

**„Liver-primed T cells“ -  
eine neue Population von Gedächtnis T Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Jan Philipp Böttcher**

aus Köln

Bonn 2013



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für molekulare Medizin und experimentelle  
Immunologie der Universität Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim L. Schultze

Tag der Promotion: 03.07.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vom 03. Juni 2011 im Zeitraum von August 2008 bis März 2013 von Herrn Prof. Dr. Percy Knolle betreut.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
- die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,
- die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Bonn, den 11.03.2013

*Meiner Familie*



Auszüge dieser Arbeit gingen in folgende Publikation ein:

Jan P. Böttcher, Oliver Schanz, Dirk Wohlleber, Zeinab Abdullah, Svenja Debey-Pascher, Andrea Staratschek-Jox, Bastian Höchst, Silke Hegenbarth, Jessica Grell, Andreas Limmer, Imke Atreya, Markus F. Neurath, Dirk H. Busch, Edgar Schmitt, Peter van Endert, Waldemar Kolanus, Christian Kurts, Joachim L. Schultze, Linda Diehl and Percy A. Knolle. Liver-primed memory T cells generated under non-inflammatory conditions provide anti-infectious immunity.

Cell Reports (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.008>, *in press*.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Überblick über das Immunsystem.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 T Zell-vermittelte Immunität.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Antigenpräsentation an T Zellen .....	6
1.2.2 Aktivierung von naiven T Zellen.....	8
1.2.3 Die Differenzierung von naiven CD8 <sup>+</sup> T Zellen in Effektor T Zellen .....	10
<b>1.3 Entwicklung von T Zell-Gedächtnis .....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Die Vorläufer von Gedächtnis T Zellen.....	12
1.3.2 Die Heterogenität von CD8 <sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen .....	14
1.3.3 Transkriptionelle Kontrolle der Entwicklung von CD8 <sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen .....	17
<b>1.4 T Zell-Toleranz .....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Zentrale Toleranz .....	19
1.4.2 Periphere Toleranz.....	20
<b>1.5 Die Leber als immunologisches Organ.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Die antigen-präsentierenden Zellpopulationen der Leber.....	23
1.5.2 Antigenpräsentation und Induktion von peripherer Toleranz in der Leber.....	25
<b>2 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Geräte .....	29
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	30
3.1.3 Allgemeine Lösungen.....	32
3.1.4 Kit Systeme.....	34
3.1.5 Antikörper .....	34
3.1.6 Fluorochrome.....	36
3.1.7 Primer .....	37
3.1.8 Beschichtete Partikel .....	37
3.1.9 Enzyme.....	37
3.1.10 Zytokine und Chemokine .....	38

3.1.11	Zelllinien.....	38
3.1.12	Mauslinien .....	38
3.1.13	Rekombinante Bakterien und Viren.....	39
3.1.14	Computersoftware .....	40
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Isolation von primären murinen Zellen .....	41
3.2.2	Zellkultur .....	44
3.2.3	Herstellung von [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären .....	45
3.2.4	Stimulation von T Zellen <i>in vivo</i> .....	46
3.2.5	Funktionelle Analysen von T Zellen <i>in vitro</i> .....	51
3.2.6	Durchflusszytometrie.....	54
3.2.7	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	56
3.2.8	Quantitative Real-Time PCR.....	56
3.2.9	Analyse der globalen Genexpression von CD8 <sup>+</sup> T Zellen.....	57
3.2.10	Statistik.....	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
4.1	<b>Die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC induziert eine eigenständige CD8<sup>+</sup> T Zell-Population.....</b>	<b>61</b>
4.2	<b>CD8<sup>+</sup> T Zellen wandern nach Stimulation durch LSEC in lymphatische Organe</b>	<b>65</b>
4.3	<b>LSEC-stimulierten T Zellen besitzen Eigenschaften von Gedächtnis T Zellen ..</b>	<b>69</b>
4.4	<b>Die Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen in Effektor T Zellen beruht auf einem bestimmten molekularen Mechanismus .....</b>	<b>75</b>
4.5	<b>Die Effektorfunktionen von LSEC-stimulierten T Zellen und Gedächtnis T Zellen sind verschieden stark ausgeprägt.....</b>	<b>80</b>
4.6	<b>Die Neuropilin-1-Expression unterscheidet zwischen LSEC-stimulierten T Zellen und TCM.....</b>	<b>84</b>
4.7	<b>Die Stimulation naiver CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC trägt zur Abwehr von Infektionen bei .....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
5.1	<b>Die Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC induziert weder T Zell-Deletion noch T Zell-Toleranz.....</b>	<b>92</b>
5.2	<b>LSEC-stimulierte T Zellen besitzen ein hohes Potential zur Differenzierung in Effektor T Zellen .....</b>	<b>96</b>

<b>5.3</b>	<b>Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Entwicklung von LSEC-stimulierten T Zellen und TCM .....</b>	<b>98</b>
<b>5.4</b>	<b>Der molekulare Mechanismus der Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen .....</b>	<b>101</b>
<b>5.5</b>	<b>Die Rolle von LSEC-stimulierten T Zellen in der Immunabwehr gegen Pathogene .....</b>	<b>106</b>
<b>5.6</b>	<b>Neuropilin-1 als Marker für LSEC-stimulierte T Zellen .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>133</b>



## Zusammenfassung

Die lokalen antigen-präsentierenden Zellen (APC) der Leber sind konstant zirkulierenden Antigenen mit unbekannter Herkunft ausgesetzt. Solche löslichen Antigene werden bevorzugt von sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) aufgenommen, die als APC fungieren und diese Antigene effizient an naive  $CD8^+$  T Zellen kreuzpräsentieren. Dieser Prozess findet unter nicht-inflammatorischen Bedingungen statt und führt nicht zur Entstehung von zytotoxischen Effektor T Zellen.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Interaktion von naiven  $CD8^+$  T Zellen mit kreuzpräsentierenden LSEC detailliert untersucht. Hierbei zeigte sich, dass von LSEC stimulierte naive  $CD8^+$  T Zellen trotz der Abwesenheit von Inflammation und kostimulatorischen Signalen nicht eliminiert wurden, während die Stimulation durch unreife dendritische Zellen (DC) zum Tod naiver  $CD8^+$  T Zellen führte. Vielmehr erwarben LSEC-stimulierte T Zellen einen bisher nicht bekannten Differenzierungszustand, der Gemeinsamkeiten mit zentralen Gedächtnis T Zellen (TCM) aufwies. So wanderten LSEC-stimulierte T Zellen kurz nach ihrer Stimulation in der Leber in lymphatische Gewebe ein und entwickelten das Potential, neue Effektor T Zellen zu generieren. Für die Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen wurden neben T Zell Rezeptor-vermittelten Signalen kostimulatorische Signale über CD28 und IL-12 benötigt. Weitere Versuche zeigten, dass von LSEC-stimulierten T Zellen abstammende Effektor T Zellen fähig waren, zur Bekämpfung einer Infektion unter inflammatorischen Bedingungen beizutragen.

Insgesamt zeigen die hier präsentierten Ergebnisse erstmals, dass die Stimulation von naiven  $CD8^+$  T Zellen durch LSEC im Gegensatz zur Stimulation naiver  $CD8^+$  T Zellen durch unreife DC eine T Zell-vermittelte Immunantwort gegen zuvor zirkulierende Antigene unterstützt. Sie stellt daher nicht wie bisher vermutet die Induktion von peripherer Toleranz dar. Diese bisher unbekannt Funktion von organresidenten APC der Leber ermöglicht vermutlich eine Anpassung des T Zell-Repertoires an zirkulierende Antigene unter nicht-inflammatorischen Bedingungen. Dieser Vorgang könnte in bestimmten pathologischen Situationen wie bei Tumoren oder viralen Infektionen von Bedeutung sein, wenn Antigene systemische verteilt werden, ohne eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems hervorzurufen. Die durch LSEC verhinderte Elimination von pathogen-spezifischen  $CD8^+$  T Zellen aus dem T Zell-Repertoire würde unter diesen Umständen eine spätere pathogen-spezifische T Zell-Antwort ermöglichen.



## Abstract

The local antigen-presenting cells (APC) within the liver are constantly exposed to circulating antigens of unknown origin. Such soluble antigens are preferentially taken up by liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) which function as APC and efficiently cross-present these antigens to naive CD8<sup>+</sup> T cells. This process occurs under non-inflammatory conditions and does not lead to the development of cytotoxic effector T cells. In this study, the consequences of the interaction between naive CD8<sup>+</sup> T cells and cross-presenting LSEC were analyzed. Naïve CD8<sup>+</sup> T cells stimulated by LSEC were not eliminated, although inflammation and costimulatory signals were absent during T cell priming. In contrast, priming of naïve CD8<sup>+</sup> T cells by immature dendritic cells (DC) resulted in T cell deletion. LSEC-primed T cells acquired a so far unknown differentiation state that shared several characteristics with central memory T cells (TCM). Just like TCM, LSEC-stimulated T cells resided in secondary lymphoid organs shortly after their generation in the liver. Furthermore, LSEC-stimulated T cells developed the potential to generate new effector T cells. The reactivation of LSEC-primed T cells relied on a combination of TCR-mediated signals and costimulatory signals by CD28 and IL-12. Further experiments demonstrated that the effector T cells derived from LSEC-stimulated T cells were able to combat viral or bacterial infections under inflammatory conditions. In summary, these data show for the first time that the stimulation of naive CD8<sup>+</sup> T cells by LSEC but not immature DC supports T cell mediated immunity against previously circulating antigens. Thus, the priming of naive CD8<sup>+</sup> T cells by LSEC does not result in the induction of peripheral T cell tolerance.

This so far unknown function of organ-resident APC in the liver might allow the adaptation of the T cell repertoire towards circulating antigens. This process might be of importance in certain pathologic situations such as tumors or viral infections, when antigens are distributed systemically but do not cause innate immune activation. Under these circumstances, the initial rescue of pathogen-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells by LSEC might be a precondition for the generation of a pathogen-specific T cell response at later stages.





# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem unseres Körpers schützt vor der Bedrohung durch Erreger wie Viren, Parasiten, Bakterien und Pilzen und bekämpft zudem entartete körpereigene Zellen. Zwei miteinander interagierende Verteidigungssysteme sind dabei von entscheidender Bedeutung: der angeborene (oder innate) Teil des Immunsystems und der erworbene (oder adaptive) Teil des Immunsystems. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, eindringende Pathogene schnell zu eliminieren. Diese schnelle Reaktion basiert vor allem auf der direkten Erkennung von konservierten, fremden Strukturen, die eine potenzielle Bedrohung für den Organismus signalisieren (Janeway and Medzhitov, 2002).

Im Gegensatz dazu ist das adaptive Immunsystem zu einer spezifischen, angepassten Reaktion gegen individuelle Pathogene in der Lage. Ermöglicht wird diese angepasste Reaktion durch eine hohe Variabilität antigen-spezifischer Rezeptoren, welche in ihrer Gesamtheit im Stande sind, beinahe jedes unbekannte Molekül zu erkennen. Die Vielfalt dieser Rezeptoren basiert auf der zufälligen Rearrangierung ihrer kodierenden Gene, wodurch eine nahezu unendliche Anzahl an Rezeptoren generiert wird (Davis and Bjorkman, 1988). Dementsprechend kann das adaptive Immunsystem auch eine Reaktion gegen nicht-konservierte Strukturen von Pathogenen ausüben.

Das adaptive Immunsystem lässt sich ferner in zwei Untereinheiten teilen, die auf zwei Klassen von Immunzellen basiert. So wird die humorale Immunantwort von B Zellen gebildet, die ihren Rezeptor in löslicher Form als Antikörper sezernieren können, was Pathogene bindet und inaktiviert. T Zellen, der zweite Untereinheit des adaptiven Immunsystems, vermitteln die zelluläre Immunantwort: Effektor T Zellen können z.B. Immunzellen aktivieren oder infizierte Zellen gezielt zerstören. Beiden Teilen des adaptiven Immunsystems ist gemein, dass sie nach der erfolgreichen Bekämpfung einer Infektion ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Dieses antigen-spezifische Gedächtnis beruht auf einem langfristigen Überleben von antigen-erfahrenen Lymphozyten, die bei erneuter Infektion mit demselben Pathogen eine beschleunigte und verstärkte Immunantwort gegen das Pathogen ermöglichen (Kaech et al., 2002b).

Es ist hervorzuheben, dass adaptive Immunantworten nicht zwischen selbst und fremd unterscheiden können (Janeway, 1989), was das Risiko der Entstehung von Autoimmunität mit sich bringt. Deshalb müssen die Initiierung und der Verlauf einer adaptiven Immunantwort streng kontrolliert werden.

## 1.2 T Zell-vermittelte Immunität

T Zellen stellen die Effektor Zellen der zellvermittelten, adaptiven Immunantwort dar. Der Rezeptor von T Zellen (TCR<sup>1</sup>) bestimmt ihre Antigen-spezifität, jedoch erkennen T Zellen ihr Antigen nicht direkt, sondern als Komplex aus einem Peptid mit einem MHC Molekül (MHC-Restriktion; Garcia and Adams, 2005). Dieser Peptid:MHC-Komplex befindet sich auf der Oberfläche anderer Zellen des Organismus und wird von diesen an T Zellen präsentiert. Folglich üben T Zellen ihre Funktion nicht direkt auf Pathogene aus, sondern auf andere Zellen des Organismus. Ein Korezeptor – entweder CD4 oder CD8 - unterstützt die TCR-vermittelte Erkennung von Antigenen. Anhand dieser Korezeptoren lassen sich zwei Klassen an T Zellen identifizieren, die ihr Antigen auf unterschiedlichen MHC Molekülen erkennen: CD4<sup>+</sup> T Zellen erkennen Antigene auf MHC Klasse II Molekülen (MHC II), CD8<sup>+</sup> T Zellen auf MHC Klasse I Molekülen (MHC I; Rudolph et al., 2006). Auch üben beide Sorten von T Zellen unterschiedliche Funktionen aus: CD4<sup>+</sup> Effektor T Zellen aktivieren in erster Linie andere Zellen des Immunsystems wie B Zellen und Makrophagen und werden deshalb auch T Helferzellen genannt (Bluestone et al., 2009). CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen sind hingegen in der Lage, infizierte Zellen zu zerstören, daher bezeichnet man sie auch als zytotoxische T Zellen (CTL<sup>2</sup>; Trambas and Griffiths, 2003).

### 1.2.1 Antigenpräsentation an T Zellen

Damit MHC Moleküle mit Peptiden beladen werden können, müssen die jeweiligen Antigene zunächst prozessiert werden. Auf MHC I Molekülen werden Peptide von zytosolischen Antigenen präsentiert. Die Präsentation von Antigenen auf MHC I wird auch in Abwesenheit von Infektionen von allen kernhaltigen Zellen durchgeführt, sodass unter normalen Bedingungen hauptsächlich Selbst-Antigene präsentiert werden. Jedoch führt

---

<sup>1</sup> Engl.: T cell receptor

<sup>2</sup> Engl.: cytotoxic T lymphocytes

solch eine Antigenpräsentation nur dann zur Aktivierung von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen, wenn sie durch professionelle APC durchgeführt wird, die gleichzeitig kostimulatorische Signale vermitteln (Banchereau and Steinman, 1998; Hernandez et al., 2001; Steinman, 2008). Nach Verdau von zytosolischen Proteinen durch das Proteasom werden die entstandenen Peptide ins Endoplasmatische Retikulum transportiert, wo die Beladung auf MHC I Moleküle stattfindet (Rock et al., 2004). Anschließend gelangen die beladenen Peptid:MHC I-Komplexe dann zur Zelloberfläche.

Im Gegensatz zu MHC I Molekülen werden MHC II Moleküle nur durch bestimmte Zelltypen, sogenannte antigen-präsentierende Zellen (APC<sup>3</sup>), exprimiert (Itano and Jenkins, 2003; Steimle et al., 1994). Hierzu gehören vor allen die dendritischen Zellen (DC), aber auch Makrophagen und B Zellen. Professionelle APC nehmen exogene Antigene zunächst in Endosomen oder Phagosomen auf, eine weitere Prozessierung erfolgt dann nach Fusion dieser Endosomen oder Phagosomen mit Lysosomen durch enzymatischen Verdau. In diesen zellulären Kompartimenten erfolgt auch die Beladung der MHC II Moleküle, bevor diese zur Zelloberfläche gelangen (Wolf and Ploegh, 1995).

Normalerweise werden nur MHC II Moleküle und nicht MHC I Moleküle mit Peptiden von extrazellulären Antigenen beladen. Jedoch sind bestimmte Sorten von APC in der Lage, Peptide von extrazellulären Antigenen auch auf MHC I Molekülen zu präsentieren. Diese besondere Form der Antigenpräsentation wird als Kreuzpräsentation bezeichnet und kann nur von professionellen APC wie DC durchgeführt werden, die z.B. infizierte oder entartete Körperzellen sowie Pathogene erkennen und aufnehmen (Bevan, 1976; Kurts et al., 1996; Kurts et al., 2010; Rock et al., 1990). Somit können professionelle APC pathogen-spezifische naive CD8<sup>+</sup> T Zellen auch dann aktivieren, wenn sie selbst nicht infiziert wurden, indem sie Antigene von diesen Pathogenen aufnehmen und kreuzpräsentieren.

---

<sup>3</sup> Engl.: antigen-presenting cells

Die Unterschiede in der Antigenpräsentation über MHC I und MHC II Moleküle an T Zellen spiegeln sich auch in der generellen Funktion der beiden T Zell-Klassen wider: CD4<sup>+</sup> Effektor T Zellen unterstützen primär die Immunantwort gegen Pathogene, die sich im extrazellulären Raum oder im endosomalen-lysosomalen System aufhalten und dort replizieren. CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen sind hingegen von entscheidender Bedeutung für Viren oder Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, die sich im Zellinneren vermehren (Harty et al., 2000). Erkennen CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen ihr Antigen auf infizierten Zellen, induzieren sie in diesen Apoptose, ein wichtiger Schritt in der Bekämpfung von intrazellulären Infektion. Außerdem setzen CTL bei Stimulation des TCR proinflammatorische Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF frei.

### **1.2.2 Aktivierung von naiven T Zellen**

Nach ihrer Entwicklung im Thymus zirkulieren reife T Zellen zwischen dem Blut und peripheren lymphatischen Organen (Klein et al., 2009; Sprent et al., 2008; Surh and Sprent, 2008). Diese reifen T Zellen sind noch nicht auf ihr Antigen getroffen, weswegen man sie als naiv bezeichnet. Erst nachdem naive T Zellen mit APC interagiert haben, die ihr spezifisches Antigen als Peptid:MHC-Komplex präsentieren, differenzieren sie in antigen-erfahrene T Zellen, die Effektorfunktionen ausüben können (Arens and Schoenberger, 2010; Mescher et al., 2006). Diese antigen-erfahrenen T Zellen sind dann in der Lage, ihre Effektorfunktionen bei erneutem Antigenkontakt unmittelbar auszuüben (Croft, 1994).

Die Aktivierung von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen geschieht durch die antigen-spezifische Interaktion mit APC. Neben B Zellen und Makrophagen sind besonders DC als professionelle APC in der Lage, Antigen aufzunehmen und an T Zellen zu präsentieren. DC sind über alle Gewebe des Körpers verteilt, wo sie ihre Umgebung überwachen, um schnell auf eindringende Erreger reagieren zu können (Banchereau et al., 2000).

