Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis." Am J Gastroenterol 92(12): 2197-200.
- Debray, D., G. Maggiore, et al. (1999). "Efficacy of cyclosporin A in children with type 2 autoimmune hepatitis." J Pediatr 135(1): 111-4.
- DeSilva, D. R., K. B. Urdahl, et al. (1991). "Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation." J Immunol 147(10): 3261-7.
- Desmet, V. J., M. Gerber, et al. (1994). "Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging." Hepatology 19(6): 1513-20.
- Dionne, S. O., C. E. Myers, et al. (2004). "Her-2/ neu altered peptide ligand-induced CTL responses: implications for peptides with increased HLA affinity and T-cell-receptor interaction." Cancer Immunol Immunother 53(4): 307-14.
- Donaldson, P. T. (2004). "Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis." Gut 53(4): 599-608.

- Dyall, R., W. B. Bowne, et al. (1998). "Heteroclitic immunization induces tumor immunity." J Exp Med 188(9): 1553-61.
- Edinger, M. und P. Hoffmann (2011). "Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences." Curr Opin Immunol.
- Ferber, I., G. Schonrich, et al. (1994). "Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen." Science 263(5147): 674-6.
- Fiessinger, N. (1908). Histogenèse des processus de cirrhose hépatique. Paris. Medical Doctoral Thesis.
- Fyttili, P., G. N. Dalekos, et al. (2008). "Cross-genotype-reactivity of the immunodominant HCV CD8 T-cell epitope NS3-1073." Vaccine 26(31): 3818-26.
- Gantner, F., M. Leist, et al. (1995). "Tumor necrosis factor-induced hepatic DNA fragmentation as an early marker of T cell-dependent liver injury in mice." Gastroenterology 109(1): 166-76.
- Gantner, F., M. Leist, et al. (1995). "Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor." Hepatology 21(1): 190-8.
- Gorham, J. D., J. T. Lin, et al. (2001). "Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis." J Immunol 166(10): 6413-22.
- Gossmann, J., J. Lohler, et al. (1995). "Murine hepatitis caused by lymphocytic choriomeningitis virus. II. Cells involved in pathogenesis." Lab Invest 72(5): 559-70.
- Gregorio, G. V., B. Portmann, et al. (1997). "Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience." Hepatology 25(3): 541-7.
- Gregory, S. H. und E. J. Wing (1998). "Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections." Immunol Today 19(11): 507-10.
- Groux, H., M. Bigler, et al. (1996). "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." J Exp Med 184(1): 19-29.
- Gueguen, M., A. M. Yamamoto, et al. (1989). "Anti-liver-kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db1." Biochem Biophys Res Commun 159(2): 542-7.
- Guevara-Patino, J. A., M. J. Turk, et al. (2003). "Immunity to cancer through immune recognition of altered self: studies with melanoma." Adv Cancer Res 90: 157-77.
- Hartman, Z. C., D. M. Appledorn, et al. (2008). "Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications." Virus Res 132(1-2): 1-14.
- Hegenbarth, S., R. Gerolami, et al. (2000). "Liver sinusoidal endothelial cells are not permissive for adenovirus type 5." Hum Gene Ther 11(3): 481-6.
- Hennes, E. M., Y. H. Oo, et al. (2008). "Mycophenolate mofetil as second line therapy in autoimmune hepatitis?" Am J Gastroenterol 103(12): 3063-70.
- Hennes, E. M., M. Zeniya, et al. (2008). "Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis." Hepatology 48(1): 169-76.
- Herkel, J., B. Jagemann, et al. (2003). "MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes." Hepatology 37(5): 1079-85.
- Herold, K. C., W. Hagopian, et al. (2002). "Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus." N Engl J Med 346(22): 1692-8.
- Holdener, M., E. Hintermann, et al. (2008). "Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection." J Exp Med 205(6): 1409-22.
- Holz, L. E., A. Warren, et al. (2010). "CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes." J Autoimmun 34(1): 15-22.

- Isogawa, M., Y. Furuichi, et al. (2005). "Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver." *Immunity* 23(1): 53-63.
- Itoh, Y., A. Morita, et al. (2001). "Time course profile and cell-type-specific production of monokine induced by interferon-gamma in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice: comparative study with interferon-inducible protein-10." *Scand J Gastroenterol* 36(12): 1344-51.
- Jacobson, D. L., S. J. Gange, et al. (1997). "Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States." *Clin Immunol Immunopathol* 84(3): 223-43.
- Jaeckel, E. (2002). "Animal models of autoimmune hepatitis." *Semin Liver Dis* 22(4): 325-38.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." *Immunol Today* 13(1): 11-6.
- Jiang, W., M. S. Anderson, et al. (2005). "Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency." *J Exp Med* 202(6): 805-15.
- Jones-Youngblood, S. L., K. Wieties, et al. (1990). "Effect of the expression of a hepatocyte-specific MHC molecule in transgenic mice on T cell tolerance." *J Immunol* 144(4): 1187-95.
- Kakimi, K., L. G. Guidotti, et al. (2000). "Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo." *J Exp Med* 192(7): 921-30.
- Kalyuzhniy, O., N. C. Di Paolo, et al. (2008). "Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(14): 5483-8.
- Kanzler, S., G. Gerken, et al. (1997). "Cyclophosphamide as alternative immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis--report of three cases." *Z Gastroenterol* 35(7): 571-8.
- Keymeulen, B., E. Vandemeulebroucke, et al. (2005). "Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes." *N Engl J Med* 352(25): 2598-608.
- Keymeulen, B., M. Walter, et al. (2010). "Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass." *Diabetologia* 53(4): 614-23.
- Khanna, A., A. E. Morelli, et al. (2000). "Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo." *J Immunol* 164(3): 1346-54.
- Khoruts, A., L. Stahnke, et al. (1991). "Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients." *Hepatology* 13(2): 267-76.
- Kirk, A. P., S. Jain, et al. (1980). "Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis." *Gut* 21(1): 78-83.
- Klein, L. und B. Kyewski (2000). "'Promiscuous' expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity?" *J Mol Med* 78(9): 483-94.
- Klugewitz, K., D. H. Adams, et al. (2004). "The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?" *Trends Immunol* 25(11): 590-4.
- Klugewitz, K., F. Blumenthal-Barby, et al. (2002). "Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization." *J Immunol* 169(5): 2407-13.
- Knolle, P., J. Schlaak, et al. (1995). "Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge." *J Hepatol* 22(2): 226-9.
- Knolle, P. A., E. Schmitt, et al. (1999). "Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells." *Gastroenterology* 116(6): 1428-40.
- Kossling, F. K. und B. Meyer zum (1968). "[On the induction of an active chronic hepatitis by heterologic soluble liver proteins]." *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 345(4): 365-76.