Unter homöostatischen Bedingungen, also in Abwesenheit einer Infektion, befinden sich DC jedoch in einem unreifen oder tolerogenen Zustand, der sie nicht zur Aktivierung von T Zellen befähigt (Steinman et al., 2003b). Dies ist erst möglich, nachdem unreife DC in Kontakt mit Mikroorganismen gekommen sind und diese als fremd erkannt haben. Solch eine Erkennung von Mikroorganismen erfolgt anhand von bestimmten fremden

Strukturen, sogenannter pathogen-assoziiertes molekularer Strukturen (PAMPs<sup>4</sup>). Die Identifizierung von PAMPs durch DC erfolgt mittels einer Reihe von membranständigen und zytosolischen Rezeptoren, die als Strukturerkennungs-Rezeptoren (PRR<sup>5</sup>) bezeichnet werden (Matzinger and Kamala, 2011).

Die Bindung von PAMPs durch PRR führt dazu, dass DC aktiviert werden und einen Reifungsprozess durchlaufen (Kurts et al., 2010). Reife DC nehmen kaum mehr neue Antigene auf, jedoch resultiert ihre Reifung in einer verstärkten Prozessierung und Präsentation von zuvor aufgenommenen Antigenen auf MHC I und MHC II Molekülen, was die Stimulation von T Zellen fördert. Zudem exprimieren reife DC vermehrt kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Zelloberfläche und sezernieren eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen (Banchereau and Steinman, 1998; Trinchieri, 2003; siehe auch Abschnitt 1.2.3). Erst durch die Bereitstellung solcher kostimulatorischer Signale im reifen Zustand sind DC in der Lage, T Zellen zu aktivieren und deren Entwicklung in Effektor T Zellen zu veranlassen (Arens and Schoenberger, 2010; Mescher et al., 2006; Steinman et al., 2003b, Williams and Bevan, 2007). Eine Stimulation von PRR und die damit verbundene Reifung von DC führt zudem dazu, dass reife DC in lymphatische Organe wie Lymphknoten und Milz migrieren (Banchereau and Steinman, 1998; Junt et al., 2008). Da naive T Zellen zwischen dem Blut und lymphatischen Organen rezirkulieren, erhöht sich somit die Wahrscheinlichkeit, dass naive T Zellen in Lymphknoten oder der Milz auf reife DC treffen und eine antigen-spezifische T Zell-Aktivierung stattfindet (Hickman et al., 2008).

Die Reifung von DC, veranlasst durch die Erkennung infektiöser Erreger über PRR, ist somit der Schlüsselschritt zur Entstehung einer T Zell-vermittelten Immunantwort. Diese Voraussetzung verhindert zudem die Aktivierung von T Zellen gegen Selbst-Antigene unter homöostatischen Bedingungen, da DC dann nicht aktiviert sind sondern unreif.

---

<sup>4</sup> Engl.: pathogen associated molecular patterns

<sup>5</sup> Engl.: pattern recognition receptors

### 1.2.3 Die Differenzierung von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen in Effektor T Zellen

Die Aktivierung von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch reife DC resultiert in Proliferation, klonaler Expansion und Differenzierung. Die neu entstandenen Populationen von CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen verlassen lymphatische Organe und wandern in infiziertes Gewebe ein, um Infektionen zu bekämpfen (Weninger et al., 2001; Zhang and Bevan, 2011).

Welche Signale stellen DC bereit, um die Expansion von CD8<sup>+</sup> T Zellen und die Differenzierung in Effektor T Zellen zu veranlassen? Zunächst bestimmt die spezifische Interaktion zwischen TCR und Peptid:MHC I-Komplex (Signal 1) die Aktivierung antigenspezifischer T Zellen (Williams and Bevan, 2007). Weitergehende stimulierende Signale in der Aktivierung der T Zellen werden über membranständige Moleküle vermittelt, die kostimulatorische Rezeptoren wie CD28 stimulieren (Signal 2), sowie proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und Interferone (IFN), die als lösliche Signale über IL-12 und IFN-Rezeptoren auf die T Zellen wirken (Signal 3). Nur eine Kombination dieser drei Signale führt zu einer optimalen T Zell-Antwort und der Differenzierung funktionaler CTL (Curtsinger et al., 2003a; Curtsinger et al., 1999); ist aber auch für die spätere Entstehung von T Zell-Gedächtnis von entscheidender Bedeutung (Curtsinger and Mescher, 2010; Mescher et al., 2006; Williams and Bevan, 2007; Xiao et al., 2009).

Membranständige Kostimulation wird von reifen DC hauptsächlich über Moleküle der B7 Familie – B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) – vermittelt. Die Stimulation des Rezeptors CD28 durch CD80/86 induziert in naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen zusammen mit dem TCR Signalweg über intrazelluläre Signalwege ein komplexes Programm, das zu Proliferation und der Produktion von IL-2 durch die T Zellen führt (Allison, 1994; Lenschow et al., 1996). Dem Zytokin IL-2 kommt *in vivo* eine besondere Rolle zu: es verstärkt die Zellteilung und Expansion von T Zellen während der Immunantwort und induziert zudem die vermehrte Entwicklung von kurzlebigen CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen (SLEC<sup>6</sup>; Kalia et al., 2010; Kallies et al., 2009; Malek and Castro, 2010; Pipkin et al., 2010). SLEC besitzen ausgeprägte CTL Effektorfunktionen wie z.B. Zytotoxizität, sterben jedoch kurze Zeit nach der Klärung der Infektion. Zudem sind SLEC terminal differenziert, das heißt sie können bei erneutem Antigenkontakt nicht mehr proliferieren.

---

<sup>6</sup> Engl.: short-lived effector cells

Neben CD80/86 unterstützen weitere kostimulatorische Moleküle die anfängliche Phase der Differenzierung von CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen. So exprimieren reife DC und aktivierte T Zellen das Molekül CD70, welches über seinen Rezeptor CD27 Überlebenssignale an aktivierte CD8<sup>+</sup> T Zellen übermittelt (Hendriks et al., 2000; Hendriks et al., 2003).

Für die initiale Proliferation von CD8<sup>+</sup> T Zellen ist schon eine kurze Phase der Stimulation mit Signal 1 und 2 ausreichend, jedoch benötigt die optimale Differenzierung in Effektor T Zellen eine längere Aktivierungsphase (van Stipdonk et al., 2001a). Zusätzlich nehmen hier die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN $\alpha$  eine zentrale Rolle in der Ausbildung von Effektorfunktionen in den stimulierten CD8<sup>+</sup> T Zellen ein (Curtsinger et al., 2003a; Curtsinger et al., 2005; Kolumam et al., 2005). Vor allem IL-12 ist während der CTL-Differenzierung für die Entwicklung von Zytotoxizität und die Fähigkeit zur IFN $\gamma$ -Produktion von entscheidender Bedeutung (Curtsinger et al., 2003b). Solch eine IL-12-vermittelte Programmierung von Effektor T Zellen wird vornehmlich über die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet reguliert (Joshi et al., 2007; Rao et al., 2010). In ähnlicher Weise kann auch IFN $\alpha$  die vollständige Differenzierung von Effektor T Zellen veranlassen (Kolumam et al., 2005; Xiao et al., 2009). Bei der Aktivierung von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen müssen IL-12 oder IFN $\alpha$  nicht zwingend von der antigen-präsentierenden DC produziert werden, sondern können auch von anderen Zellen stammen („Bystander-Aktivierung“; Cui et al., 2009).

Die Stärke der drei Signale, die naive T Zellen zu Beginn und während der späteren Phase ihrer Differenzierung erhalten, variieren sowohl zwischen verschiedenen Infektionen als auch den einzelnen T Zellen (Gerlach et al., 2010; Stemberger et al., 2007). Infolgedessen weisen die generierten Effektor T Zell-Populationen einen hohen Grad an Heterogenität auf, des Weiteren prägen die Stimulationsbedingungen während der primären T Zell-Antwort die spätere Entstehung von Gedächtnis T Zellen (Cui and Kaech, 2010; Kaech and Cui, 2012; Kaech et al., 2002a; Lefrancois and Marzo, 2006; Malek and Castro, 2010; Wakim and Bevan, 2010; Williams and Bevan, 2007).

### **1.3 Entwicklung von T Zell-Gedächtnis**

Nach der primären T Zell-Antwort und der erfolgreichen Elimination der Infektion unterlaufen Effektor T Zellen eine Kontraktionsphase, die zum Absterben von 90-95% aller Effektor T Zellen führt (Cui and Kaech, 2010; Williams and Bevan, 2007). Ein Teil an Effektor T Zellen überlebt jedoch die Phase der Kontraktion und entwickelt sich zu langlebigen Gedächtnis T Zellen, die einen fortwährenden Schutz vor erneuter Infektion mit demselben Pathogen gewährleisten. Gedächtnis T Zellen sind bei einer Sekundärantwort in bemerkenswerter Weise fähig, schnell und unmittelbar zu reagieren und eine Vielzahl neuer Effektor T Zellen herzustellen (Croft et al., 1994; Lefrancois, 2006; Sallusto et al., 2004; Surh and Sprent, 2008). Jedoch sind die charakteristischen Funktionen von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen ungleichmäßig auf verschiedenen Populationen von Gedächtnis T Zellen verteilt (Jameson and Masopust, 2009; Kaech and Cui, 2012; Wakim and Bevan, 2010).

Die Entwicklung von Gedächtnis T Zellen sowie die deren heterogene Zusammensetzung wird maßgeblich von den Signalen beeinflusst, die während der Primärantwort auf die Differenzierung von Effektor T Zellen einwirken. Hier sind unter anderem die Stärke der antigen-spezifischen Stimulation und die Dauer der Infektion von Bedeutung; aber auch das Ausmaß an Kostimulation und proinflammatorische Zytokinen, das auf die einzelnen T Zellen einwirkt. Zudem prägen nach der Klärung einer Infektion weitere Faktoren wie Zytokine und andere Einflüsse der Umgebung den Erhalt und die Qualität von vorhandenen Gedächtnis T Zellen (Cui and Kaech, 2010; Joshi and Kaech, 2008; Surh and Sprent, 2008).

#### **1.3.1 Die Vorläufer von Gedächtnis T Zellen**

Die Faktoren, welche die Kontraktion von T Zellen auf der einen und die Entwicklung heterogener Populationen von Gedächtnis T Zellen auf der anderen Seite bestimmen, sind nicht genau entschlüsselt und stehen im Fokus aktueller Forschung. Eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung von T Zell-Gedächtnis scheint zunächst die Stimulation von naiven T Zellen unter inflammatorischen Bedingungen zu sein, vor allem in Anwesenheit von proinflammatorische Zytokinen wie IL-12 und IFN $\alpha$  (Kolumam et al., 2005; Li et al., 2006; Mescher et al., 2006; Williams and Bevan, 2007). IL-12 und IFN $\alpha$  scheinen hierbei für die Umstrukturierung von Chromatin verantwortlich zu sein, dass



den Erhalt von Effektorfunktionen und damit eine schnelle Reaktion von Gedächtnis T Zellen gewährleistet (Agarwal et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich  $CD8^+$  T Zellen nach Durchschreiten einer Effektorphase zu späteren Gedächtnis T Zellen entwickeln (Bannard et al., 2009b).

Mehrere Marker können benutzt werden, um diejenigen  $CD8^+$  Effektor T Zellen zu identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in Gedächtnis T Zellen differenzieren. So sind die Expression von CD127, der  $\alpha$ -Kette des IL-7 Rezeptors, die Expression von CD27 und Bcl-2 sowie eine geringe Expression von KLRG1 Anzeichen für solche Effektor T Zellen, die als Vorläufer von Gedächtnis T Zellen zu betrachten sind (Ahmed et al., 2009; Kaech and Cui, 2012; Williams and Bevan, 2007; Williams et al., 2006). Jedoch korreliert keiner dieser Faktoren absolut mit der Entwicklung von T Zell-Gedächtnis, das jeweilige Gedächtnis-Potential einer Effektor T Zelle kann mittels dieser Marker somit nur annähernd bestimmt werden (Cui and Kaech, 2010; Kaech and Cui, 2012; Rutishauser and Kaech, 2010).

Verschiedene Modelle können herangezogen werden, um die Heterogenität von Effektor T Zellen und die Selektion von späteren Gedächtnis T Zellen zu Erklären (Ahmed et al., 2009; Bannard et al., 2009a; Kaech and Cui, 2012; Lefrancois and Marzo, 2006). So ist es vorstellbar, dass klonotypische naive T Zellen mit identischem TCR dazu vorprogrammiert sind, entweder eine bestimmte Sorte Effektor T Zellen oder Gedächtnis T Zellen zu bilden. Das Differenzierungs-Schicksal von einzelnen naiven T Zellen wäre somit vorherbestimmt. Zwei kürzlich veröffentlichte Studien belegen jedoch, dass einzelne naive  $CD8^+$  T Zellen während einer Infektion das Potential besitzen, diverse Populationen von T Zellen zu bilden, und widerlegen somit diese These (Gerlach et al., 2010; Schumacher et al., 2010; Stemberger et al., 2007).

Andere Studien zeigen auf, dass die erste Teilung einer naiven T Zelle asymmetrisch verlaufen kann und es dadurch zu einer unterschiedlichen Verteilung von Molekülen in den zwei Tochterzellen kommt (Chang et al., 2007). Somit könnte bereits die Verteilung von Differenzierungsfaktoren während der ersten Zellteilung im weiteren Verlauf der Infektion das Schicksal von Effektor T Zellen und ihrer Nachkommen bestimmen.

Zwei weitere Modelle gehen davon aus, dass Differenzierung von  $CD8^+$  Gedächtnis T Zellen linear verläuft und durch die Stärke der T Zell-Stimulation bestimmt wird. Die

Entwicklung der T Zellen könnte dabei sowohl über die Gesamtstärke der initialen Stimulation mit den Signalen 1, 2 und 3 definiert werden oder auf der wiederholten Stimulation von T Zellen über die Dauer einer Infektion basieren (Ahmed et al., 2009; Kaech and Cui, 2012; Lanzavecchia and Sallusto, 2002). Mehrere Studien demonstrieren, dass eine progressive Stimulation von T Zellen dazu führt, dass Effektor T Zellen zwar ausgeprägte Effektorfunktionen besitzen, jedoch der Grad ihrer Plastizität und Langlebigkeit verringert ist (Cui et al., 2009; D'Souza et al., 2011; Gattinoni et al., 2009; Joshi et al., 2007; Kalia et al., 2010; Sarkar et al., 2007). Das aus diesen Beobachtungen entstandene Modell des „abnehmenden Gedächtnis-Potentials“<sup>7</sup> bei verstärkter Differenzierung von naiven T Zellen in Effektor T Zellen erklärt anschaulich, wie verschiedene Entwicklungsstadien von T Zellen während einer einzelnen Infektion gleichzeitig entstehen können. Ein Zusammenspiel der verschiedenen Modelle sowie eine gewisse Flexibilität zwischen den Entwicklungsstadien von Effektor T Zellen und Gedächtnis T Zellen ist allerdings keineswegs ausgeschlossen (Kaech and Cui, 2012).

### **1.3.2 Die Heterogenität von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen**

Eine Grundlage für den erhöhten Schutz durch Gedächtnis T Zellen ist ihre Lokalisation: Sie befinden sich sowohl in lymphatischen Geweben als auch in peripheren Organen, was beim erneuten Eindringen von Pathogene an Körperoberflächen eine schnelle Bekämpfung der Infektion ermöglicht (Surh and Sprent, 2008). Verschiedene Populationen von Gedächtnis T Zellen lassen sich anhand ihrer Verteilung im Organismus unterscheiden (Gebhardt et al., 2012; Jameson and Masopust, 2009; Jung et al., 2010; Surh and Sprent, 2008; Woodland and Kohlmeier, 2009).

Die erste Entdeckung einer Heterogenität von Gedächtnis T Zellen wurde von Sallusto et al. gemacht (Sallusto et al., 1999). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass humane Gedächtnis T Zellen anhand der Expression von CCR7 und CD62L in zwei Populationen getrennt werden können, die unterschiedliche Funktionen besitzen: CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T Zellen mit geringen Effektorfunktionen wurden aufgrund ihrer Lokalisation in lymphatischen Organen als zentrale Gedächtnis T Zellen (TCM<sup>8</sup>) benannt, CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> wegen ihrer ausgeprägten Effektorfunktionen wie Zytotoxizität als Effektor Gedächtnis

---

<sup>7</sup> Engl.: decreasing-potential model

<sup>8</sup> Engl.: central memory T cells

T Zellen (TEM<sup>9</sup>; Sallusto et al., 2004; Sallusto et al., 1999). Weitere folgende Studien bestätigten die Existenz von TCM und TEM, die nicht nur Anhand ihrer Lokalisation und Funktionen, sondern auch aufgrund ihres Differenzierungspotentials unterschieden werden können (Stemberger et al., 2009). So besitzen TCM im Gegensatz zu TEM ein hohes Maß an Plastizität und sind in der Lage, bei einer Sekundärantwort neue Effektor T Zellen, TEM und TCM zu generieren (Chang et al., 2007; Kaech and Cui, 2012; Lefrancois and Obar, 2010; Roberts et al., 2005). Zusätzlich zu diesem hohen Differenzierungspotential sind TCM besonders langlebig und durch homöostatische Proliferation zur Selbst-Erneuerung fähig, daher werden ihnen auch als stammzell-ähnliche Funktionen zugeschrieben (Stemberger et al., 2009). TEM sind hauptsächlich in der Zirkulation und in peripheren Organen, jedoch nicht wie TCM im lymphatischen Gewebe anzutreffen. TEM zeichnen sich dadurch aus, dass sie stärker ausgeprägte Effektorfunktionen als TCM besitzen, jedoch können sie kaum in neue Effektor T Zellen differenzieren (Bouneaud et al., 2005; Wherry et al., 2003).

Jüngste Studien haben eine weitere Population an spezialisierten Gedächtnis T Zellen identifiziert, die nicht in der Zirkulation zu finden ist sondern nach einer Infektion ausschließlich am Infektionsort verbleibt (Gebhardt et al., 2009; Masopust et al., 2006). Diese organresidenten Gedächtnis T Zellen (TRM<sup>10</sup>) schützen lokal vor erneuter Infektion und können über das Integrin CD103 identifiziert werden (Gebhardt and Mackay, 2012; Jiang et al., 2012).