- Kroemer, A., K. Edtinger, et al. (2008). "The innate natural killer cells in transplant rejection and tolerance induction." Curr Opin Organ Transplant 13(4): 339-43.
- Kruse, N., K. Neumann, et al. (2009). "Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis." Hepatology 50(6): 1904-13.
- Kukreja, A., G. Cost, et al. (2002). "Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes." J Clin Invest 109(1): 131-40.
- Kumagai, K., K. Takeda, et al. (1997). "Interleukin-12 as an inducer of cytotoxic effectors in anti-tumor immunity." Int Rev Immunol 14(2-3): 229-56.
- Kuriki, J., H. Murakami, et al. (1983). "Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*." Gastroenterology 84(3): 596-603.
- Kusters, S., F. Gantner, et al. (1996). "Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A." Gastroenterology 111(2): 462-71.
- Lahl, K., C. Loddenkemper, et al. (2007). "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease." J Exp Med 204(1): 57-63.
- Lan, R. Y., C. Cheng, et al. (2006). "Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis." Hepatology 43(4): 729-37.
- Lapierre, P., K. Beland, et al. (2006). "Type 2 autoimmune hepatitis murine model: the influence of genetic background in disease development." J Autoimmun 26(2): 82-9.
- Lapierre, P., K. Beland, et al. (2010). "Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis." Hepatology 51(5): 1789-98.
- Lapierre, P., I. Djilali-Saiah, et al. (2004). "A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunization with human antigens." Hepatology 39(4): 1066-74.
- Lapierre, P., O. Hajoui, et al. (1999). "Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis." Gastroenterology 116(3): 643-9.
- Laskus, T. und J. Slusarczyk (1989). "Autoimmune chronic active hepatitis developing after acute type B hepatitis." Dig Dis Sci 34(8): 1294-7.
- Lau, A. H. und A. W. Thomson (2003). "Dendritic cells and immune regulation in the liver." Gut 52(2): 307-14.
- Leist, M., F. Gantner, et al. (1995). "Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models." Am J Pathol 146(5): 1220-34.
- Leite-De-Moraes, M. C., A. Hameg, et al. (2001). "IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells." J Immunol 166(2): 945-51.
- Leiter, E. H., M. Prochazka, et al. (1987). "The non-obese diabetic (NOD) mouse." Am J Pathol 128(2): 380-3.
- Lemmers, A., C. Moreno, et al. (2009). "The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease." Hepatology 49(2): 646-57.
- Li, W., C. S. Kuhr, et al. (2008). "New insights into mechanisms of spontaneous liver transplant tolerance: the role of Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells." Am J Transplant 8(8): 1639-51.
- Li, X. C. (2010). "The significance of non-T-cell pathways in graft rejection: implications for transplant tolerance." Transplantation 90(10): 1043-7.
- Limmer, A., T. Sacher, et al. (1998). "Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment." Eur J Immunol 28(8): 2395-406.
- Liu, F., Y. Song, et al. (1999). "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA." Gene Ther 6(7): 1258-66.

- Lohse, A. W., S. Brunner, et al. (1992). "Autoantibodies in experimental autoimmune hepatitis." J Hepatol 14(1): 48-53.
- Lohse, A. W., H. P. Dienes, et al. (1998). "Suppression of murine experimental autoimmune hepatitis by T-cell vaccination or immunosuppression." Hepatology 27(6): 1536-43.
- Lohse, A. W., P. A. Knolle, et al. (1996). "Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells." Gastroenterology 110(4): 1175-81.
- Lohse, A. W., M. Manns, et al. (1990). "Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity." Hepatology 11(1): 24-30.
- Lohse, A. W. und K. H. Meyer zum Buschenfelde (1993). "Remission of experimental autoimmune hepatitis is associated with antigen-specific and non-specific immunosuppression." Clin Exp Immunol 94(1): 163-7.
- Longerich, T., C. Flechtenmacher, et al. (2008). "[Quality and quantity in hepatopathology. Diagnostic and clinically relevant grading for non-tumourous liver diseases]." Pathologe 29(1): 15-26.
- Longhi, M. S., M. J. Hussain, et al. (2007). "Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2." Hepatology 46(2): 472-84.
- Longhi, M. S., M. J. Hussain, et al. (2010). "Autoantigen-specific regulatory T cells, a potential tool for immune-tolerance reconstitution in type-2 autoimmune hepatitis." Hepatology.
- Longhi, M. S., M. J. Hussain, et al. (2006). "Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis." J Immunol 176(7): 4484-91.
- Longhi, M. S., Y. Ma, et al. (2004). "Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease." J Hepatol 41(1): 31-7.
- Longhi, M. S., Y. Ma, et al. (2010). "Adaptive immunity in autoimmune hepatitis." Dig Dis 28(1): 63-9.
- Lu, L., C. A. Bonham, et al. (2001). "Liver-derived DEC205+B220+CD19- dendritic cells regulate T cell responses." J Immunol 166(12): 7042-52.
- Lyons, P. A., N. Armitage, et al. (2000). "Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, *Idd3*, to a 780-kb region of mouse chromosome 3: identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping." Genome Res 10(4): 446-53.
- Lyons, P. A., W. W. Hancock, et al. (2000). "The NOD *Idd9* genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of *Cd30*, *Tnfr2*, and *Cd137*." Immunity 13(1): 107-15.
- Maggiore, G., O. Bernard, et al. (1986). "Liver disease associated with anti-liver-kidney microsome antibody in children." J Pediatr 108(3): 399-404.
- Maggiore, G., F. Veber, et al. (1993). "Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents." J Pediatr Gastroenterol Nutr 17(4): 376-81.
- Manns, M. P. und M. J. Bahr (2000). "Recurrent autoimmune hepatitis after liver transplantation-when non-self becomes self." Hepatology 32(4 Pt 1): 868-70.
- Manns, M. P., K. J. Griffin, et al. (1991). "LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase." J Clin Invest 88(4): 1370-8.
- Manns, M. P. und C. P. Strassburg (2001). "Autoimmune hepatitis: clinical challenges." Gastroenterology 120(6): 1502-17.
- Manns, M. P., M. Woynarowski, et al. (2010). "Budesonide induces remission more effectively than prednisone in a controlled trial of patients with autoimmune hepatitis." Gastroenterology 139(4): 1198-206.
- Many, M. C., S. Maniratunga, et al. (1996). "The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis." Exp Clin Endocrinol Diabetes 104 Suppl 3: 17-20.
- Maron, R., W. W. Hancock, et al. (1999). "Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines." Int Immunol 11(9): 1573-80.