Welche Faktoren bestimmen die Zusammensetzung und die Heterogenität der Effektor und Gedächtnis T Zell-Populationen? Nur ein Bruchteil der Effektor T Zellen, die während einer Immunantwort entstehen, entwickelt sich zu Gedächtnis T Zellen, während der Großteil terminal differenziert ist (Cui and Kaech, 2010; Joshi et al., 2007). Mehrere Studien belegen, dass für solch eine terminale Differenzierung von T Zellen entscheidend ist, wie viele inflammatorische Signale in der frühen Phase einer Infektion auf die expandierenden T Zellen einwirken (Angelosanto and Wherry, 2010; Kaech and Cui, 2012). Zwar ist ein gewisser Grad an Inflammation zunächst eine Grundvoraussetzung für die Verhinderung von T Zell-Toleranz und die Entwicklung von Effektor und Gedächtnis

---

<sup>9</sup> Engl.: effector memory T cells

<sup>10</sup> Engl.: tissue resident memory T cells

T Zellen (Cui and Kaech, 2010; Mescher et al., 2006; Steinman et al., 2003a; Xiao et al., 2009). Jedoch führt eine verkürzte Dauer der Inflammation zu der vermehrten Entstehung von TCM und verhindert eine starke T Zell-Kontraktion (Badovinac et al., 2005; Badovinac et al., 2004). Auch haben T Zellen, die aufgrund geringerer Stimulation weniger differenziert sind, ein hohes stammzell-ähnliches Potential und sind in der Lage, neue Effektor T Zellen zu generieren (Gattinoni et al., 2011; Gattinoni et al., 2009). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN $\alpha$  für eine verringerte Entstehung von TCM bzw. eine terminale Differenzierung von Effektor T Zellen verantwortlich sind (Cui et al., 2009; Joshi et al., 2007; Takemoto et al., 2006; Wiesel et al., 2011a). In ähnlicher Weise scheinen auch starke IL-2 Signale für eine terminale Differenzierung und verkürzte Lebensdauer von Effektor T Zellen hervorzurufen (Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010).

Während proinflammatorischen Signale also das Gleichgewicht zwischen langlebigen Gedächtnis T Zellen und kurzlebigen, terminal differenzierten Effektor T Zellen zu Gunsten Letzterer verschieben, wirken anti-inflammatorische Signale dem entgegen. So stellt die Aktivierung von STAT3 über die Zytokine IL-10 und IL-21 einen Schutzmechanismus für frühe TCM dar, der die Sensitivität gegenüber IL-12 verringert und dadurch einer zu starken Differenzierung vorbeugt (Cui et al., 2011; Foulds et al., 2006). Auch TGF- $\beta$ -vermittelte Signale verringern die Entwicklung von kurzlebigen Effektor T Zellen (Sanjabi et al., 2009), des Weiteren wird das Überleben und die proliferative Kapazität von Gedächtnis T Zellen durch den Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg gefördert (Gattinoni et al., 2009; Zhao et al., 2010; Zhou et al., 2010). Somit ergibt sich ein komplexes Netzwerk aus pro- und anti-inflammatorischen Signalen, die das Gleichgewicht zwischen terminal differenzierten Effektor T Zellen und langlebigen Gedächtnis T Zellen steuern.

### 1.3.3 Transkriptionelle Kontrolle der Entwicklung von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen

Die Integration der verschiedenen Stimuli in die Entwicklung von CD8<sup>+</sup> Effektor und Gedächtnis T Zellen erfolgt über eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (Angelosanto and Wherry, 2010; Kaech and Cui, 2012; Rutishauser and Kaech, 2010). Interessanterweise treten die meisten dieser Faktoren paarweise auf und wirken in gegensätzlicher Richtung (Kaech and Cui, 2012). Wie dieses Netzwerk von Transkriptionsfaktoren in seiner Gesamtheit verschaltet ist und welche Hierarchie zwischen den einzelnen Transkriptionsfaktoren besteht ist jedoch bisher kaum verstanden.

Die bekanntesten Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen sind die T-box Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomesodermin (Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2003; Szabo et al., 2000), sie regulieren unter anderem die Expression von Zytokinen wie IFN $\gamma$  und zytotoxischen Effektormolekülen wie Granzym B und Perforin (Cruz-Guilloty et al., 2009; Rao et al., 2010). In der frühen Entwicklung von Effektor T Zellen zeigt sich bei T-bet und Eomes eine gewisse Redundanz, jedoch wird mindestens einer der beiden Faktoren für die Differenzierung von Effektor T Zellen benötigt (Intlekofer et al., 2008; Intlekofer et al., 2007; Intlekofer et al., 2005). In einer anderen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass ein weiterer Transkriptionsfaktor, Runx3, in der frühen Entwicklung von CTL-Effektorfunktionen eine Rolle spielt (Cruz-Guilloty et al., 2009).

T-bet und Eomes steuern jedoch nicht nur die frühe Entwicklung von Effektor T Zellen, sondern nehmen auch eine zentrale Rolle in der Entstehung von T Zell-Gedächtnis ein (Intlekofer et al., 2005; Joshi et al., 2007). So führen inflammatorische Signale über IL-12 zu einer mTOR-vermittelten Verstärkung der T-bet-Expression (Rao et al., 2010). Dies hat bei gleichzeitiger Unterdrückung der Expression von Eomes eine vermehrte Generierung terminal differenzierter Effektor T Zellen zur Folge (Joshi et al., 2007; Pipkin et al., 2010; Rao et al., 2010). Eine spätere Reexpression von Eomes ist hingegen mit der Entwicklung von TCM assoziiert und kontrolliert deren Langlebigkeit (Banerjee et al., 2010; Intlekofer et al., 2005). Das Verhältnis von T-bet und Eomes diktiert folglich die Funktion von Effektor T Zellen und deren Beitrag zum langlebigen T Zell-Gedächtnis (Kaech and Cui, 2012).

Eng verknüpft mit diesen beiden Transkriptionsfaktoren ist der Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg. Der über diesen Signalweg induzierte Transkriptionsfaktor Tcf1 scheint eine Verstärkung

der Eomes-Expression zu veranlassen, und somit die Entwicklung von stammzell-ähnlichen TCM zu fördern (Gattinoni et al., 2009; Jeannet et al., 2010; Zhao et al., 2010; Zhou et al., 2010). Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, Bcl-6 und Blimp-1, die zunächst in B Zellen entdeckt wurden, haben Einfluss auf die Gedächtnis T Zell-Entwicklung (Angelosanto and Wherry, 2010). So ist Bcl-6 für die Entstehung von TCM und deren Differenzierung in Effektor T Zellen bei erneuter Infektion wichtig (Ichii et al., 2002). Des Weiteren führt die Überexpression von Bcl-6 zur vermehrten Entstehung von TCM (Ichii et al., 2004). Der Wirkmechanismus von Bcl-6 beruht darauf, dass er der Funktion von Blimp-1 entgegenwirkt. Die Expression von Blimp-1 wird durch IL-2 Signale induziert, was voraussichtlich der Grund für die terminale Differenzierung von T Zellen ist, die verstärkte IL-2 Signale erhalten (Kalia et al., 2010; Kallies et al., 2009; Pipkin et al., 2010). Blimp-1 scheint in terminal differenzierten Effektor T Zellen und TEM für den Erhalt von Effektor T Zell-Funktionen verantwortlich zu sein, zugleich unterdrückt Blimp1 jedoch den Erwerb von TCM-ähnlichen Eigenschaften (Kallies et al., 2009; Rutishauser et al., 2009; Shin et al., 2009).

In der Gesamtpopulation von Gedächtnis T Zellen akkumulieren mit voranschreitender Zeit die Expression von Bcl-6, Eomes und Tcf1, während Blimp1 und T-bet in ihrer Expression abnehmen (Kaech and Cui, 2012). Dies zeigt, dass der relative Anteil an TCM gegenüber TEM in der Gedächtnis T Zell-Population mit der Zeit zunimmt. Zudem können diese Transkriptionsfaktoren auch als Indikator für das Gedächtnis T Zell-Potential einer gegebenen CD8<sup>+</sup> T Zell-Population benutzt werden (Roberts et al., 2005).

## 1.4 T Zell-Toleranz

Die Effektor Zellen des adaptiven Immunsystems – B Zellen und T Zellen - sind nicht in der Lage zwischen selbst und fremd zu unterscheiden (Janeway, 1989). Die stochastische Generierung von verschiedensten Rezeptorspezifitäten ist zum einen die Grundlage für die hohe Variabilität von adaptiven Immunantworten, führt jedoch auch zur Entstehung von Lymphozyten mit selbst-reaktiven Rezeptoren.

Mehrere Schutzmechanismen sorgen dafür, dass diese selbst-reaktiven Zellen entweder eliminiert oder funktional inaktiviert werden, um Immunreaktionen gegen körpereigene Selbst-Antigene zu verhindern. Im Falle von T Zellen spricht man hierbei von T Zell-Toleranz. Der Toleranzbegriff ist relativ weit gefasst und bezeichnet im Allgemeinen einen Zustand, in dem die Erkennung von Antigen durch T Zellen auch bei der Präsenz von Aktivierungssignalen nicht in der Lage ist, eine protektive Effektor T Zell-Antwort auszulösen (Redmond and Sherman, 2005).

### 1.4.1 Zentrale Toleranz

Die Vorläufer von T Zellen entstehen zunächst im Knochenmark, ihre weitere Entwicklung und die Rearrangierung der TCR-Gensegmente erfolgt allerdings im Thymus. T Zellen, die dabei einen hochaffinen selbst-reaktiven TCR entwickeln, werden hier aussortiert und in Apoptose geschickt. Dieser Prozess der negativen Selektion erfolgt in der Medulla des Thymus durch medulläre Thymusepithelzellen (mTEC<sup>11</sup>), Makrophagen und DC (Gallegos and Bevan, 2004; Klein et al., 2009). mTEC sind in besonderer Weise in der Lage, eine Vielzahl von gewebe-spezifischen Selbst-Antigenen, welche ansonsten nur in peripheren Organen vorkommen, zu exprimieren: Diese Fähigkeit wird durch den Transkriptionsfaktor AIRE<sup>12</sup> vermittelt (Anderson et al., 2005). mTEC präsentieren solche Selbst-Antigene entweder direkt an die sich entwickelnden T Zellen oder geben Antigene an DC weiter, die sie dann kreuzpräsentieren (Gallegos and Bevan, 2004). T Zellen, deren TCR diese Selbst-Antigene auf mTEC oder DC mit hoher Affinität bindet, werden mittels Apoptose eliminiert. Ein Großteil der sich entwickelnden Thymozyten (>95%) wird durch diese negative Selektion eliminiert, jedoch ist dieser Prozess im Thymus nicht vollständig

---

<sup>11</sup> Engl.: medullary thymic epithelial cells

<sup>12</sup> Engl.: Autoimmune regulator

(Gallegos and Bevan, 2006; Mathis and Benoist, 2009; Mueller, 2010; Redmond and Sherman, 2005). Somit verlassen auch selbst-reaktive T Zellen den Thymus.

Zudem existieren in der Peripherie auch T Zellen, deren TCR Antigene aus der Nahrung oder von kommensalen Bakterien erkennt, oder T Zellen, die einen TCR mit schwacher Avidität gegenüber Selbst-Antigenen besitzen (Mowat, 2003; Zehn and Bevan, 2006). Um die Entstehung von Autoimmunität durch diese T Zellen zu verhindern, existieren weitere Kontrollmechanismen, die unter dem Begriff periphere Toleranz zusammengefasst werden.

#### **1.4.2 Periphere Toleranz**

Mehrere unterschiedliche Mechanismen greifen in der Peripherie ineinander, um Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen oder harmlosen, zirkulierenden Antigenen zu gewährleisten (Mathis and Benoist, 2009; Mueller, 2010; Srinivasan and Frauwirth, 2009). So werden T Zellen, deren TCR nur eine geringer Affinität zu Selbst-Peptid:MHC-Komplexen aufweist, nicht aktiviert, in diesem Fall spricht man von T Zell-Ignoranz (Kurts et al., 1998). Auch entsteht keine Autoimmunität, wenn selbst-reaktive T Zellen nicht in der Lage sind, ihr Antigen zu sehen. Relevant ist dies für Antigene die in immunprivilegierten Organen wie Auge und Gehirn exprimiert werden, zu denen T Zellen keinen Zugang haben. Jedoch kann es in solchen Organen zur Entstehung von Autoimmunität kommen, wenn durch eine Infektion oder die Zerstörung von Gewebe der Kontakt zwischen T Zellen und vormals ignorierten Antigenen ermöglicht wird (Kurts et al., 1998; Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991).

Des Weiteren werden auto-reaktive T Zellen in der Peripherie durch andere Immunzellen wie APC und CD4<sup>+</sup> T Zellen kontrolliert. So unterdrücken CD4<sup>+</sup> regulatorische T Zellen (T<sub>REG</sub>) die Aktivierung anderer T Zellen und damit die Entstehung von Autoimmunität durch mehrere Mechanismen (Vignali et al., 2008).

Im Falle der Toleranzinduktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen spielt zudem die Interaktion mit APC unter homöostatischen Bedingungen eine große Rolle. Zwar sind DC nach ihrer Reifung für die Generierung von Effektor und Gedächtnis T Zellen von großer Bedeutung, in der Abwesenheit von Inflammation exprimieren unreife DC aber kaum kostimulatorische Moleküle und vermitteln so keine Aktivierungs- und Überlebenssignale (Hernandez et al., 2001; Steinman et al., 2003b). Unreife DC präsentieren unter diesen Umständen nicht nur



Selbst-Antigene, sondern kreuzpräsentieren auch aufgenommene, lösliche Antigene an CD8<sup>+</sup> T Zellen (Heath et al., 1998; Kurts et al., 1997; Luckashenak et al., 2008). In diesem Fall spricht man von der Induktion von Kreuz-Toleranz. Die Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch unreife DC führt zu einer kurzzeitigen Aktivierung der T Zellen, gefolgt von T Zell-Deletion oder funktionaler Inaktivierung, der Anergie (Steinman et al., 2003b).

Hierbei tragen aktive Signale wie die Stimulation der regulatorischen Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 auf CD8<sup>+</sup> T Zellen zur Toleranzinduktion durch unreife DC bei und vermitteln T Zell-Deletion (Probst et al., 2005). Die Deletion von CD8<sup>+</sup> T Zellen basiert im Allgemeinen auf der Induktion von apoptotischen Signalen bei nur unzureichender Hochregulation von anti-apoptotischen Signalen, wie z.B. dem Molekül Bcl-2 (Davey et al., 2002; Redmond et al., 2008). Eine Elimination von CD8<sup>+</sup> T Zellen kann außerdem nicht nur von unreifen DC, sondern auch von Stromazellen in Lymphknoten oder Hepatozyten in der Leber ausgelöst werden (Bertolino et al., 1998; Cohen et al., 2010; Fletcher et al., 2010; Gardner et al., 2008).

Werden CD8<sup>+</sup> T Zellen nicht deletiert sondern anerg, so sind sie zwar in der Lage zu überleben, können jedoch kein IL-2 produzieren oder proliferieren (Mueller, 2010; Redmond and Sherman, 2005; Schwartz, 2003). Eine kürzlich erschienen Studie konnte zeigen, dass der Zustand der Anergie von CD8<sup>+</sup> T Zellen endgültig ist und selbst dann keine Aktivierung der anergen T Zellen stattfindet, wenn diesen ihr Antigen unter inflammatorischen Bedingungen im Laufe einer Infektion präsentiert wird (Hamilton-Williams et al., 2005; Schietinger et al., 2012).

## 1.5 Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber erfüllt in ihrer Rolle als Stoffwechselorgan nicht nur eine Vielzahl metabolischer Aufgaben, sondern ist in besonderer Weise an der lokalen Regulation von immunologischen Prozessen beteiligt (Bottcher et al., 2011; Crispe, 2009; Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010).

Dies ist unter anderem ihrer besonderen Einbindung in die Blutzirkulation geschuldet: nur ein geringer Anteil der Blutzufuhr speist sich aus der *Arteria hepatica*, während über 70% der Blutzufuhr der Leber venösen Ursprungs ist. Dieses sauerstoffarme Blut erreicht die Leber nach Passage des Verdauungstraktes über die Pfortader und ist daher reich an mikrobiellen Produkten und Nahrungsantigenen (Crispe, 2009). Von den Verästelungen der Pfortader und der *Arteria hepatica* mischt sich venöses und arterielles Blut und fließt durch ein großes Netzwerk kleiner Blutgefäße, die hepatischen Sinusoide. Erstaunlicherweise passiert das gesamte Blutvolumen des Körpers dieses Netzwerk mehr als 300 Mal am Tag, sodass Antigene und Immunzellen beim Eintritt in die Zirkulation schnell in die Leber gelangen. Die hohe Anzahl der Sinusoide sowie ihr nur geringer Durchmesser von 5-7µm resultiert zudem in einer starken Verlangsamung des Blutflusses. Dies ermöglicht einerseits die effiziente Verstoffwechslung von zugeführten Molekülen, erleichtert andererseits die Auswanderung von Immunzellen aus dem Blut in das Lebergewebe und die Interaktion von Immunzellen mit lokalen APC (Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010).

Die vorherrschende Population an hepatischen APC ist eine besondere Form von Endothelzellen, die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC<sup>13</sup>). LSEC haben einen Anteil von 50% an allen nicht-parenchymalen APC der Leber und bilden eine Barriere zwischen Parenchym und dem Blutfluss (Braet and Wisse, 2002; Racanelli and Rehermann, 2006; Wisse et al., 1985). Das durch LSEC geformte Endothel besitzt jedoch keine Basalmembran und ist nicht komplett geschlossen. So können Moleküle nicht nur über Aufnahme und Transzytose durch LSEC zu den hinter ihnen gelegenen Hepatozyten gelangen, sondern auch durch Poren innerhalb des Endothels, sogenannte *Fenestrae* (Braet and Wisse, 2002; Knolle and Limmer, 2003).

---

<sup>13</sup> Engl.: liver sinusoidal endothelial cells

Der zwischen LSEC und Hepatozyten gelegenen Raum von Dissé dient hiernach unter anderem dem Stoffaustausch, zudem befinden sich in ihm weitere Population von lokalen APC, die hepatischen Sternzellen und ein Großteil der Kupfferzellen (Racanelli and Rehermann, 2006; Thomson and Knolle, 2010). Hepatozyten können allerdings auch den Raum von Dissé überbrücken und direkt mit Lymphozyten im Blut interagieren, dies geschieht durch die *Fenestrae* im Leberendothel (Bertolino et al., 1998).

### 1.5.1 Die antigen-präsentierenden Zellpopulationen der Leber

Der Großteil der Leberzellen sind die Leberparenchymzellen oder Hepatozyten. Sie üben die metabolischen Funktionen der Leber aus, tragen also zur Verstoffwechslung von Molekülen und der Entgiftung des Organismus bei. Antigene oder Toxine werden nach ihrer Modifikation bzw. Inaktivierung durch Hepatozyten entweder direkt in die Galle sezerniert oder dem Blutstrom zurückgeführt, um letztendlich über die Niere ausgeschieden zu werden. Die immunologische Funktion von Hepatozyten besteht vornehmlich aus der Produktion von Akute-Phase-Proteinen und Komplementproteinen, wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems (Janeway and Medzhitov, 2002). Auch können Hepatozyten trotz einer relativ geringen MHC I Expression Selbst-Antigene an naive CD8<sup>+</sup> T Zellen präsentieren (Bertolino et al., 2001).

Neben Hepatozyten existieren in der Leber mehrere nicht-parenchymale APC, wie z.B. LSEC. LSEC bilden wie bereits erwähnt die Mehrheit der nicht-parenchymalen APC und sind in herausragender Weise fähig, innerhalb von Minuten zirkulierende Antigene und mikrobielle Produkte aus dem Blutstrom aufzunehmen (Elvevold et al., 2004; Limmer and Knolle, 2001; Schurich et al., 2009; von Oppen et al., 2009). Dies geschieht vor allem durch rezeptor-vermittelte Endozytose und wird mittels einer Reihe verschiedener Rezeptoren durchgeführt, wie z.B. C-Typ Lektinen und Scavenger Rezeptoren, aber auch PRR (Elvevold et al., 2008; Elvevold et al., 2004; Malovic et al., 2007). Ein Großteil der von LSEC aufgenommenen Substanzen wird mittels Transzytose zu Hepatozyten transportiert und von diesen weiter verstoffwechselt (Tavassoli et al., 1986a; Tavassoli et al., 1986b). Dieser Transportweg wird auch von Viren zur schnellen Infektion von Hepatozyten in der Leber ausgenutzt, so z.B. durch HBV<sup>14</sup> und HCV<sup>15</sup> (Protzer et al., 2012; Rehermann and Nascimbeni, 2005).

---

<sup>14</sup> Hepatitis B Virus

Neben der Präsentation von Antigenen auf MHC II zu CD4<sup>+</sup> T Zellen sind LSEC in besonderer Weise in der Lage, aufgenommene exogene Antigene an CD8<sup>+</sup> T Zellen kreuzzupräsentieren (Knolle et al., 1999; Limmer et al., 2000). Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen wird normalerweise nur von professionellen APC wie DC durchgeführt, auch LSEC sind dazu jedoch in herausragender Weise fähig und DC aus der Milz überlegen (Kurts et al., 2010; Limmer et al., 2000; Schurich et al., 2009). Eine Kreuzpräsentation von Antigen durch LSEC führt zur schnellen antigen-spezifischen Rekrutierung von zirkulierenden naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen in die Leber und induziert deren Aktivierung (von Oppen et al., 2009). Die Interaktion von LSEC mit T Zellen wird zudem durch mehrere Adhäsionsmoleküle wie ICAM und VCAM unterstützt (Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010). Auch exprimieren LSEC geringe Mengen der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 sowie große Mengen an koinhibitorischen Molekülen wie B7-H1 (Diehl et al., 2008).

Neben LSEC existiert in der Leber eine große Zahl an lokalen Makrophagen, die Kupfferzellen, welche sich in den Lebersinusoiden befinden und vor allem partikuläre Antigene aus dem Blut phagozytieren (Klein et al., 2007; Racanelli and Rehermann, 2006). Die Phagozytose durch Kupfferzellen ist aber auch für die Eliminierung von toten Hepatozyten und Mikroorganismen wichtig (Gregory et al., 1992; Shi et al., 1996) und wird durch bestimmte hepatotrope Infektionen zur Umgehung der Immunabwehr ausgenutzt (Protzer et al., 2012). Zudem können Kupfferzellen mit zirkulierenden Immunzellen im Blut wie z.B. T Zellen interagieren.

Innerhalb des Raumes von Dissé befindet sich eine weitere APC-Population, die hepatische Sternzellen bzw. Ito-Zellen. Sternzellen bilden ca. 1% der nicht-parenchymalen Zellen in der Leber und fungieren als Speicher von Lipiden und Vitamin A (Racanelli and Rehermann, 2006). Hepatische Sternzellen können T Zellen aktivieren, zudem produzieren sie extrazelluläre Matrixproteine, was insbesondere in der Entwicklung von Zirrhose von Bedeutung ist (Friedman, 2008a, b).

---

<sup>15</sup> Hepatitis C Virus

Auch DC befinden sich in der Leber, diese migrieren nach Aufnahme von Antigenen vom Raum von Dissé über lymphatische Gefäße zu den hepatischen Lymphknoten (Barbier et al., 2012). Jedoch sind hepatische DC weniger immunogen als DC aus dem Knochenmark oder der Milz und besitzen einen tolerogenen Phänotyp (Crispe, 2009; Hsu et al., 2007).

### **1.5.2 Antigenpräsentation und Induktion von peripherer Toleranz in der Leber**

Im Allgemeinen wird die Leber als ein eher tolerogenes Organ angesehen (Crispe, 2009; Knolle and Gerken, 2000; Protzer et al., 2012). Dies ist vermutlich der konstanten Zufuhr von mikrobiellen Substanzen bzw. PAMPs aus dem Darm geschuldet, welche die Gefahr der Entstehung chronischer Inflammation birgt. Die lokalen APC in der Leber weisen eine Toleranz gegenüber solcher PAMPs auf, was der Entstehung von Inflammation vorbeugt (Crispe, 2009; Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010). Zudem produzieren Kupfferzellen, LSEC und Hepatozyten anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  (Thomson and Knolle, 2010). Diese Zytokine unterdrücken die Reifung und Antigenpräsentation von lokalen APC sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und erschweren somit die Aktivierung von T Zellen. Auch sind sowohl Sternzellen als auch LSEC fähig, die Aktivierung von T Zellen durch DC über einen antigen-unspezifischen Mechanismus zu inhibieren (Schildberg et al., 2008; Schildberg et al., 2011).

Neben Kupfferzellen und DC präsentieren vor allem LSEC Antigene direkt an T Zellen in der Leber. Zwar ist die Expression von MHC II Molekülen auf LSEC relativ gering und wird zusätzlich durch in der Leber vorhandenes LPS unterdrückt, jedoch sind LSEC im Prinzip in der Lage, CD4<sup>+</sup> T Zellen zu stimulieren (Klugewitz et al., 2002; Knolle et al., 1999; Kruse et al., 2009). Vermutlich aufgrund fehlender kostimulatorischer Signale wie CD80/86 führt dies zur Induktion einer besonderen Population CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T<sub>REG</sub> (Kruse et al., 2009). Zudem sind LSEC wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben in der Lage, exogene Antigene an CD8<sup>+</sup> T Zellen kreuzzupräsentieren (Limmer et al., 2000). Im Falle der Antigenpräsentation an Effektor T Zellen führt diese Stimulation zur Apoptose oder Inaktivierung der T Zellen (Karrar et al., 2007; Tang et al., 2009; Tokita et al., 2005).

Die Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC führt zunächst ähnlich wie bei der Stimulation durch DC zu T Zell-Aktivierung (Diehl et al., 2008; Schurich et al., 2010). So durchlaufen LSEC-stimulierte CD8<sup>+</sup> T Zellen kurzzeitig eine Effektorphase und sind in der

Lage, proinflammatorische Zytokine zu produzieren sowie Zytotoxizität auszuüben (Schurich et al., 2010 und Böttcher et al., 2013, *in press*). Jedoch resultiert die Interaktion von LSEC mit T Zellen unter homöostatischen Bedingungen in einer schnellen Hochregulation des koinhibitorischen Moleküls B7-H1 bei gleichbleibender Expressionslevel von CD80 und CD86. Die B7-H1-vermittelten inhibitorischen Signale induzieren in LSEC-stimulierten T Zellen einen ruhenden Zustand, der durch fehlende Ausübung von Effektorfunktionen nach Stimulation des TCR gekennzeichnet ist (Diehl et al., 2008; Schurich et al., 2010). Jedoch scheinen LSEC-stimulierte CD8<sup>+</sup> T Zellen nicht in Apoptose zu gehen, sondern zu überleben und exprimieren zudem nach ihrer Aktivierung Rezeptoren für die homöostatischen Zytokine IL-7 und IL-15 sowie das anti-apoptotische Molekül Bcl-2 (Diehl et al., 2008; von Oppen et al., 2009).

Obwohl LSEC verschiedene PRR besitzen, reagieren sie im Gegensatz zu DC auf eine Stimulation über PRR nicht mit Reifung und der Expression von kostimulatorischen Molekülen. So führt unter anderem die Stimulation von TLR4 zwar zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\beta$  und IL-6, aber auch zur Sezernierung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  (Kern et al., 2009; Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010). Eine Stimulation von LSEC mit PRR führt auch nicht zu einer Änderung der Induktion eines ruhenden CD8<sup>+</sup> T Zell-Phänotyps (Kern et al., 2009). Nur eine direkte Infektion von LSEC oder eine sehr hohe Konzentration an Antigen erlaubt die direkte Differenzierung von Effektor T Zellen bei der Stimulation naiver CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC (Kern et al., 2009; Schurich et al., 2010).

## 2 Ziele der Arbeit

In der Leber kommen lokale antigen-präsentierende Zellen (APC) mit löslichen Antigenen aus dem Darmsystem und der systemischen Zirkulation in Kontakt. Die Aufnahme von Antigenen und ihre lokale Präsentation an T Zellen führt unter homöostatischen Bedingungen jedoch nicht zur Entstehung einer Immunreaktion. Vor allem die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) nehmen lösliche Antigene aus dem Blutstrom auf und kreuzpräsentieren diese Antigene zu zirkulierende naiven  $CD8^+$  T Zellen. Diese  $CD8^+$  T Zellen besitzen bei der Stimulation ihres T Zell Rezeptors (TCR) keine Effektorfunktionen. Es war bisher jedoch nicht bekannt, inwiefern sich der Differenzierungszustand von LSEC-stimulierten T Zellen zu anderen antigen-erfahrenen  $CD8^+$  T Zell-Populationen wie Effektor T Zellen und Gedächtnis T Zellen unterscheidet. Auch war bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt, wie sich LSEC-stimulierte T Zellen nach ihrer Entstehung *in vivo* verhalten und ob sie im Laufe einer Infektion aktiviert werden können.

Hieraus ergaben sich folgende zentrale Fragestellungen:

- Führt die Stimulation von naiven  $CD8^+$  T Zellen durch LSEC zu T Zell-Deletion?
- Wie ist das Migrationsverhalten von  $CD8^+$  T Zellen nach ihrer Interaktion mit LSEC *in vivo*?
- Unterscheidet sich der Differenzierungszustand von LSEC-stimulierten T Zellen zu dem Zustand von anderen antigen-erfahrenen T Zellen wie Gedächtnis T Zellen?
- Wie reagieren LSEC-stimulierte T Zellen auf erneuten Antigenkontakt im Kontext einer viralen oder bakteriellen Infektion?
- Können LSEC-stimulierte T Zellen unter diesen Umständen reaktiviert werden?
- Welche Signale sind für eine derartige Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen nötig?
- Unterstützt die Aktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen die Bekämpfung einer Infektion?





## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
C100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer	Canto II; Vantage SE (Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg)
ELISA Lesegerät	Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
Gamma-Bestrahlungsgerät	Biobeam 2000 (MCP-STS, Braunschweig)
In vivo Imaging System 200 (IVIS)	Caliper Lifesciences, Rüsselsheim
Leica CM1900 Kryostat	Leica Microsystems, Wetzlar
Küvette, Quarzglas	10mm Suprasil (Hellma, Mühlheim)
Magnet	EasySep® (Stem Cell Technologies, USA)
Metallsieb	Universität Bonn, Feinmechanik
Mikroskop	IX71 (Olympus, Hamburg)
Mikrotiterplattenwaschhilfe	(Nalge Nunc International, über neoLab, Heidelberg)
Perfusionspumpe	Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company über Novodirect, Kehl/Rhein)
pH-Meter	pH 523 (WTW, Weilheim)
Schüttelwasserbad	GFL® 1092 (GFL®, Burgwedel)
Transwell Insert, 5µm	Corning (Labomedic, Bonn)
Zählkammer	Neubauer (La Fontaine über Labotec, Göttingen)

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Absolut QPCR SYBR® Green PCR Mix	Abgene, Waltham, USA
Aceton ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO)	Applichem, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma, Steinheim
Avertin, 2,2,2-Tribromoethanol 97%	Sigma, Steinheim
BBL Brain-Heart-Infusion (BHI)	BD, Heidelberg
Brain-Heart Infusion Agar	Applichem, Darmstadt
Brefeldin A	ebioscience, San Diego, USA
CpG 1668	TIB, Molbiol, Berlin
D(-)-Fruktose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma, Steinheim
D(+)-Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Applichem, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
GBSS	PAA, Pasching, Österreich
Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma, Steinheim
HEPES (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Sigma, Steinheim
IMDM-Medium	Lonza, Verviers, Belgien
Immu-Mount	Thermo-Scientific
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	DeltaSelect, Pfullingen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Gerbu, Gaiberg
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma, Steinheim
L-Aspartat (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
L-Glutamat (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200mM, C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Cambrex, Verviers, Belgien
L-Serin (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
L-Threonin (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Luciferin	Caliper Lifesciences, Rüsselsheim

Lymphozyten Separationsmedium (LSM)	Nycomed Pharma, Unterschleissheim
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, 50mM	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Sigma, Steinheim
Monensin	ebioscience, San Diego, USA
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Merck, Darmstadt
Nycodenz	Axis-Shield, Norwegen
OVA <sub>257-264</sub> Peptid (SIINFEKL)	Pineda, Berlin
Ovalbumin (OVA)	Serva, Heidelberg
P3UOrv	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. van Endert (INSERM U1013, Université Paris Descartes, Frankreich)
Paraformaldehyd (PFA, $\text{H}(-\text{OCH}_2)_n\text{-OH}$ )	Fluca, Buchs
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10,000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Percoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Saccharose	Sigma, Steinheim
Tissue-Tek® OCT	Sakura, Niederlande
TMB-Substrat für ELISA	Pierce, Bonn
Tris ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Promega, Madison, USA
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt

Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Apotheke der Universität Bonn
β-Mercaptoethanol (HS(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH)	Sigma, Deisenhofen

### 3.1.3 Allgemeine Lösungen

#### 3.1.3.1 Puffer

ACK-Lysepuffer	16,58g NH <sub>4</sub> Cl 2g KHCO <sub>3</sub> 74,4mg EDTA 2000ml H <sub>2</sub> O pH 7,2-7,4
Bindungspuffer für ELISA	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,2
Blockierpuffer für ELISA	0,5% (w/v) BSA in PBS
Blockierpuffer für Gefrierschnitte	1% (w/v) BSA in PBS
EDTA (0,5M)	186,1g EDTA ca. 20g NaOH 1000ml H <sub>2</sub> O pH 7,8-8,0
FACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS 2mM EDTA
MACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS 2mM EDTA pH 7,2
PBS	80g/l NaCl 0,2g/l KCl 1,44g/l NaHPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O 0,2g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 (Fa. Biochrom)

Perfusionspuffer für die Leber	0,01g L- Aspartat 0,02g L-Threonin 0,03g L-Serin 0,04g Glycin 0,05g L-Alanin 0,13g L-Glutamat 0,13g L-Glutamin 3,6g D(+)-Glukose 3,6g D(-)-Fruktose 67,4g Saccharose 0,22g KCl 0,1g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O 0,1g MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 2,4g HEPES 2,0g NaHCO <sub>3</sub> 1000ml H <sub>2</sub> O 0,05% (v/v) Kollagenase
Perfusionspuffer zur Isolation von Milz DC	GBSS 0,5% (v/v) Kollagenase
Permeabilisationspuffer	ebioscience, San Diego, USA
Waschpuffer für ELISA	0,05% (v/v) Tween-20 in PBS

### 3.1.3.2 Zellkulturmedien

BHI Medium	ddH <sub>2</sub> O mit 37g/l BHI
LSEC-Medium	DMEM High Glucose (4500mg/l) 10% (v/v) FCS 10 <sup>5</sup> U Penicillin, 0,1g/l Streptomycin 2mM L-Glutamin
RMA-Medium	RPMI 1640 5% (v/v) FCS 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1g/l Streptomycin 2mM L-Glutamin 50µM β-Mercaptoethanol

T Zell-Medium	RPMI 1640 10% (v/v) FCS 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1g/l Streptomycin 2mM L-Glutamin 50µM β-mercaptoethanol
---------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.1.4 Kit Systeme

Alle Kit Systeme wurden nach Angaben des Herstellers benutzt.

BrdU Flow Kit	BD, Heidelberg
CD8α T cell isolation kit	Miltenyi, Begisch Gladbach
Click-iT™ EdU Alexa Fluor® 488 Cell Proliferation Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	ebioscience, San Diego, USA
LIVE/DEAD Fixable NearIR Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Karlsruhe
LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
TargetAmp Nano-g Biotin aRNA Labeling Kit	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

### 3.1.5 Antikörper

Falls nicht anders angegeben waren benutzte Antikörper gegen murine Epitope gerichtet und wurden entweder unkonjugiert, biotinyliert oder als Fluorochrom-Konjugate eingesetzt (Pacific Blue, Fluoresceinisothiocyanat, Phycoerythrin, Percp-Cy5.5, Allophycocyanin).

Antigen	Isotyp	Klon	Kommentar	Firma
BrdU	IgG1, Maus	B44		BD, Heidelberg
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	= Integrin αX	BD, Heidelberg
CD122	IgG2a κ, Ratte	5H4		ebioscience, San Diego, USA
CD127	IgG2b κ, Ratte	SB/199		ebioscience, San Diego, USA

CD16/32	IgG2b κ, Ratte	2.4G2	= anti-FcRγII + III	Eigene Produktion
CD25	IgG2b κ, Ratte	3C7	= IL-2-Rezeptor α-Kette	BD, Heidelberg
CD27	IgG1, Hamster	LG.7F9		ebioscience, San Diego, USA
CD3ε	IgG1 κ, Hamster	145-2C11		BD, Heidelberg
CD44	IgG2b κ, Ratte	IM7	= Pgp-1, Ly-24	BD, Heidelberg
CD45.1	IgG2a κ, Maus	A20		ebioscience, San Diego, USA
CD62L	IgG2a κ, Ratte	MEL-14	= L-Selektin, Ly-22	BD, Heidelberg
CD69	IgG1, Hamster	H1.2F3		
CD8α	IgG2a κ, Ratte	53-6.7	= Ly2	BD, Heidelberg und eigene Produktion
CD90.1	IgG2a κ, Maus	HIS51	= Thy1.1	ebioscience, San Diego, USA
DEC-205	IgG2a κ, Ratte	NLDC-145		BMA Biomedicals, Schweiz
Eomesodermin	IgG2a κ, Ratte	Dan11mag	= Eomes	ebioscience, San Diego, USA
F4/80	IgG2a κ, Ratte	BM8		ebioscience, San Diego, USA
Granzym B	IgG1, Maus	GB11	anti-human, kreuzreaktiv mit Maus	Invitrogen, Karlsruhe
H-2K <sup>b</sup>	IgG1, Maus	5F1		Von M. Hoffmann, Hannover
IFNγ	IgG1 κ, Ratte	XMG1.2		ebioscience, San Diego, USA

IL-2	IgG2a κ, Ratte	JES6-1A12		ebioscience, San Diego, USA
Isotyp Antikörper	IgG1 κ, Ratte	eBRG 1		ebioscience, San Diego, USA
Isotyp Antikörper	IgG2b κ, Ratte	eB149/10H5		ebioscience, San Diego, USA
Isotyp Antikörper	IgG2a κ, Ratte	eBR2a		ebioscience, San Diego, USA
Isotyp Antikörper	IgG1, Maus	P3.6.2.8.1		ebioscience, San Diego, USA
Isotyp Antikörper	IgG2a κ, Maus	eBM2a		ebioscience, San Diego, USA
Isotyp Antikörper	IgG1, Hamster	ebio299arm		ebioscience, San Diego, USA
Neuropilin-1	IgG, Ziege	polyklonal		R&D, Wiesbaden
NK1.1	IgG2a κ, Maus	PK136	Für <i>in vivo</i> Depletion	Eigene Produktion
T-bet	IgG1, Maus	eBio4B10		ebioscience, San Diego, USA

### 3.1.6 Fluorochrome

CFSE	(CFDA-SE), Molecular Probes, Leiden, Niederlande
FarRed	DDAO-SE, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Streptavidin-APC	BD, Heidelberg
Streptavidin-PE	BD, Heidelberg



### 3.1.7 Primer

Alle Primer wurden über den Quantitect Primer Assay (Qiagen, Hilden) bezogen.