- Martinez-Llordella, M., J. J. Lozano, et al. (2008). "Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients." J Clin Invest 118(8): 2845-57.
- Matsui, K., T. Yoshimoto, et al. (1997). "Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells." J Immunol 159(1): 97-106.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol 12: 991-1045.
- Maul, J., C. Loddenkemper, et al. (2005). "Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease." Gastroenterology 128(7): 1868-78.
- McCuskey, R. S. und F. D. Reilly (1993). "Hepatic microvasculature: dynamic structure and its regulation." Semin Liver Dis 13(1): 1-12.
- McNab, G., J. L. Reeves, et al. (1996). "Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium." Gastroenterology 110(2): 522-8.
- Mehal, W. Z., A. E. Juedes, et al. (1999). "Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver." J Immunol 163(6): 3202-10.
- Meyer zum Buschenfelde, K. H., F. K. Kossling, et al. (1972). "Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins." Clin Exp Immunol 11(1): 99-108.
- Mistilis, S. P., A. P. Skyring, et al. (1968). "Natural history of active chronic hepatitis. I. Clinical features, course, diagnostic criteria, morbidity, mortality and survival." Australas Ann Med 17(3): 214-23.
- Mitchell, C. und H. Willenbring (2008). "A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice." Nat Protoc 3(7): 1167-70.
- Mix, H., C. Weiler-Normann, et al. (2008). "Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis." Gastroenterology 135(6): 2107-18.
- Monteiro, M., C. F. Almeida, et al. (2010). "Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta." J Immunol 185(4): 2157-63.
- Morahan, G., F. E. Brennan, et al. (1989). "Expression in transgenic mice of class I histocompatibility antigens controlled by the metallothionein promoter." Proc Natl Acad Sci U S A 86(10): 3782-6.
- Moretta, L., E. Ciccone, et al. (1994). "Ontogeny, specific functions and receptors of human natural killer cells." Immunol Lett 40(2): 83-8.
- Mori, T., Y. Mori, et al. (1985). "Cell-mediated cytotoxicity of sensitized spleen cells against target liver cells--in vivo and in vitro study with a mouse model of experimental autoimmune hepatitis." Hepatology 5(5): 770-7.
- Mori, Y., T. Mori, et al. (1985). "Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice: transfer of spleen cells sensitized with liver proteins." Clin Exp Immunol 61(3): 577-84.
- Mori, Y., T. Mori, et al. (1984). "Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice." Clin Exp Immunol 57(1): 85-92.
- Morsy, M. A., P. J. Norman, et al. (2005). "Isolation, purification and flow cytometric analysis of human intrahepatic lymphocytes using an improved technique." Lab Invest 85(2): 285-96.
- Mottonen, M., J. Heikkinen, et al. (2005). "CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis." Clin Exp Immunol 140(2): 360-7.
- Murakami, J., Y. Shimizu, et al. (1999). "Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C." Hepatology 30(1): 143-50.
- Murthy, K., P. Travers, et al. (2008). Janeway's Immunobiology. New York, Garland Science.
- Muruve, D. A., M. J. Barnes, et al. (1999). "Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo." Hum Gene Ther 10(6): 965-76.

- Nietsch, H. H., B. S. Libman, et al. (2000). "Minocycline-induced hepatitis." Am J Gastroenterol 95(10): 2993-5.
- Nishimoto, H., H. Kikutani, et al. (1987). "Prevention of autoimmune insulinitis by expression of I-E molecules in NOD mice." Nature 328(6129): 432-4.
- Nishimura, T. und A. Ohta (1999). "A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice." J Immunol 162(11): 6503-9.
- Nishio, J., M. Feuerer, et al. (2010). "Anti-CD3 therapy permits regulatory T cells to surmount T cell receptor-specified peripheral niche constraints." J Exp Med 207(9): 1879-89.
- Obermayer-Straub, P., J. Perheentupa, et al. (2001). "Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy." Gastroenterology 121(3): 668-77.
- Oldstone, M. B., M. Nerenberg, et al. (1991). "Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response." Cell 65(2): 319-31.
- Oo, Y. H., S. G. Hubscher, et al. (2010). "Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management." Hepatol Int 4(2): 475-93.
- Peiseler, M., M. Sebode, et al. (2011). The frequencies of Foxp3+ regulatory T cells in livers and peripheral blood of type I autoimmune hepatitis patients correlate with inflammatory activity. GASL 2011, 27. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Regensburg.
- Petrelli, M. und P. J. Scheuer (1967). "Variation in subcapsular liver structure and its significance in the interpretation of wedge biopsies." J Clin Pathol 20(5): 743-8.
- Pillarsetty, V. G., A. B. Shah, et al. (2004). "Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition." J Immunol 172(2): 1009-17.
- Poralla, T., U. Treichel, et al. (1991). "The asialoglycoprotein receptor as target structure in autoimmune liver diseases." Semin Liver Dis 11(3): 215-22.
- Racanelli, V. und B. Rehermann (2006). "The liver as an immunological organ." Hepatology 43(2 Suppl 1): S54-62.
- Rahaman, S. M., P. Chira, et al. (1994). "Idiopathic autoimmune chronic hepatitis triggered by hepatitis A." Am J Gastroenterol 89(1): 106-8.
- Ramsey, C., O. Winqvist, et al. (2002). "Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response." Hum Mol Genet 11(4): 397-409.
- Read, A. E., S. Sherlock, et al. (1963). "Active 'Juvenile' Cirrhosis Considered as Part of a Systemic Disease and the Effect of Corticosteroid Therapy." Gut 4: 378-93.
- Reijonen, H., R. Mallone, et al. (2004). "GAD65-specific CD4+ T-cells with high antigen avidity are prevalent in peripheral blood of patients with type 1 diabetes." Diabetes 53(8): 1987-94.
- Ridgway, W. M. (2006). "Dissecting genetic control of autoimmunity in NOD congenic mice." Immunol Res 36(1-3): 189-95.
- Ridgway, W. M. und C. G. Fathman (2001). "Understanding the interaction of genetics and cellular responses in nonobese diabetic mice." Curr Dir Autoimmun 4: 218-38.
- Robertson, D. A., S. L. Zhang, et al. (1987). "Persistent measles virus genome in autoimmune chronic active hepatitis." Lancet 2(8549): 9-11.
- Russo, M. W., M. Scobey, et al. (2009). "Drug-induced liver injury associated with statins." Semin Liver Dis 29(4): 412-22.
- Sacher, T., P. Knolle, et al. (2002). "CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T-cell-mediated autoaggression against hepatocytes." Eur J Immunol 32(12): 3628-37.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-91.