Zielgen	Produktnummer
Eomesodermin	QT01074332
HPRT	QT00166768
T-bet	QT00129822

### 3.1.8 Beschichtete Partikel

#### 3.1.8.1 Antikörper-beschichtete Partikel

anti-CD11c (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD146 (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD3/Anti-CD28 (CD3/28)	Invitrogen, Karlsruhe
anti-CD8 $\alpha$ (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD90 (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach

#### 3.1.8.2 Fluorochrom-beschichtete Partikel

CountBright™ absolute counting beads	Invitrogen, Karlsruhe
--------------------------------------	-----------------------

### 3.1.9 Enzyme

AffinityScript™ Multiple Temperature Reverse Transcriptase	Stratagene
Kollagenase	Sigma, Steinheim und Roche, Basel, Schweiz
Peroxidase	Pierce, Rockford, USA

### 3.1.10 Zytokine und Chemokine

CCL19	Peprotech, Rocky Hill, USA
CCL21	Peprotech, Rocky Hill, USA
Interferon- $\alpha$ (IFN $\alpha$ )	PBL Biomedical Laboratories
Interferon- $\gamma$ (IFN $\gamma$ )	Peprotech, Rocky Hill, USA
Interleukin-12 (IL-12)	Von Prof. Dr. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt
Interleukin-15 (IL-15)	ebioscience, San Diego, USA
Interleukin-2 (IL-2)	Peprotech, Rocky Hill, USA
Interleukin-23 (IL-23)	ebioscience, San Diego, USA
Interleukin-6 (IL-6)	ebioscience, San Diego, USA
Interleukin-7 (IL-7)	ebioscience, San Diego, USA
TNF	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.11 Zelllinien

RMA	NK Zell-Hybridom, H-2K <sup>b</sup> -exprimierend
-----	---------------------------------------------------

### 3.1.12 Mauslinien

Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen („specific pathogen free“) im Haus für Experimentelle Therapie (HET) oder in den Instituten für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie (IMMEI) am Universitätsklinikum Bonn gezüchtet und gehalten.

Mauslinie	Beschreibung
B6.CH-2 <sup>bm1</sup> (bm1)	Mauslinie auf C57BL/6 Hintergrund. Eine Punktmutation im MHC Klasse I Molekül H-2K <sup>b</sup> verhindert die Präsentation des OVA <sub>257-264</sub> Peptids SIINFEKL (Clarke et al., 2000)
B6(Cg)-Tyrc-2J/J (C2J)	Inzuchtstamm auf C57BL/6 Hintergrund. Diese Mäuse tragen eine Mutation im Tyrosinase-Gen in und haben daher weißes Fell (Stabenow et al., 2010).
C57BL/6	Inzuchtstamm mit dem MHC I Haplotyp H-2 <sup>b</sup> (Wildtyp-Mäuse)

CD45.1 OT-I	Kreuzung der OT-I Mauslinie mit der CD45.1 Mauslinie auf C57BL/6 Hintergrund. Die Immunzellen dieser Mäuse exprimieren ein bestimmtes Allel (CD45.1) des Moleküls CD45, welches spezifisch angefärbt und daher als kongener Marker zur Unterscheidung von Immunzellen aus C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (CD45.2) benutzt werden kann (Mardiney and Malech, 1996).
cd80/86 <sup>-/-</sup>	CD80/86 Knockout-Stamm auf C57BL/6 Hintergrund (Borriello et al., 1997)
CD90.1 OT-I	Kreuzung der OT-I Mauslinie mit der CD90.1 Mauslinie auf C57BL/6 Hintergrund (B6.PL-Thy1 <sup>a</sup> /CyJ, bezogen von The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Die Lymphozyten dieser Mäuse exprimieren ein bestimmtes Allel (CD90.1) des Moleküls CD90, welches spezifisch angefärbt und daher als kongener Marker zur Unterscheidung von Lymphozyten aus C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (CD90.2) verwendet werden kann.
il12p35 <sup>-/-</sup>	IL-12 Knockout-Stamm auf C57BL/6 Hintergrund (Cousens et al., 1999)
OT-I	Mauslinie mit transgenem T Zell-Rezeptor, der von CD8 <sup>+</sup> T Zellen exprimiert wird. Dieser T Zell-Rezeptor erkennt das OVA <sub>257-264</sub> Peptid (SIINFEKL) auf H-2K <sup>b</sup> Molekülen (Hogquist et al., 1994).
rag2 <sup>-/-</sup>	RAG2 Knockout-Stamm auf C57BL/6 Hintergrund (Shinkai et al., 1992).

### 3.1.13 Rekombinante Bakterien und Viren

<i>Listeria monocytogenes</i> -OVA ( <i>L.m.</i> -OVA)	Von Prof. Dr. Dirk Busch (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt
Adeno-OVA (AdOVA), Adeno-GFP (AdGFP), Adeno-OVALUC (AdOVA-LUC)	Von Dirk Wohlleber (IMMEI, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt

**3.1.14 Computersoftware**

<b>Software</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Firma</b>
Bioconductor Projekt	Analyse von Genexpressionsdaten	<a href="http://www.bioconductor.org">http://www.bioconductor.org</a> ; Gentleman et al., 2004)
Biobay Express 3D	Analyse von Genexpressionsdaten	<a href="http://www.biobay.org">http://www.biobay.org</a>
Cell F	Analyse von Mikroskopiebildern	Olympus, Hamburg
DAVID Bioinformatics	Analyse von Genexpressionsdaten	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov">http://david.abcc.ncifcrf.gov</a> ; Huang da et al., 2009)
Excel 2011	Datenanalyse	Microsoft
FACS Diva V6.1.1	Analyse von durchflusszytometrischen Daten und FACS (siehe 3.2.6.5)	BD, Heidelberg
Flowjo V9.5.3	Analyse von durchflusszytometrischen Daten	Tree star, Inc.
Illustrator CS 5	grafische Aufbereitung	Adobe
Living Image 2.50.1	Analyse von Biolumineszenzdaten	Caliper LifeSciences
Mayday	Analyse von Genexpressionsdaten	<a href="http://www.ps.informatik.uni-tuebingen.de/mayday/wp/">http://www.ps.informatik.uni-tuebingen.de/mayday/wp/</a>
Microwin 2000 V4.37	Analyse von ELISA-Daten	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath
Partek Genomic Suite	Analyse von Genexpressionsdaten	Partek Incorporated, Saint Louis, USA
Prism 5	Statistik und grafische Aufbereitung	GraphPad
R Statistical language	Analyse von Genexpressionsdaten	<a href="http://www.r-project.org">http://www.r-project.org</a>
Word 2011	Datenanalyse und Auswertung	Microsoft

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolation von primären murinen Zellen

Für alle Versuche wurden Mäuse im Alter von 6-20 Wochen verwendet. Vor der Organentnahme wurden die Tiere durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet und ihre Oberfläche mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt.

#### 3.2.1.1 Isolation von primären Zellen durch magnetische Separation (MACS)

Um Zellen mit magnetischer Separation aufzureinigen, wurden diese zunächst in einem definierten Volumen von MACS-Puffer aufgenommen und zelltyp-spezifische paramagnetische MACS-Partikel hinzugefügt (500µl MACS-Puffer und 25-50µl MACS-Partikel pro 100x10<sup>6</sup> Zellen). Nach 15 Min. Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, um freie MACS-Partikel zu entfernen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C). Anschließend wurden die Zielzellen mit dem Programm „POSSEL“ am AutoMACS aufgereinigt.

Die Isolation von CD8<sup>+</sup> T Zellen mit dem „CD8α T cell Isolation Kit“ erfolgte in einem zweistufigen Prozess. Hierfür wurden die Milzsuspensionszellen zuerst für 10 Min. bei 4°C mit einem Biotin-Antikörpercocktail (200µl MACS-Puffer und 50µl/100x10<sup>6</sup> Zellen) inkubiert und danach für weitere 15 Min. mit anti-Biotin MACS-Partikeln (150µl MACS-Puffer und 100µl/100x10<sup>6</sup> Zellen) inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte dann die Aufreinigung der CD8<sup>+</sup> T Zellen über das Programm „DEplete“ am AutoMACS.

#### 3.2.1.2 Isolation von primären Zellen aus der Leber

Die Isolation von primären Zellen aus der Leber erfolgte nach mit Perfusionspuffer. Hierfür wurde zunächst eine Kanüle in die Pfortader (*Vena porta*) eingeführt. Nach Durchtrennung der *Vena cava* wurde die Leber für 20-30s mit Perfusionspuffer perfundiert. Anschließend wurde die Gallenblase durchtrennt, die Leber entnommen und zur weiteren Aufreinigung von Leberzellen in GBSS überführt.

#### 3.2.1.3 Isolation von LSEC aus der Leber

Die Leber wurde in eine Petrischale überführt und mit einer gebogenen Schere zerkleinert. Anschließend wurde die Leber in 2ml GBSS mit 0,05% Kollagenase aufgenommen, in ein 50ml Einmalröhrchen überführt und für 15 Min. bei 37°C im Schüttelwasserbad geschüttelt. Nach einem Waschschrift in GBSS (Zentrifugation 10

Min., 350xg, 4°C) wurde das Zellpellet in 1ml GBSS aufgenommen, im Verhältnis 1:1,23 mit 30% Nycodenz (v/v) gemischt und mit 500µl GBSS überschichtet. Nach anschließender Gradientenzentrifugation (20 Min., 1400xg, 4°C, keine Bremse) wurde die Interphase abgenommen und in 10ml MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C). Aus dieser Zellsuspension wurden LSEC mit magnetischer Separation gegen CD146 aufgereinigt und anschließend in LSEC-Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die LSEC in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert (10<sup>6</sup> LSEC pro Well in 500µl LSEC-Medium).

#### **3.2.1.4 Isolation von Leukozyten aus der Leber**

Zur Isolation von Leukozyten wurde die Leber durch ein Metallsieb gedrückt. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde in GBSS gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C) und anschließend das Zellpellet in 4ml 40% Percoll-Lösung (40% Percoll in PBS, v/v) aufgenommen und mit 2ml einer 80% Percoll-Lösung (80% Percoll in PBS, v/v) unterschichtet. Nach Gradientenzentrifugation (20 Min., 800xg, 4°C, ohne Bremse) wurde die oberste Zellschicht (Hepatozyten und Zellschrott) verworfen und die Interphase mit den Leukozyten entnommen. Die Leukozyten aus der Leber wurden entweder direkt für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt oder vorher *in vitro* stimuliert (siehe Abschnitt 3.2.5.1).

#### **3.2.1.5 Isolation von Zellen aus Lymphknoten**

Zunächst wurden der Maus inguinale oder axilläre Lymphknoten entnommen und in 10ml T Zell-Medium überführt. Die Lymphknoten wurden dann durch ein Metallsieb gedrückt, die Zellsuspension einmal in T Zell-Medium gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C) und zur weiteren Analyse in FACS-Puffer aufgenommen.

#### **3.2.1.6 Isolation von Zellen aus dem Blut**

Den Mäusen wurde ein definiertes Blutvolumen (je nach Versuch 100-300µl) aus der Schwanzvene entnommen und in PBS überführt. Nach Zentrifugation (3 Min., 350xg, 4°C) wurde das Zellpellet für 10 Min. in 500µl ACK-Lysepuffer inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die so erhaltenen Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und für weitere Analysen gefärbt.

### 3.2.1.7 Isolation von CD8<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz

Um CD8<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz zu isolieren wurde die Milz nach Entnahme aus der Maus durch ein Metallsieb gedrückt. Die erhaltenen Zellen wurden in 10ml T Zell-Medium gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C) und anschließend mit CD8 $\alpha$  MACS Separation weiter aufgereinigt (siehe 3.2.1.1). Bei Versuchen mit anschließender Sortierung von T Zellen mit FACS wurde dabei das „CD8 $\alpha$  T cell Isolation Kit“ benutzt. Bei der Isolation von naiven OT-I T Zellen für Kokulturversuche mit LSEC oder DC wurde den entsprechenden OT-I Mäusen zwei Tage vor der Organentnahme 300 $\mu$ g anti-NK1.1-Antikörper intraperitoneal (i.p.) gespritzt.

### 3.2.1.8 Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz

Um dendritische Zellen (DC) aufzureinigen wurde in die Milz einer C57BL/6 Wildtyp-Maus in 1,5ml Perfusionspuffer injiziert. Die Milz wurde anschließend mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten und für 20 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Milzstücke durch ein Metallsieb gedrückt und in MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C). Danach erfolgte die Aufreinigung von CD11c<sup>+</sup> DC mittels MACS (siehe 3.2.1.1). Die DC wurden anschließend in T Zell-Medium aufgenommen und ihre Anzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um reife DC zu erhalten, wurde der C57BL/6 Maus 4-6h vor Entnahme der Milz 100 $\mu$ g CpG 1668 intravenös (i.v.) gespritzt.

### 3.2.1.9 Isolation von Zellen aus dem Knochenmark

Der Maus wurden *Tibiae* und *Femora* entnommen und von diesen Muskelfleisch und Sehnen entfernt. Die Knochen wurden kurz in 70% Ethanol (v/v) getaucht und anschließend an beiden Enden aufgeschnitten. Mithilfe einer Spritze wurden die Knochenmarkszellen herausgespült und durch Nylongaze gefiltert. Aus den Knochenmarkszellen wurden reife CD90.2<sup>+</sup> Lymphozyten mittels einer MACS Separation isoliert und diese Fraktion verworfen. Die CD90.2<sup>-</sup> Fraktion wurde für die Herstellung von Knochenmarkschimären benutzt (siehe 3.2.3).

### 3.2.2 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter folgenden Bedingungen kultiviert: 37°C, relative Luftfeuchtigkeit 90%, CO<sub>2</sub>-Gehalt 5%.

#### 3.2.2.1 Kokultur von CD8<sup>+</sup> OT-I Zellen mit LSEC oder DC

Für die Kokultur wurden 8x10<sup>5</sup> CD8<sup>+</sup> OT-I T Zellen in 2ml T Zell-Medium auf LSEC oder reifen DC inkubiert. Als APC wurden frisch isolierte (reife) DC aus der Milz von C57BL/6 Mäusen (0,5x10<sup>6</sup>/Well) oder *in vitro* kultivierte LSEC (1x10<sup>6</sup>/Well), welche 72h zuvor ausplattiert worden waren, verwendet. Zur antigen-spezifischen Stimulation von OT-I T Zellen wurden zu DC 1mg/ml OVA und zu LSEC 0,1mg/ml OVA hinzugegeben. Falls nicht anders angegeben wurden die T Zellen 4 Tage später für weitere Versuche aus der Kokultur aufgereinigt.

#### 3.2.2.2 Aufreinigung von T Zellen aus der Kokultur

Um T Zellen aus der Kokultur mit LSEC oder reifen DC zu isolieren, wurden die nicht-adhärenen Zellen mit MACS-Puffer von den adhärenen Zellen gespült. Anschließend wurden die Zellen in 5ml T Zell-Medium resuspendiert und dieses mit 2ml Lymphozyten Separationsmedium unterschichtet. Nach Gradientenzentrifugation (10 Min., 850xg, 20°C, ohne Bremse) wurde die Interphase abgenommen und in 20ml T Zell-Medium gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C). Die so erhaltenen T Zellen wurden in T Zell-Medium aufgenommen, gezählt und für weitere Versuche verwendet.

#### 3.2.2.3 Bestimmung von Zellzahlen

Zellsuspensionen wurden 1:10 in Trypan Blau verdünnt und 10µl dieser Verdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Bestimmung der Zellzahl in der ursprünglichen Zellsuspension erfolgte nach der Auszählung von lebenden (nicht blau gefärbten) Zellen in vier Großquadranten der Zählkammer und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} \left[ \frac{1}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{lebende Zellen} [\text{gezählt}]}{4} \times 10 [\text{Verdünnungsfaktor}] \times 10000 [\text{Kammerfaktor}]$$

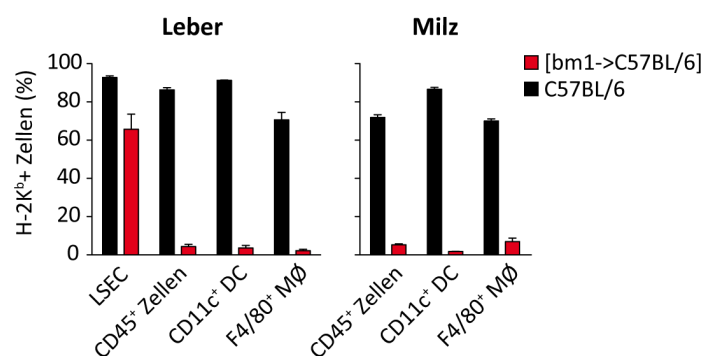


### 3.2.3 Herstellung von [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären

Um [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären herzustellen, wurden C57BL/6 Mäuse im Gamma-Bestrahlungsgerät mit einer Dosis von 9 Gy (900rad) pro Maus bestrahlt (von Oppen et al., 2009). Am nächsten Tag wurde diesen Mäusen CD90.2<sup>-</sup> Knochenmarkszellen aus B6.CH-2<sup>bm1</sup> (bm1) gespritzt ( $8-12 \times 10^6$ /Maus). 8 Wochen später wurde die erfolgreiche Rekonstitution des Knochenmarks durch die transferierten bm1-Zellen mittels Durchflusszytometrie überprüft (siehe 3.2.3.1).

#### 3.2.3.1 Validierung von [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären

Die Rekonstitution des Knochenmarks in [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären wurde mithilfe der Oberflächenfärbung von H-2K<sup>b</sup> durch den 5F1-Antikörper auf Leukozyten im Blut überprüft. Nur Tiere mit <5% H-2K<sup>b+</sup>-Leukozyten im Blut wurden für Versuche verwendet. In der folgenden Abbildung ist dazu zusätzlich die H-2K<sup>b</sup>-Expression auf APC-Populationen dargestellt, die aus Leber und Milz von [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären isoliert wurden (rote Balken). APC aus Leber und Milz von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen dienten hierbei als Kontrolle (schwarze Balken). Diese Daten zeigen, dass in [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären nur LSEC und nicht andere APC das H-2K<sup>b</sup>-Molekül exprimieren. Da alle knochenmarksabhängigen APC wie DC das H-2K<sup>bm1</sup> Molekül exprimieren, sind diese APC nicht in der Lage, das OVA-Peptid SIINFEKL auf MHC I zu präsentieren.



**Abbildung 3.2-1** Die für die Kreuzpräsentation von OVA nötige Expression von H-2K<sup>b</sup> ist in [bm1->C57BL/6] Chimären auf LSEC beschränkt. Aus Leber und Milz von [bm1->C57BL/6] oder C57BL/6 Mäusen wurden Leukozyten isoliert und die Expression von H-2K<sup>b</sup> mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Färbung der APC-Populationen erfolgte entsprechend der angegebenen Marker nach Färbung von lebenden Zellen durch das LIVE/DEAD Kit, LSEC wurden über die Färbung von CD146 identifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD für 3 Mäuse pro Gruppe.

### **3.2.4 Stimulation von T Zellen *in vivo***

#### **3.2.4.1 Adoptiver Transfer von T Zellen**

Der adoptive Transfer von T Zellen (je nach Experiment  $5 \times 10^2$  bis  $5 \times 10^6$  T Zellen/Maus) erfolgte durch die Injektion in die Schwanzvene.

#### **3.2.4.2 Infektion mit rekombinanten Adenoviren**

Alle benutzen rekombinanten Adenoviren wurden von Dr. Dirk Wohlleber (IMMEI, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Diese Adenoviren exprimieren OVA (AdOVA), GFP (AdGFP) oder ein Fusionsprotein aus OVA und Luciferase (AdOVA-LUC) unter dem CMV Promoter und sind durch die Deletion der Gene E1 und E3 nicht zur Replikation fähig (Stabenow et al., 2010; Wohlleber et al., 2012). Zur Infektion von Mäusen wurde das rekombinante Adenovirus in NaCl-Lösung verdünnt und  $5 \times 10^6$  PFU/Maus intravenös gespritzt.

#### **3.2.4.3 Messung der *in vivo* Biolumineszenz nach AdOVA-LUC Infektion**

Die Messung der *in vivo* Biolumineszenz erfolgte nach Infektion von C2J oder *rag2<sup>-/-</sup>* Mäusen mit AdOVA-LUC (siehe 3.2.4.2). Grundlage für diese Messung ist die Expression des Enzyms Luciferase in Leberzellen der Maus nach Infektion durch AdOVA-LUC *i.v.* (Stabenow et al., 2010). Spritzt man AdOVA-LUC-infizierten Mäusen Luciferin, das Substrat der Luciferase, so wird dieses abhängig von Sauerstoff *in vivo* in einer enzymatischen Reaktion zu Oxyluciferin umgesetzt. Bei dieser enzymatischen Reaktion kommt es zur Freisetzung von Energie in Form von Photonen, die mit der Kamera im IVIS System gemessen werden können. Den Tieren wurde zur Analyse 2,5mg Luciferin *i.p.* gespritzt und 5 Min. nach Inhalationsnarkose mit Isofluran die Biolumineszenz im IVIS System detektiert (siehe auch (Stabenow et al., 2010)).

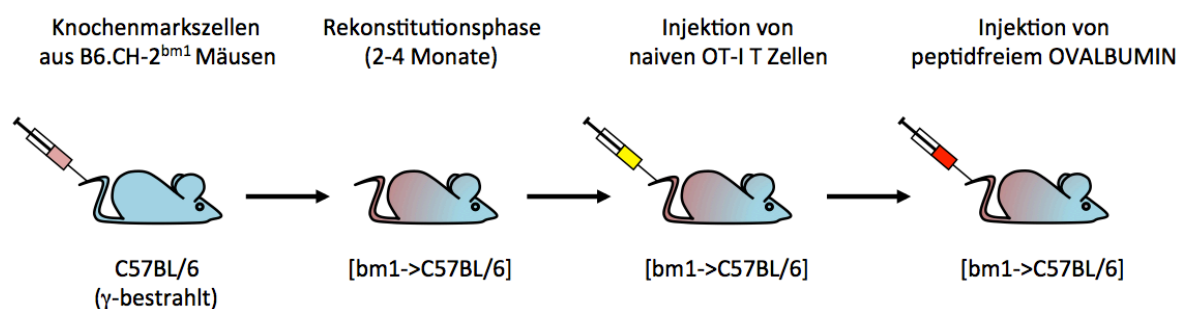
#### **3.2.4.4 Messung der Proliferation von T Zellen *in vivo***

Zur Proliferationsmessung *in vivo* wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Um die Anzahl proliferierter T Zellen über den Gesamtzeitraum eines Versuchs zu bestimmen, wurden diese vor dem adoptiven Transfer mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert (siehe 3.2.6.4). Bei der Zellteilung kommt es zur Verdünnung des CFSE-Signals, somit kann die Zellteilung von stimulierten T Zellen im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrollgruppe mittels Durchflusszytometrie gemessen werden.

Um die Anzahl an proliferierenden T Zellen während einer bestimmten Zeitspanne *in vivo* zu bestimmen, wurde den entsprechenden Mäusen 20h vor Organentnahme 1,5mg BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) i.p. gespritzt. BrdU ist ein Nukleosidanalogen und wird bei der Zellteilung in die DNA der Zellen eingebaut. Die Detektion von BrdU erfolgte mit dem „BrdU Flow Kit“ wie vom Hersteller angegeben.

### 3.2.4.5 Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> OT-I Zellen durch LSEC *in vivo*

Zur Stimulation durch LSEC *in vivo* wurden zunächst naive OT-I T Zellen aus den Milzen von OT-I Mäusen durch CD8 $\alpha$  MACS isoliert und anschließend  $1 \times 10^6$  OT-I T Zellen adoptiv in [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären transferiert. Einen Tag später erhielten diese Mäuse eine Injektion von löslichem, peptidfreiem Ovalbumin (1mg/Maus). Dieses OVA wird *in vivo* von LSEC aufgenommen und kreuzpräsentiert (Schurich et al., 2009; von Oppen et al., 2009). Da in [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären nur LSEC, jedoch nicht knochenmarksabhängige APC wie DC das MHC I Molekül H-2K<sup>b</sup> besitzen, können H-2K<sup>b</sup>-restringierte SIINFEKL-spezifische OT-I T Zellen in diesem Modell nur von LSEC stimuliert werden (siehe 3.2.3.1; von Oppen et al., 2009). In den meisten Versuchen wurden die OT-I T Zellen für vier Tage nach OVA-Injektion für weitere Versuche benutzt, die Expression des kongenen Markers CD45.1 oder CD90.1 diente dabei der Identifizierung der transferierten OT-I T Zellen. In manchen Versuchen wurden die Zellen zusätzlich mit CFSE markiert, um ihre Proliferation zu untersuchen.



**Abbildung 3.2-2 Schematische Darstellung der Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> OT-I T Zellen *in vivo*.**  
Modifiziert nach Böttcher et al., 2013, *in press*.

### 3.2.4.6 DEC-205-vermittelte Präsentation von OVA durch unreife DC

Das P3UOrv-Protein ist ein rekombinantes Fusionsprotein aus drei Immunglobulin-Bindungsdomänen des Protein G, einem Ubiquitin-Molekül und OVA, 57% des Gewichtes von P3UOrv entfallen dabei auf OVA (Kratzer et al., 2010). Die Protein G-Bindungsdomänen erlauben die hochaffine Bindung von Antikörpern der Klasse IgG. In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde zur Herstellung von DEC205:P3UOrv-Komplexen ein anti-DEC-205-Antikörper (DEC205) an P3UOrv gekoppelt, ein IgG Isotyp-Antikörper diente in den entsprechenden Versuchen als Kontrolle (Kratzer et al., 2010). Für die Kopplung wurden beide Proteine im Gewichtsverhältnis von 1:1 gemischt und für 60 Min. bei 4°C inkubiert. Dieses Gemisch mit DEC205:P3UOrv-Komplexen wurde in PBS verdünnt und den Mäusen 1µg OVA-Äquivalent i.p. gespritzt. Im Fall von DEC205:P3UOrv-Komplexen führt dies zur Aufnahme des Fusionsproteins durch DEC-205<sup>+</sup> unreife DC und zur Kreuzpräsentation von OVA ohne eine Reifung der DC auszulösen (Bonifaz et al., 2002; Kratzer et al., 2010). Die Analyse der Tiere erfolgte nach 7-12 Tagen.

### 3.2.4.7 Infektion mit *L.m.*-OVA

OVA-exprimierende *Listeria monocytogenes* (*L.m.*-OVA) wurden in 10ml BHI-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 100µl dieser Übernachtskultur in 10ml frisches BHI-Medium überführt und erneut bei 37°C inkubiert (log-Kultur). Jede Stunde wurde die Konzentration an Bakterien in der log-Kultur durch die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD600) gemessen. Sobald sich eine logarithmische Wachstumsphase einstellte, wurde die log-Kultur dreimal in PBS gewaschen (Zentrifugation 10 Min, 4500xg, 20°C) und erneut die OD600 gemessen. Die Bakterienkonzentration (CFU<sup>16</sup>/ml) wurde anschließend mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Bakterienkonzentration (CFU)} = 1,24 \times 10^9 \times \text{OD600}_{\text{PROBE}}$$

Die Infektion der Mäuse erfolgte je nach Versuch durch die i.p. Injektion von  $5 \times 10^3$  oder  $5 \times 10^4$  CFU *L.m.*-OVA.

---

<sup>16</sup> Engl.: colony forming units

### 3.2.4.8 Bestimmung der bakteriellen Last nach *L.m.*-OVA Infektion

Zur Bestimmung der bakteriellen Last nach Infektion mit *L.m.*-OVA wurden den infizierten Tieren Leber und Milz entnommen. Nach Herstellung einer Einzelsuspension des jeweiligen Organs wurde diese Suspension in 0,1% Triton X-100/PBS in drei Schritten verdünnt (Verdünnungsfaktor 1:10, 1:100 und 1:1000) und 100µl von jedem Verdünnungsschritt auf jeweils drei BHI Agarplatten verstrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag die Anzahl der Kolonien gezählt. Aus dieser Messung wurde dann die bakterielle Last des gesamten Organs (angegeben als CFU/Organ) berechnet.

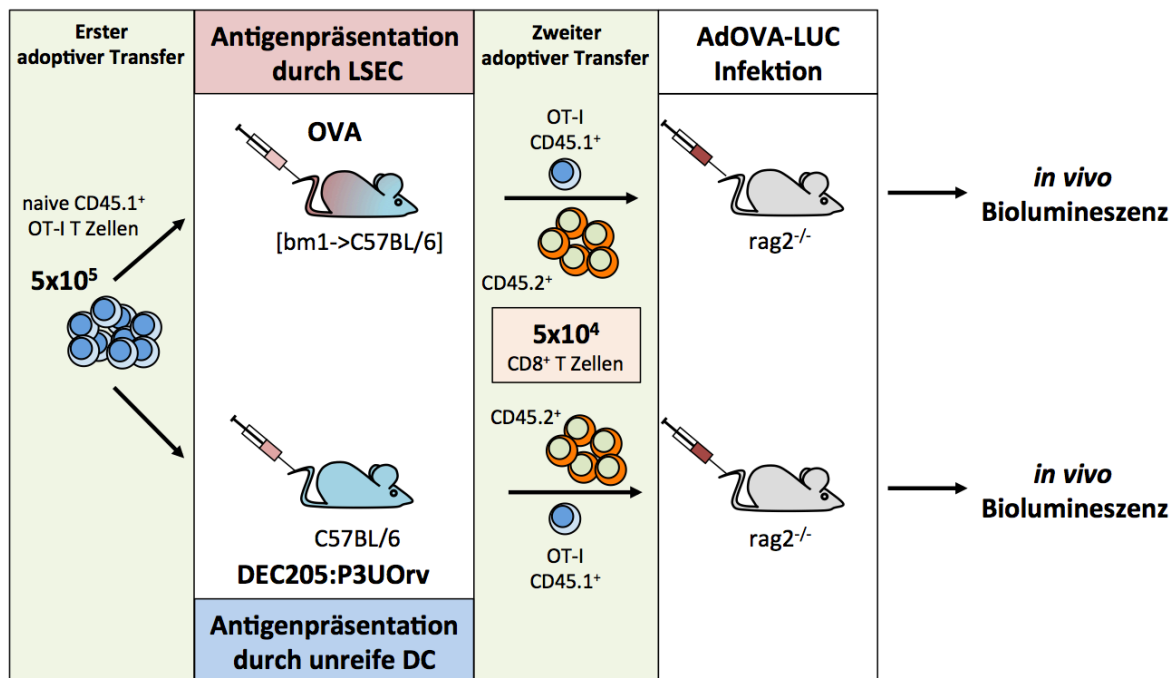
### 3.2.4.9 Generierung von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen

500 naive CD45.1<sup>+</sup> oder CD90.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen wurden adoptiv in CD45.2<sup>+</sup>CD90.2<sup>+</sup> C57BL/6 Mäuse transferiert. Einen Tag später wurden diese Tiere mit 5x10<sup>3</sup> CFU *L.m.*-OVA i.p. infiziert. Gedächtnis T Zellen wurden 45-70 Tage später aus den jeweiligen Organen der Maus isoliert. Die Identifizierung der Gedächtnis OT-I T Zellen erfolgte durch die Expression des kongenen Markers CD45.1 oder CD90.1 zusammen mit einem CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Phänotyp. Zentrale Gedächtnis T Zellen (TCM, CD62L<sup>+</sup>) und Effektor Gedächtnis T Zellen (TEM, CD62L<sup>-</sup>) wurden auf Basis der CD62L-Expression unterschieden. Für funktionelle Analysen oder adoptiven Transfer wurden zunächst die T Zellen aus der Milz durch das „CD8α T cell isolation kit“ via MACS aufgereinigt und danach TCM und TEM entsprechend des beschriebenen Phänotyps mittels FACS sortiert.

### 3.2.4.10 Versuchsaufbau zum Vergleich der T Zell-Antwort von OT-I T Zellen nach Stimulation durch LSEC oder unreife DC

Um die Auswirkungen der Antigenpräsentation durch LSEC oder unreife DC direkt miteinander zu vergleichen, wurden naive CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen mit CFSE markiert (siehe 3.2.6.4). Anschließend wurde die gleiche Anzahl dieser naiven CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen adoptiv in C57BL/6 Wildtyp-Mäuse oder [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären transferiert (Erster adoptiver Transfer). Anschließend wurde [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären 1mg OVA gespritzt, was zur Kreuzpräsentation von OVA durch LSEC, aber nicht durch DC, führt (siehe 3.2.3.1; von Oppen et al., 2009). Um eine Kreuzpräsentation von OVA durch unreife DC, aber nicht durch LSEC, zu erzielen, wurde den verwendeten C57BL/6 Mäusen DEC205:P3Uorv gespritzt (siehe 3.2.4.6; Bonifaz et al.,

2002; Kratzer et al., 2010). Sieben Tage später wurde aus den Milzen der Mäuse CD8<sup>+</sup> T Zellen isoliert und  $5 \times 10^4$  dieser T Zellen in *rag2*<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert, welche zwei Tage zuvor mit AdOVA-LUC infiziert worden waren (zweiter adoptiver Transfer). Zudem wurde am Durchflusszytometer gemessen, ob in jeder Gruppe von CD45.1<sup>+</sup> T Zellen eine Verdünnung des CFSE-Signals stattgefunden hat, gleichbedeutend mit erfolgreicher Stimulation dieser T Zellen *in vivo* (siehe auch Böttcher et al., 2013, *in press*). Nach dem zweiten adoptiven Transfer wurde dann die Biolumineszenz in infizierten Tieren über die Zeit gemessen (siehe 3.2.4.3) und an Tag 13 nach AdOVA-LUC Infektion die Anzahl von CD45.1<sup>+</sup> T Zellen bestimmt.



**Abbildung 3.2-3** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Vergleich der T Zell-Antwort von OT-I T Zellen nach Stimulation durch LSEC oder unreife DC *in vivo*. Modifiziert nach Böttcher et al., 2013, *in press*.

Mit diesem kombinierten Versuch sollte die *in vivo* Situation nachgestellt werden, in der eine geringe Anzahl von naiven T Zellen zunächst ihr Antigen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen durch LSEC oder unreife DC präsentiert bekommt, bevor es im Kontext einer Infektion erneut auf dieses Antigen trifft. Durch die Analyse der Biolumineszenz und die Quantifizierung der CD45.1<sup>+</sup> T Zellen an Tag 13 nach Infektion wurde sowohl die Fähigkeit der Expansion als auch die Differenzierung in Effektor T Zellen analysiert.

Bei dem zweiten adoptiven Transfer berücksichtigt die Normalisierung der Anzahl an transferierter T Zellen auf die Zahl endogener T Zellen sowohl den Effekt der initialen Stimulationsbedingungen (durch LSEC oder DC) auf das Überleben der CD45.1<sup>+</sup> T Zellen als auch deren Fähigkeit zur Differenzierung in Effektor T Zellen.

### 3.2.5 Funktionelle Analysen von T Zellen *in vitro*

#### 3.2.5.1 Stimulation von T Zellen *in vitro*

Die Stimulation (bzw. Restimulation) von T Zellen wurde entweder nach Isolierung aus einer *in vitro* Kokultur oder *ex vivo* mit T Zellen aus der Milz durchgeführt. Zur Stimulation der T Zellen wurden verschiedene Reagenzien eingesetzt. Die Stimulation von T Zellen erfolgte je nach Experiment für 4,5-72h in 200µl T Zell-Medium in einer 96-Well-Zellkulturplatte. In den einzelnen Versuchen wurde für jede Gruppe die gleiche Anzahl von T Zellen eingesetzt ( $6 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$ /Well).

Eine Ausnahme bildete die Restimulation von sortierten T Zellen *ex vivo* (siehe 3.2.6.5). Hierfür wurden in einem Volumen von 500µl T Zell-Medium  $1 \times 10^4$  T Zellen auf  $2 \times 10^6$  C57BL/6 Milzzellen ausplattiert.

Stimulation	Konzentration/Menge
PMA	5ng/ml
Ionomycin	200ng/ml
CD3/28 beschichtete Partikel	2µl/ $5 \times 10^5$ T Zellen
anti-CD3 ( $\alpha$ CD3)	Nach vorheriger Beschichtung der Zellkulturplatte mit 10µg/ml bei 37°C für 1h, gefolgt von 2 Waschschritten mit PBS
IL-12	5ng/ml
Interferon- $\alpha$ (IFN $\alpha$ )	500-2000U/ml
Interferon- $\gamma$ (IFN $\gamma$ )	5-50ng/ml
Interleukin-12 (IL-12)	5ng/ml
Interleukin-15 (IL-15)	5-20ng/ml
Interleukin-2 (IL-2)	5-20ng/ml
Interleukin-23 (IL-23)	5-20ng/ml

Interleukin-6 (IL-6)	5-20ng/ml
Interleukin-7 (IL-7)	5-20ng/ml
TNF	5-20ng/ml
OVA <sub>257-264</sub> Peptid (SIINFEKL)	1µM

Sollte nach der Stimulation die Expression von IFN $\gamma$  intrazellulär bestimmt werden (siehe 3.2.6.2), so wurden für die letzten 4,5h der Stimulationsphase die Inhibitoren Brefeldin A und Monensin (Verdünnung jeweils 1:1000) hinzugefügt, um die Sezernierung von Zytokinen zu blockieren. Die Stimulation von sortierten Gedächtnis T Zellen und LSEC-stimulierten T Zellen mit dem OVA<sub>257-264</sub> Peptid (SIINFEKL) wurde auf  $2 \times 10^6$  frisch isolierten C57BL/6-Milzzellen durchgeführt, um die Präsentation des Peptids zu ermöglichen.

Bei einer Stimulationsdauer von >20h (siehe Abschnitt 4.4) wurde die Hälfte des T Zell-Mediums nach 20h durch frisches T Zell-Medium (inklusive entsprechender Zytokinen) ersetzt.

### 3.2.5.2 Messung der T Zell-Proliferation mittels EdU *in vitro*

Um die Proliferation von T Zellen *in vitro* zu messen, wurde in den entsprechenden Versuchen das Nukleosidanalogen EdU (5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin) in einer Konzentration von 10µM für 20h der Zellkultur hinzugefügt. Die Detektion von EdU erfolgte mit dem "Click-iT™ EdU Alexa Fluor® 488 Cell Proliferation Assay Kit" nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 10 Min. in PFA-Lösung (4% w/v in PBS) fixiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen dann für 30 Min. im Click-iT™ Reaktionscocktail inkubiert, um eingebautes EdU in der DNA der Zellen anzufärben. Die Analyse der Zellen erfolgte dann im Durchflusszytometer.