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol 155(3): 1151-64.
- Scheiffarth, F., H. Warnatz, et al. (1967). "Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis." J Immunol 98(2): 396-401.
- Scheiffarth, F., H. Warnatz, et al. (1965). "[Animal experiment studies on the pathogenesis of chronic hepatitis. I. Morphological liver studies following sensitization with homologous liver cell fractions]." Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 339(4): 358-63.
- Schenk, S., D. D. Kish, et al. (2005). "Alloreactive T cell responses and acute rejection of single class II MHC-disparate heart allografts are under strict regulation by CD4+ CD25+ T cells." J Immunol 174(6): 3741-8.
- Scheuer, P. J. (1991). "Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment." J Hepatol 13(3): 372-4.
- Schurich, A., M. Berg, et al. (2010). "Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells." J Immunol 184(8): 4107-14.
- Senaldi, G., B. Portmann, et al. (1992). "Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis." Arch Dis Child 67(12): 1447-53.
- Sheth, K. und P. Bankey (2001). "The liver as an immune organ." Curr Opin Crit Care 7(2): 99-104.
- Shimoda, S., M. Nakamura, et al. (1995). "HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases." J Exp Med 181(5): 1835-45.
- Sinha, A. A., M. T. Lopez, et al. (1990). "Autoimmune diseases: the failure of self tolerance." Science 248(4961): 1380-8.
- Slansky, J. E., F. M. Rattis, et al. (2000). "Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex." Immunity 13(4): 529-38.
- Steffan, A. M., J. L. Gendrault, et al. (1986). "Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells." Hepatology 6(5): 830-6.
- Strassburg, C. P. und M. P. Manns (2002). "Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis." Semin Liver Dis 22(4): 339-52.
- Strassburg, C. P. und M. P. Manns (2009). "[Liver transplantation: indications and results]." Internist (Berl) 50(5): 550-60.
- Strassburg, C. P. und M. P. Manns (2009). "Treatment of autoimmune hepatitis." Semin Liver Dis 29(3): 273-85.
- Strassburg, C. P., P. Obermayer-Straub, et al. (1996). "Autoimmunity in hepatitis C and D virus infection." J Viral Hepat 3(2): 49-59.
- Strassburg, C. P., P. Obermayer-Straub, et al. (2000). "Autoimmunity in liver diseases." Clin Rev Allergy Immunol 18(2): 127-39.
- Strettell, M. D., P. T. Donaldson, et al. (1997). "Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis." Gastroenterology 112(6): 2028-35.
- Teufel, A., M. Worns, et al. (2006). "Genetic association of autoimmune hepatitis and human leucocyte antigen in German patients." World J Gastroenterol 12(34): 5513-6.
- Thalen, A. und R. Brattsand (1979). "Synthesis and anti-inflammatory properties of budesonide, a new non-halogenated glucocorticoid with high local activity." Arzneimittelforschung 29(11): 1687-90.
- Thomas, C. E., A. Ehrhardt, et al. (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." Nat Rev Genet 4(5): 346-58.
- Tiegs, G., J. Hentschel, et al. (1992). "A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A." J Clin Invest 90(1): 196-203.
- Tisch, R. und H. McDevitt (1996). "Insulin-dependent diabetes mellitus." Cell 85(3): 291-7.

- Treichel, U., G. Gerken, et al. (1993). "Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: effects of therapy in autoimmune and virus-induced chronic active hepatitis." J Hepatol 19(1): 55-63.
- Tseng, C. T., E. Miskovsky, et al. (2001). "Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections." Hepatology 33(5): 1312-20.
- Ueda, H., J. M. Howson, et al. (2003). "Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease." Nature 423(6939): 506-11.
- Van Leest, Y. (2011). "No evidence for involvement of donor NK cells in liver transplant tolerance." Transpl Immunol 24(2): 138-9.
- Van Thiel, D. H., H. Wright, et al. (1995). "Tacrolimus: a potential new treatment for autoimmune chronic active hepatitis: results of an open-label preliminary trial." Am J Gastroenterol 90(5): 771-6.
- Vento, S., F. Cainelli, et al. (1997). "Autoimmune hepatitis type 2 induced by HCV and persisting after viral clearance." Lancet 350(9087): 1298-9.
- Vento, S., T. Garofano, et al. (1991). "Identification of hepatitis A virus as a trigger for autoimmune chronic hepatitis type 1 in susceptible individuals." Lancet 337(8751): 1183-7.
- Vento, S., C. Renzini, et al. (1997). "Infection with hepatitis G virus in immunoglobulin recipients." Lancet 349(9046): 206-7.
- Vitozzi, S., I. Djilali-Saiah, et al. (2002). "Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis." Autoimmunity 35(8): 485-92.
- Voehringer, D., C. Blaser, et al. (2000). "Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis." J Immunol 165(5): 2415-22.
- Vogel, A., E. Heinrich, et al. (2004). "Long-term outcome of liver transplantation for autoimmune hepatitis." Clin Transplant 18(1): 62-9.
- Vyse, T. J. und J. A. Todd (1996). "Genetic analysis of autoimmune disease." Cell 85(3): 311-8.
- Waddington, S. N., J. H. McVey, et al. (2008). "Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer." Cell 132(3): 397-409.
- Waldenstrom, J. (1950). "Leber, Blutproteine und Nahrungseiweisse Waldenström J. Leber, Blutproteine und Nahrungseiweisse. Dtsch Gesellsch Verd Stoffw 1950; 15:113-119." Dtsch Gesellsch Verd Stoffw 15: 113-29.
- Ward, S. M., B. C. Fox, et al. (2007). "Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection." J Hepatol 47(3): 316-24.
- Warren, A., D. G. Le Couteur, et al. (2006). "T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells." Hepatology 44(5): 1182-90.
- Watanabe, T., H. Katsukura, et al. (2003). "A liver tolerates a portal antigen by generating CD11c+ cells, which select Fas ligand+ Th2 cells via apoptosis." Hepatology 38(2): 403-12.
- Watanabe, Y., H. Kawakami, et al. (1987). "Effect of neonatal thymectomy on experimental autoimmune hepatitis in mice." Clin Exp Immunol 67(1): 105-13.
- Wedemeyer, H., E. Mizukoshi, et al. (2001). "Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells." J Virol 75(23): 11392-400.
- Wicker, L. S., J. A. Todd, et al. (1995). "Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse." Annu Rev Immunol 13: 179-200.
- Wiegand, C., P. Wolint, et al. (2007). "Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance." Gastroenterology 133(6): 2010-8.
- Wietes, K., R. E. Hammer, et al. (1990). "Peripheral tolerance in mice expressing a liver-specific class I molecule: inactivation/deletion of a T-cell subpopulation." Proc Natl Acad Sci U S A 87(17): 6604-8.

- Winau, F., G. Hegasy, et al. (2007). "Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses." Immunity 26(1): 117-29.
- Wisse, E. (1970). "An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids." J Ultrastruct Res 31(1): 125-50.
- Wright, G. P., M. R. Ehrenstein, et al. (2011). "Regulatory T-cell adoptive immunotherapy: potential for treatment of autoimmunity." Expert Rev Clin Immunol 7(2): 213-25.
www.biolegend.com.Mouse Alloantigens, BioLegend.
www.jaxmice.jax.org, The Jackson Laboratory.
- Wynn, D., M. Kaufman, et al. (2010). "Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta." Lancet Neurol 9(4): 381-90.
- Yamaguchi, T., K. Kawabata, et al. (2007). "Role of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by serotype 5 adenoviral vectors." Hum Gene Ther 18(8): 753-62.
- Yoshino, H., T. Ueda, et al. (2000). "Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice." Bone Marrow Transplant 26(11): 1211-6.
- Yuan, J., S. Palioura, et al. (2006). "RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea." Proc Natl Acad Sci U S A 103(50): 18923-7.
- Zakim, D., T. D. Boyer, et al. (2006). Hepatology. Philadelphia, Elsevier.
- Zhang, G., V. Budker, et al. (1999). "High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA." Hum Gene Ther 10(10): 1735-7.
- Zhang, L., X. Q. Yang, et al. (2010). "Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity." Clin Immunol 135(1): 108-17.
- Zierden, M., E. Kuhnen, et al. (2010). "Effects and regulation of autoreactive CD8+ T cells in a transgenic mouse model of autoimmune hepatitis." Gastroenterology 139(3): 975-86, 986 e1-3.