### 3.2.5.3 Zytotoxizitätstest

Um die Zytotoxizität von OVA-spezifischen T Zellen zu bestimmen, wurden zunächst RMA Zellen in zwei gleichgroße Fraktionen unterteilt. Eine Fraktion wurde mit 2µM OVA<sub>257-264</sub> Peptid (SIINFEKL) in 10ml PBS beladen (Inkubation für 15 Min. bei 37°C). Die zweite Fraktion wurde nur in 10ml PBS ohne Peptid inkubiert. Nach 15 Min. wurden beide Fraktionen mit unterschiedlichen Konzentrationen an CFSE markiert, die erste Fraktion mit 2µM (CFSE<sup>HÖCH</sup>) und die zweite mit 0,2µM (CFSE<sup>NIEDRIG</sup>). Anschließend wurden die



Fraktionen zweimal in PBS gewaschen und zusammengeführt (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 20°C). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden in einer 96 Well-Platte 4000 RMA Zellen ausplattiert und entweder mit Medium (Kontrolle) oder verschiedenen Mengen an T Zellen (im Verhältnis von T Zellen zu CFSE<sup>HOCH</sup> RMA Zellen 100:1, 50:1, 10:1, 1:1, oder 0,1:1) und für 4,5h bei 37°C inkubiert. Nach durchflusszytometrischer Bestimmung der lebenden RMA Zellen erfolgte die Berechnung der spezifischen Zytotoxizität mit der Formel:

$$\text{Spezifische Zytotoxizität (\%)} = 100 - 100 \times \frac{\left( \frac{CFSE^{HOCH}}{CFSE^{NIEDRIG}} \right)_{PROBE}}{\left( \frac{CFSE^{HOCH}}{CFSE^{NIEDRIG}} \right)_{KONTROLLE}}$$

#### 3.2.5.4 *In vitro* Migrationsassay

Die *in vitro* Migrationsversuche wurden zusammen mit Dr. Jessica Grell aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Waldemar Kolanus (LIMES Institut, Universität Bonn) durchgeführt. Dr. Grell führte dabei die Ansetzung des Versuches sowie die Quantifizierung der migrierten T Zellen durch. Hierfür wurden naive CD8<sup>+</sup> T Zellen oder CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Isolation aus der Kokultur mit reifen DC oder LSEC in Transwell Inserts mit einer Porengröße von 5µm gegeben (2x10<sup>5</sup> T Zellen in RPMI 1640/0,5% FCS (v/v)). In das untere Kompartiment wurden 700µl RPMI 1640/0,5% FCS (v/v) mit CCL19 (100ng/ml) oder mit CCL21 (200ng/ml) gegeben. Die Anzahl migrierter T Zellen wurde im unteren Kompartiment nach 4h Inkubation bei 37°C bestimmt. Als Kontrolle fungierte jeweils ein Transwell-Ansatz ohne Zytokine im unteren Kompartiment.

#### 3.2.5.5 Messung der IFNγ-Produktion von T Zellen mit ELISA (Sandwich-Methode)

Zunächst wurde eine 96-Well-ELISA Mikrotiterplatte mit 50µl einer primären anti-IFNγ-Antikörperlösung (1:500 in ELISA Bindungspuffer) für 1h bei 37°C beschichtet. Danach wurde die Platte für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. 50µl Überstand aus der Zellkultur von stimulierten T Zellen wurde anschließend für 1,5h bei 37°C auf der Platte inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen der Platte wurde in jedes Well 50µl einer sekundären anti-IFNγ-Antikörperlösung (biotinylierter Antikörper, 1:1000 in PBS) gegeben. Nach abermaligem Waschen wurden 50µl einer frisch angesetzten Peroxidase-Lösung (Peroxidase-

Streptavidin-Konjugat, 1:1000 in PBS) auf der Platte für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der optischen Dichte nach Zugabe von 50µl des TMB-Substrats bei einer Wellenlänge von 650nm im ELISA Lesegerät.

Die für die Messung der IFN $\gamma$ -Produktion benutzten Überstände aus der Zellkultur wurden nach verschiedenartiger Stimulation von T Zellen für 20h entnommen (siehe 3.2.5.1). Für jede Gruppe von T Zellen wurden dafür bei dieser Stimulation Triplikate angesetzt.

### **3.2.6 Durchflusszytometrie**

#### **3.2.6.1 Färbung von Oberflächenmolekülen**

Zur Färbung von Oberflächenmolekülen wurden  $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen in einer 96-Well-Platte in 50-100µl FACS-Puffer in Anwesenheit des anti-CD16/32-Antikörpers (10µg/ml) gegeben. Die Färbung erfolgte nach Zugabe der spezifischen Antikörper für die jeweiligen Oberflächenmoleküle für 15 Min. bei 4°C. Im Anschluss wurden die Zellen einmal in FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 2 Min., 350xg, 4°C). Bei einer Färbung mit biotinylierten Antikörpern wurde eine zweite Färbung mit Streptavidin-Konjugaten durchgeführt. Bei jeder Färbung wurde zusätzlich das „LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain kit“ benutzt, um tote Zellen von der späteren Analyse auszuschließen.

#### **3.2.6.2 Färbung von intrazellulären Proteinen**

Die intrazelluläre Färbung von Proteinen erfolgte nach der Färbung von Oberflächenmolekülen und diente entweder der Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion von T Zellen nach *in vitro* Stimulation oder zur Analyse der Expression von intrazellulärem Granzym B, T-bet oder Eomesodermin.

Für die Färbung von IFN $\gamma$  wurden die Zellen zunächst für 10 Min. in 100µl PFA-Lösung (4% w/v in PBS) fixiert. Nach anschließender Waschung mit Permeabilisationspuffer wurden die Zellen für 30 Min. in 50µl Permeabilisationspuffer mit dem anti-IFN $\gamma$ -Antikörper (1:150 verdünnt) gefärbt.

Zur Färbung von intrazellulärem Granzym B, T-bet oder Eomesodermin wurden die Zellen zunächst für 30 Min. in 100µl der Fixier-Lösung des “Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set“ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Permeabilisationspuffer

gewaschen und für 1h mit fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern in Permeabilisationspuffer gefärbt. Bei allen intrazellulären Färbungen erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer nach einem erneuten Waschschrift mit Permeabilisationspuffer und der Aufnahme der Zellen in FACS-Puffer. Zudem wurde für alle intrazellulären Färbungen zur Kontrolle eine Färbung mit entsprechendem Isotyp-Antikörper durchgeführt.

### 3.2.6.3 Bestimmung der absoluten Zellzahl durch Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung von Zellzahlen am Durchflusszytometer wurde den einzelnen Proben direkt vor der Analyse 3000 „CountBright™ absolute counting beads“ hinzugefügt. Nach der Messung wurde die Gesamtzahl an Zellen in der Probe nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gesamtzahl (Probe)} = \frac{\text{Zellen (gezählt)}}{\text{Partikel (gezählt)}} \times 3000$$

### 3.2.6.4 Markierung von T Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Markierung von T Zellen erfolgte für naive T Zellen nach Aufreinigung aus der Milz durch MACS Separation (siehe 3.2.1.7) oder für LSEC-stimulierte und reife DC-stimulierte T Zellen nach Isolation aus der Kokultur (siehe 3.2.2.2). T Zellen wurden für die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen in 5ml PBS aufgenommen und entweder 0,5µM FarRed oder 2µM CFSE hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für 15 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal in 50ml PBS gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350xg, 4°C), um freie Farbstoffmoleküle zu entfernen. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt und die T Zellen adoptiv in Empfänger-Mäuse gespritzt. Für die Analyse der Proliferation wurden hierfür  $1 \times 10^6$  T Zellen verwendet, für die Analyse der T Zell-Migration *in vivo* wurde eine 1:1 Mischung von unterschiedlich markierten T Zellen (jeweils  $2,5 \times 10^6$  T Zellen) verwendet.

### 3.2.6.5 FACS-Sortierung von T Zellen

Um CD8<sup>+</sup> OT-I Gedächtnis T Zellen (siehe 3.2.4.9) oder CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation durch LSEC *in vivo* mittels FACS<sup>17</sup> zu sortieren, wurden zunächst die T Zellen aus der Milz isoliert und mit dem „CD8α T cell isolation kit“ durch MACS aufgereinigt (siehe 3.2.1.7).

<sup>17</sup> Engl.: fluorescence activated cell sorting

Anschließend wurden die Zellen in 500µl FACS-Puffer auf Oberflächenmoleküle gefärbt (siehe 3.2.6.1) und die Zielpopulationen anhand der Expression von Oberflächenmolekülen am Vantage SE Durchflusszytometer bei 4°C in Eppendorf-Gefäßen mit 300µl T Zell-Medium sortiert. Zur Kontrolle der Reinheit wurde ein Teil der Zellen nach der FACS-Sortierung durchflusszytometrisch analysiert (Reanalyse).

### **3.2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie**

#### **3.2.7.1 Herstellung von Gefrierschnitten**

8h nach dem adoptiven Transfer von markierten T Zellen wurde den Empfänger-Mäusen die Milz sowie inguinale und axilläre Lymphknoten entnommen. Dies wurden separat in Tissue-Tek® OCT überführt und bei -80°C eingefroren. Von diesen gefrorenen Blöcken wurden mit dem Leica CM1900 Kryostat bei einer Temperatur von -20°C Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5µm angefertigt.

#### **3.2.7.2 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten**

Zur Färbung der Gefrierschnitte wurden diese zunächst für 10 Min. mit eiskaltem Aceton fixiert und für wenige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach einer Inkubationsphase von 1h mit Blockierpuffer wurden die Schnitte für 1h mit anti-CD3 (1:200 in PBS) gefärbt und dreimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte das Eindeckeln mit dem Eindeckelmedium Immu-Mount. Die Gefrierschnitte wurden für maximal 7 Tage bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

#### **3.2.7.3 Quantifizierung von T Zellen auf Gefrierschnitten**

Aufnahmen von gefärbten Gefrierschnitten wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (IX71) bei einer 100-fachen Vergrößerung gemacht. Anhand der anti-CD3-Färbung wurde die Fläche der T Zellzone mittels der Software Cell F bestimmt (Funktion „geschlossene Polygone“). Die unterschiedlich markierten T Zellen innerhalb der T Zell-Zonen wurden dann mit der “Touch count“-Methode gezählt.

### **3.2.8 Quantitative Real-Time PCR**

Die quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) Analysen wurden mit Hilfe von Dr. Imke Atreya aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Neurath (Universitätsklinikum Erlangen)

durchgeführt. Hierfür wurden T Zellen für 10h *in vitro* stimuliert und anschließend aufgereinigt (siehe 3.2.5.1).  $0,5-2 \times 10^6$  dieser stimulierten T Zellen wurden als Pellet in  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Dr. Atreya führte dann die weiteren Schritte der Analyse durch. Dabei erfolgte die Isolation von RNA mittels des „RNeasy Micro Kit“, gefolgt von der Umschreibung von RNA in cDNA (200ng RNA in  $20\mu\text{l}$  je Ansatz) mit der AffinityScript™ Multiple Temperature Reverse Transcriptase; jeweils nach Angaben des Herstellers. Die Real-Time PCR wurde jeweils für  $1\mu\text{l}$  cDNA bei 40 Zyklen ( $94^\circ\text{C}$  für 15s,  $55^\circ\text{C}$  für 30s,  $72^\circ\text{C}$  für 30s) in Kombination mit spezifischen Primern für Eomesodermin, T-bet und HPRT mittels des „Absolute QPCR SYBR Green PCR Mix“ durchgeführt. Als Gerät wurde ein C1000™ Thermal Cycler benutzt (siehe 3.1.7). Die HPRT-Expression diente zur Normalisierung der Expressionswerte als Referenzgen. Die Quantifizierung erfolgte mittels der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode.

### 3.2.9 Analyse der globalen Genexpression von $\text{CD8}^+$ T Zellen

Die Analyse der globalen Genexpression wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Schultze am LIMES Institut der Universität Bonn durchgeführt. Dafür wurden zunächst  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^6$  T Zellen nach Aufreinigung aus der Zellkultur (siehe 3.2.2.2) oder nach FACS-Sortierung (siehe 3.2.6.5) in 1ml Trizol aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Anschließend erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Schultze die Isolierung von RNA und die Hybridisierung als auch die Auswertung der Expressionsdaten sowie die in **Abb. 4.1-2** und **Abb. 4.5-1** dargestellten Visualisierungen der Genexpressionsdaten.

Aus der isolierten RNA der einzelnen Proben wurde zunächst mit dem “TargetAmp Nano-g Biotin aRNA Labeling Kit” cDNA und anschließend biotin-markierte cRNA hergestellt. Die cRNA wurde auf “Mouse-6 Expression BeadChips V2” hybridisiert und mit Hilfe eines Illumina iScan oder eines Illumina HiScan analysiert, die Aufnahme und Primäranalyse der Daten erfolgte mittels der Illumina BeadStudio Software.

Die weitere Auswertung der bioinformatischen Daten erfolgte mit R Statistical language (<http://www.r-project.org>) und mit Hilfe des Softwarepakets des Bioconductor Projektes (<http://www.bioconductor.org>; Gentleman et al., 2004) oder der Partek Genomic Suite.

Gene wurden als unterschiedlich exprimiert angesehen, falls folgende Kriterien zutraten: Fold change (FC)  $\geq 2$ ,  $p < 0.05$ , Unterschied der Mittelwerte  $> 100$  und 10% FDR. Die Normalisierung der Datensätze erfolgte mittels der Quantilen-Normalisierung.

Die in dieser Arbeit gezeigten Genexpressionsdaten stehen unter der Zugangsnummer GSE27139 auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> zur Verfügung. Zudem sind die zugrunde liegenden Daten der in den einzelnen Abbildungen gezeigten Analysen in Böttcher et al., 2013, *in press* zu finden.

### **3.2.9.1 Analyse von spezifisch in LSEC-stimulierten T Zellen exprimierten Genen**

Zur Analyse von Genen, die spezifisch in LSEC-stimulierten T Zellen exprimiert werden, wurden mittels des Programms Biolayout 3D alle exprimierten Gene anhand ihres Regulationsmusters über die verschiedenen T Zell-Populationen in Cluster mit koregulierten Genen sortiert (Pearson Korrelation von  $\geq 0,7$ , Marcov Clustering, siehe auch Theocharidis et al., 2009). Diejenigen Cluster, die eine signifikante Anreicherung der Expression von Genen in LSEC-stimulierten T Zellen aufwiesen, wurden anschließend nach Genen durchsucht, die für Oberflächenmoleküle kodieren.

### **3.2.9.2 Analyse von Signalwegen auf Genexpressionsebene mit DAVID**

Zum Vergleich der Regulation von Signalwegen in TCM und LSEC-stimulierten T Zellen wurde das Programm DAVID Bioinformatics (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>; Huang da et al., 2009) benutzt, mit dem sich die Anreicherung von Genen aus einer vorgegebenen Liste innerhalb von zellulären Signalwegen der KEGG-Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) darstellen lässt (Huang da et al., 2009). Die Überrepräsentation von Genen aus der vorgegebenen Genliste erlaubt die Identifizierung von denjenigen Signalwegen, die signifikant reguliert sind. Für die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse (siehe **Tabelle 4.5-1**) wurde aus der globalen Genexpressionsanalyse (durchgeführt von Prof. Dr. J. Schultze, LIMES Institut, Universität Bonn) eine Liste an Genen erstellt, die signifikant in TCM im Vergleich zu LSEC-stimulierten T Zellen hochreguliert waren (siehe Böttcher et al., 2013, *in press*; Kriterien:  $FC > 1,5$ ,  $p < 0.05$ , Unterschied im Mittelwert  $> 100$ , 10% FDR). Von derartig signifikant regulierten Signalwegen sind diejenigen Signalwege mit Relevanz für T Zell-Effektorfunktionen in **Tabelle 4.5-1** aufgeführt.

### 3.2.9.3 Analyse der Expression von TCM-spezifischen Genen in LSEC-stimulierten T Zellen

Um diejenigen Gene zu ermitteln, die spezifisch in TCM im Vergleich zu naiven T Zellen exprimiert werden, wurden die in dieser Arbeit durchgeführte Gensignatur von TCM mit der Gensignatur von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen (Wirth et al., 2010) verglichen. Die Expression derjenigen Gene dieser Signatur von Gedächtnis T Zellen, die in TCM in ähnlicher Weise reguliert waren (FC $\geq$ 2, p $<$ 0.05, 10% FDR), wurde dann in LSEC-stimulierten T Zellen analysiert (siehe Böttcher et al., 2013, *in press* und **Abb. 4.5-1**).

### 3.2.10 Statistik

Die mittlere Abweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt, diese zeigen falls nicht anders angegeben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM<sup>18</sup>). Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels des zweiseitigen Student's t-Test (mit \*= p $<$ 0,05; \*\*= p $<$ 0,01; \*\*\*= p $<$ 0,001).

---

<sup>18</sup> Engl.: standard error of the mean





## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC induziert eine eigenständige CD8<sup>+</sup> T Zell-Population

Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) sind in der Leber die zahlenmäßig vorherrschende Population von nicht-parenchymalen antigen-präsentierenden Zellen (APC; Racanelli and Rehermann, 2006). LSEC nehmen mit hoher Effizienz lösliches Antigen aus der Blutzirkulation auf und besitzen die Fähigkeit, dieses Antigen innerhalb sehr kurzer Zeit an zirkulierende CD8<sup>+</sup> T Zellen kreuzzupräsentieren (Knolle and Limmer, 2003; Limmer et al., 2000; von Oppen et al., 2009). Solch eine antigen-spezifische Interaktion von LSEC mit naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen führt zu T Zell-Proliferation, jedoch in Abwesenheit von inflammatorischen Bedingungen nicht zur Entstehung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen (CTL; Diehl et al., 2008; Kern et al., 2009; Limmer et al., 2000). Die fehlenden Effektorfunktionen von LSEC-stimulierten T Zellen – Zytotoxizität und Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) nach Stimulation des T Zell-Rezeptors (TCR) – wurden in früheren Arbeiten folglich als Zeichen der T Zell-Toleranz interpretiert. Interessanterweise lieferten diese Arbeiten jedoch Hinweise darauf, dass naive CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation durch LSEC überleben (Diehl et al., 2008; von Oppen et al., 2009).