Anhang

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name KATJA FISCHER
Geburtsdatum 12.08.1981
Geburtsort Rostock

BILDUNGSWEG

- Okt. 2007 – Okt. 2011 Promotionsstudium in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule Hannover; Thema der Dissertation: *Charakterisierung leberspezifischer Immunantworten bei chronischer autoimmuner Hepatitis in einem neuen Mausmodell*
- Jan. 2006 – Okt. 2007 Promotionsstudium in der Abteilung für Vaskuläre Onkologie und Metastasierung, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg; Thema der Dissertation: *Charakterisierung der Mechanismen der Metastasierung in einem murinen Brustkrebsmodell*
- Okt. 2000 – Okt. 2005 Studium, Studiengang: Humanbiologie (Diplom) an der Ernst Moritz Arndt Universität, Greifswald; Hauptfach: Molekular- und Zellbiologie; Nebenfächer: Immunologie, Pharmakologie; Thema der Diplomarbeit: *Analyse der Stress-induzierten Genexpression von Peroxiredoxin 1*
- 15. Juli 2000 Abitur, Leistungskurse: Biologie und Mathematik, Gymnasium Sanitz, Sanitz

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN & PRAKTIKA

- seit Okt. 2011 Clinical Research Associate am Hannover Clinical Trial Center (HCTC), Hannover
- Feb. – April 2004 Forschungsprojekt in der Abteilung für „Mother & Child Health Sciences“, Universität von Dundee, Schottland
- Okt. 2003 – Feb. 2004 Studententische Hilfskraft, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Ernst Moritz Arndt Universität, Greifswald
- Aug. – Okt. 2003 Praktikum in der Abteilung für Tumorgenetik, Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin
- Sept. 2001 Krankenpflegepraktikum in den Abteilungen Kardiologie und Nephrologie, Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock

Danksagung

Mein Dank gilt zu allererst Dr. Elmar Jäckel, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe an diesem spannenden Projekt zu arbeiten und mich über die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit hinweg als wissenschaftlicher Mentor förderte.

Weiterhin danke ich Dr. Matthias Hardtke-Wolenski für die nette wissenschaftliche Betreuung der letzten vier Jahre.

Ein großes Dankeschön geht an alle meine Kollegen der Arbeitsgruppen Jäckel und Bantel für das familiäre Arbeitsklima im Labor und im Büro. Maren, Kostas und Artur danke ich darüber hinaus ganz lieb für ihre Unterstützung im Labor, z.B. für die unzähligen Gewebeschnitte und Western Blots sowie die Geduld beim Freundschaftsschießen mit meinen Mäuis.

Ich danke außerdem Dr. Florian Kühnel, Dr. Norman Woller und der Arbeitsgruppe Kubicka für ihre zahlreichen Ratschläge und ihre Hilfe bei der Präparation der Adenoviren.

Für die schöne Zeit und den Spaß bei sowie nach der Arbeit aber auch für ihre Aufmunterungen beim Bruch der Frustration, danke ich ganz besonders herzlich Artur, Dennis, Elvira, Maren und Nadja sowie Sarah und Kristin.

Mein allergrößter Dank aber geht an meine Familie, vor allem an meine Eltern, die mich von klein auf unterstützt und gefördert haben, mir Rückhalt gaben und selbst in schwierigen Zeiten immer für mich da waren.

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung leberspezifischer Immunantworten bei chronischer autoimmuner Hepatitis in einem neuen Mausmodell

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Katja Fischer