Um das Schicksal von CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation durch LSEC unter nicht-inflammatorischen Bedingungen *in vivo* näher zu charakterisieren, wurde ein Mausmodell benutzt, in welchem die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen auf LSEC beschränkt ist (Kern et al., 2009; von Oppen, 2008; siehe auch 3.2.4.5). In diesen [bm1->C57BL/6] Knochenmarkschimären kann das OVA-Peptid SIINFEKL auf dem MHC I Molekül H-2K<sup>b</sup> nur von organresidenten Zellen präsentiert werden, da knochenmarksabhängige Zellen aufgrund der Expression des H-2K<sup>bm1</sup> Moleküls dazu nicht in der Lage sind (Kern et al., 2009; von Oppen, 2008; siehe auch 3.2.4.5). Bei der Gabe von löslichem OVA sind in Abhängigkeit von Kreuzpräsentation daher nahezu ausschließlich LSEC in der Lage H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-restringierte CD8<sup>+</sup> T Zellen – wie z.B. transgene OT-I T Zellen - zu stimulieren, wohingegen knochenmarksabhängige Immunzellen hierzu nicht fähig sind. Was geschieht mit CD8<sup>+</sup> T Zellen, wenn diese in Abwesenheit von Inflammation ihr Antigen auf LSEC erkennen? Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden naive

CD45.1<sup>+</sup> OVA-spezifische OT-I T Zellen mit CFSE<sup>19</sup> markiert und danach adoptiv in [bm1->C57BL/6] Chimären transferiert (**Abb. 4.1-1a**, siehe auch 3.2.4.5). Die anschließende Gabe von löslichem OVA i.p. führte in den transferierten OT-I T Zellen – identifiziert durch den kongenen Marker CD45.1 – zu einer starken Proliferation und der Hochregulation von CD44, gleichbedeutend mit der Erkennung ihres Antigens auf kreuzpräsentierenden LSEC (**Abb. 4.1-1a**). Bemerkenswert ist, dass die Stimulation durch LSEC dagegen nicht die Herunterregulation der CD62L-Expression auf CD45.1<sup>+</sup> T Zellen induzierte, im Gegensatz zur Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch DC (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation von T Zellen unter nicht inflammatorischen Bedingungen, insbesondere durch unreife DC, kann in der Deletion dieser T Zellen resultieren (Mueller, 2010; Steinman et al., 2003b). Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass LSEC-stimulierte CD8<sup>+</sup> T Zellen hohe Mengen des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 (Diehl et al., 2008) exprimieren und nach Stimulation durch LSEC *in vivo* kaum in Apoptose gehen (von Oppen et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Stimulation durch LSEC keine Deletion von CD8<sup>+</sup> T Zellen zur Folge hat.

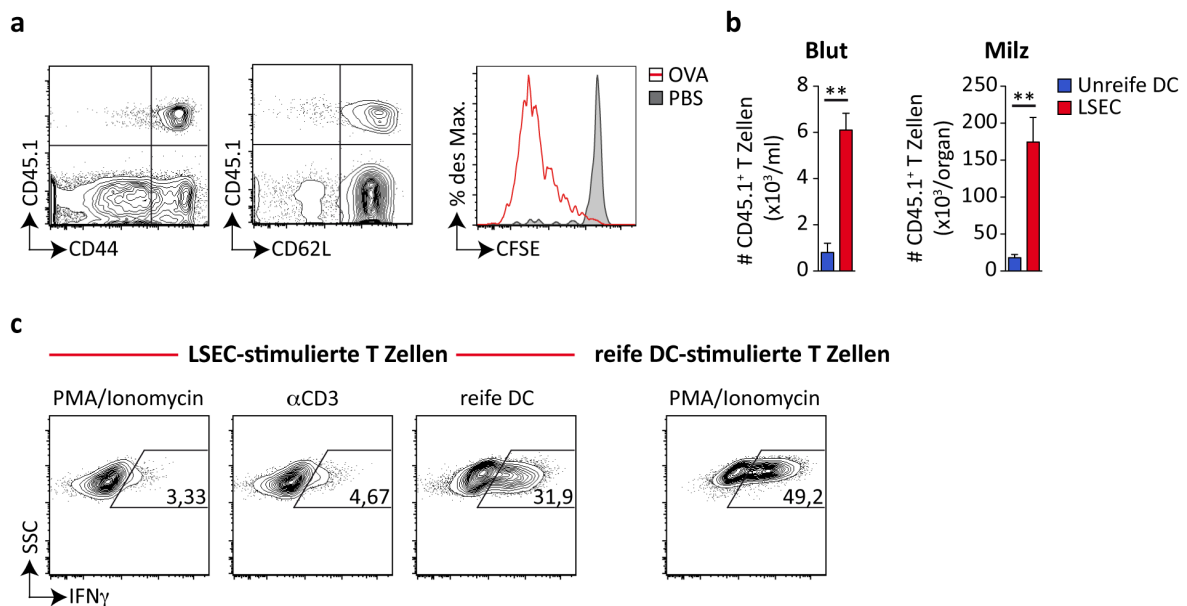
Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde unter nicht inflammatorischen Bedingungen die Antigenpräsentation durch LSEC mit der Antigenpräsentation durch unreife DC in der Auswirkung auf das Überleben von CD8<sup>+</sup> T Zellen verglichen. Nach Transfer von CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen in [bm1->C57BL/6] Chimären wurde diesen lösliches OVA gespritzt, was zur LSEC-vermittelten Stimulation der T Zellen führt. Eine Vergleichsgruppe von C57BL/6 Mäusen erhielt dieselbe Anzahl von CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen, jedoch wurde diesen Mäusen an anti-DEC-205 gekoppeltes OVA injiziert (DEC205:P3UOrv, siehe auch 3.2.4.6). Diese Kopplung von OVA an anti-DEC-205 resultiert in der Aufnahme von OVA durch unreife DC und DC-vermittelter Kreuzpräsentation an CD8<sup>+</sup> T Zellen (Bonifaz et al., 2002; Kratzer et al., 2010).

Bemerkenswerterweise zeigte sich, dass die Anzahl der CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen in Milz und Blut sieben Tage nach Stimulation durch unreife DC im Vergleich zu LSEC stark reduziert war (**Abb. 4.1-1b**). Im Gegensatz zur Stimulation durch unreife DC scheint somit die

---

<sup>19</sup> CFSE= Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester

Stimulation durch LSEC keine Deletion von CD8<sup>+</sup> T Zellen auszulösen, sondern vielmehr das Überleben dieser T Zellen zu induzieren.



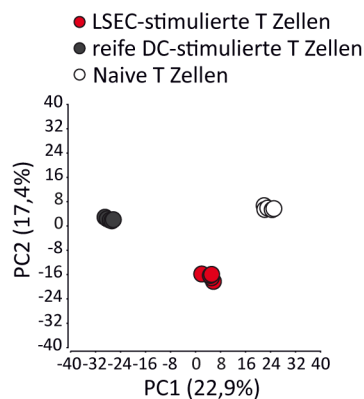
**Abbildung 4.1-1 Die Stimulation durch LSEC führt zur Entstehung einer eigenständigen CD8<sup>+</sup> T Zell-Population, die durch reife DC reaktiviert werden kann. (a)** Nach adoptivem Transfer von CFSE-markierten CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen (1x10<sup>6</sup>/ Maus) in CD45.2<sup>+</sup> [bm1->C57BL/6] Chimären wurde diesen lösliches OVA (1mg/Maus) oder PBS i.p. injiziert. Nach vier Tagen wurden die Milzzellen aus diesen Mäusen isoliert und die Expression der Oberflächenmoleküle CD44 und CD62L sowie die Abnahme der CFSE-Intensität als Zeichen von Proliferation auf CD8<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> T Zellen durchflusszytometrisch analysiert. **(b)** 5x10<sup>6</sup> CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen wurden adoptiv in CD45.2<sup>+</sup> C57BL/6 Wildtyp-Mäuse oder CD45.2<sup>+</sup> [bm1->C57BL/6] Chimären transferiert. Die Anzahl lebender CD8<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> T Zellen wurde sieben Tage nach Stimulation unter nicht-inflammatorischen Bedingungen durch LSEC (lösliches OVA in [bm1->C57BL/6] Chimären) oder unreife, tolerogenen DC (DEC205:P3UOrv in C57BL/6 Mäusen) bestimmt. **(c)** OT-I T Zellen wurden *in vitro* auf OVA-beladenen LSEC kultiviert. Vier Tagen später wurden die T Zellen isoliert und für 20h mit PMA/Ionomycin, anti-CD3-Antikörper oder OVA-beladenen, reifen DC inkubiert. Anschließend wurde die IFN<sub>γ</sub>-Produktion in lebenden CD8<sup>+</sup> T Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Kontrolle wurden OT-I T Zellen für vier Tage mit OVA-beladenen DC kultiviert und für 20h mit PMA/Ionomycin restimuliert. Gezeigte Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen Student's t-Test (\*\*= p<0.01).

Trotz des LSEC-induzierten Überlebens von CD8<sup>+</sup> T Zellen und der Entwicklung eines antigen-erfahrenen Phänotyps sind LSEC-stimulierte T Zellen eindeutig von CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen abgrenzbar: So besitzen LSEC-stimulierte T Zellen keine CTL-Effektorfunktionen, zu erkennen an der fehlenden Produktion von IFN<sub>γ</sub> nach Stimulation des T Zellrezeptors durch einen anti-CD3-Antikörper (αCD3) oder Inkubation mit PMA/Ionomycin (**Abb. 4.1-1c**, Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2000; von Oppen et al., 2009). Erstaunlicherweise produzierten LSEC-stimulierte T Zellen jedoch große Mengen an IFN<sub>γ</sub> wenn sie für 20h

mit reifen DCs in Anwesenheit ihres Antigens kultiviert wurden (**Abb. 4.1-1c**); ähnlich zu Effektor T Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin.

Diese Ergebnisse demonstrieren eindeutig, dass der ruhende Zustand von LSEC-stimulierten T Zellen nicht endgültig, sondern reversibel ist, ganz im Gegensatz zum irreversiblen Zustand der Anergie in  $CD8^+$  T Zellen (Schietinger et al., 2012). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Stimulation von  $CD8^+$  T Zellen nicht wie in bisherigen Arbeiten beschrieben zu T Zell-Toleranz (Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2000; Schurich et al., 2010) oder Anergie führt (Schietinger et al., 2012), sondern einen andersartigen Differenzierungszustand hervorruft.

Die mögliche Existenz eines eigenständigen Differenzierungsstatus von LSEC-stimulierten T Zellen setzt eine klare Abgrenzung zu naiven oder DC-stimulierten T Zellen voraus. Um zu untersuchen, ob sich LSEC-stimulierte T Zellen von naiven oder DC-stimulierten T Zellen unterscheiden, wurde eine globale Genexpressionsanalyse durchgeführt.



**Abbildung 4.1-2 LSEC-stimulierte T Zellen unterscheiden sich von naiven T Zellen und reife DC-stimulierten T Zellen durch ihre Gensignatur.** Hauptkomponentenanalyse der Genexpression von naiven OT-I T Zellen (n=5), OT-I T Zellen 4 Tage nach Kultivierung auf OVA-beladenen LSEC (n=4) oder OT-I T Zellen 4 Tage nach Kultivierung auf OVA-beladenen, reifen DC (n=5). Die Basis dieser Daten bilden die Gene mit höchster Variation in der Genexpression zwischen den drei untersuchten T Zell-Populationen (n=616 Gene, FDR 10%,  $p < 0.000005$ ). Die hier gezeigte Analyse wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Schultze (LIMES Institut, Universität Bonn) durchgeführt.

Die so erhaltenen Gensignaturen dieser drei T Zell-Populationen wurden danach hinsichtlich ihrer Unterschiede mittels einer Hauptkomponentenanalyse (PCA<sup>20</sup>) verglichen (**Abb. 4.1-2**). Tatsächlich unterschieden sich OT-I T Zellen, die *in vitro* mit OVA-beladenen LSEC kultiviert wurden, auf der Ebene der Genexpression eindeutig von naiven OT-I T Zellen oder von OT-I Zellen, die unter gleichen Bedingungen mit reifen DC kultiviert wurden.

Zusammenfassend lassen diese Daten darauf schließen, dass die Interaktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen mit antigen-präsentierenden LSEC im Vergleich zur Stimulation durch unreife DC (T Zell-Deletion) oder reife DC (Entstehung von Effektor T Zellen) fundamental unterschiedliche Auswirkungen auf stimulierten T Zellen hat. Zusätzlich weist die Produktion von IFN $\gamma$  nach Stimulation durch reife DC auf eine etwaige Plastizität des Differenzierungszustandes von LSEC-stimulierten T Zellen hin.

#### **4.2 CD8<sup>+</sup> T Zellen wandern nach Stimulation durch LSEC in lymphatische Organe**

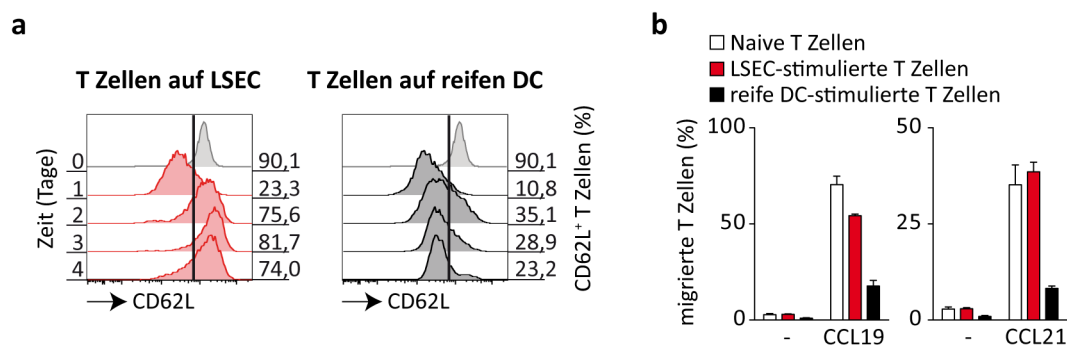
Naive T Zellen und zentrale Gedächtnis T Zellen (TCM) sind in der Lage, in lymphatische Organe einzuwandern (Girard et al., 2012; Junt et al., 2008; Surh and Sprent, 2008). Hierfür spielen sowohl die CCR7-vermittelte Chemotaxis in Richtung der CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 als auch CD62L eine wichtige Rolle (Girard et al., 2012; Gunn et al., 1998; Sprent et al., 2008). Die Expression von CD62L auf LSEC-stimulierten T Zellen (**Abb. 4.1-1a**) warf die Frage auf, ob diese ebenfalls fähig sind, in lymphatisches Gewebe einzuwandern.

Zunächst wurde die Regulation der CD62L-Expression auf CD8<sup>+</sup> T Zellen während der Stimulation durch LSEC oder reife DC miteinander verglichen. Wurden naive CD62L<sup>+</sup> OT-I T Zellen mit OVA-beladenen LSEC oder DC kultiviert, so war in beiden Fällen einen Tag später eine Herunterregulation von CD62L zu beobachten (**Abb. 4.2-1a**). Jedoch exprimierten nahezu alle LSEC-stimulierte T Zellen (>70%) ab Tag 2 der Kokultur wieder hohe Mengen CD62L. Im Gegensatz dazu behielt die Mehrheit der reife-DC stimulierte OT-I T Zellen über die gesamte Zeitspanne von vier Tagen einen CD62L<sup>NIEDRIG</sup> Phänotyp (**Abb. 4.2-1a**).

---

<sup>20</sup> Engl.: Principal Component Analysis

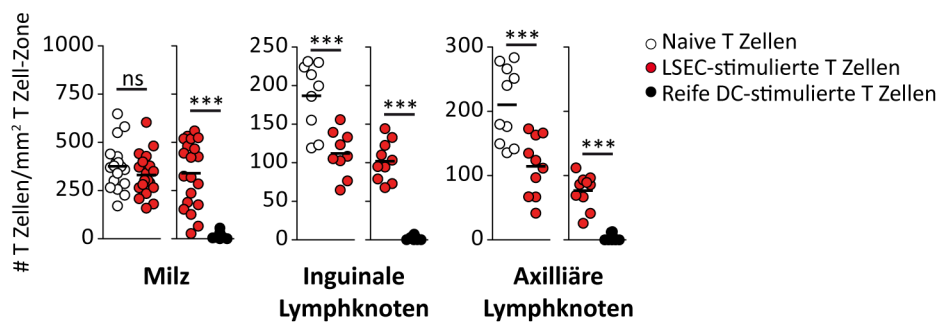
Da das Einwandern von T Zellen in die T Zell-Zonen von lymphatischen Organen von den Chemokinen CCL19 und CCL21 abhängig ist (Girard et al., 2012), wurden LSEC-stimulierte T Zellen als nächstes auf ihr Migrationsverhalten in Richtung dieser Chemokine mittels eines Transwellversuches (siehe 3.2.5.4) untersucht. Nach Stimulation *in vitro* unterschieden sich LSEC-stimulierte OT-I T Zellen und naive OT-I Zellen kaum in ihrer Fähigkeit, in Richtung von CCL19 oder CCL21 zu migrieren (**Abb. 4.2-1b**). Im Gegensatz dazu war diese chemotaktische Fähigkeit bei OT-I T Zellen nach Stimulation durch reife DC stark eingeschränkt.



**Abbildung 4.2-1 LSEC-stimulierte T Zellen exprimieren CD62L und migrieren in Richtung von CCR7-Liganden. (a)** Zeitkinetik der CD62L-Expression auf CD8<sup>+</sup> OT-I T Zellen während der Kokultur mit OVA-beladenen LSEC oder OVA-beladenen reifen DC. Zahlenwerte auf der rechten Y-Achse zeigen die Prozentzahl an CD62L<sup>+</sup> T Zellen. **(b)** Migration von OT-I T Zellen in Richtung der CCR7-Liganden CCL19 (100ng/ml) oder CCL21 (200ng/ml) in einem Transwellversuch. Die Anzahl migrierter T Zellen wurde nach 4h bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Analyse der Migration von T Zellen in **Abb. 4.2-1b** wurde mit Hilfe von Dr. Jessica Grell in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Waldemar Kolanus am LIMES Institut der Universität Bonn durchgeführt.

Es lässt sich also anhand dieser Ergebnisse schlussfolgern, dass T Zellen nach Stimulation durch LSEC prinzipiell fähig sind, in lymphatisches Gewebe einzuwandern. Als Nächstes sollte folglich die Relevanz dieser Ergebnisse für das migratorische Verhalten von LSEC-stimulierten T Zellen *in vivo* untersucht werden. Um die Migration von LSEC-stimulierten T Zellen mit naiven T Zellen oder reife-DC stimulierten T Zellen *in vivo* zu vergleichen, wurden diese mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert: LSEC-stimulierte T Zellen mit FarRed, naive T Zellen oder DC-stimulierte T Zellen mit CFSE. Nach einer 1:1 Mischung von FarRed<sup>+</sup> LSEC-stimulierten T Zellen mit CFSE<sup>+</sup> naiven T Zellen oder FarRed<sup>+</sup> LSEC-stimulierten T Zellen mit CFSE<sup>+</sup> reife DC-stimulierten T Zellen wurden diese i.v. in C57BL/6 Wildtyp-Mäuse injiziert. Acht Stunden später wurden verschiedene lymphatische Organe entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und die T Zell-Zone mit

einem anti-CD3-Antikörper angefärbt. Die transferten T Zellen wurden anschließend anhand ihrer unterschiedlichen Markierung identifiziert und quantifiziert (**Abb. 4.2-2**). Die Anzahl der LSEC-stimulierten T Zellen/mm<sup>2</sup> T Zell-Zone war in der Milz im Mittel genauso hoch wie die von naiven T Zellen. Im Gegensatz dazu waren nur sehr wenige DC-stimulierte T Zellen in der Lage, in die T Zell-Zonen der Milz einzuwandern. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Analyse der T Zell-Zonen in Lymphknoten: auch hier war eine große Zahl LSEC-stimulierter T Zellen vorhanden, wohingegen nahezu keine DC-stimulierten T Zellen detektierbar waren (**Abb. 4.2-2**). Im Gegensatz zur Milz war die Menge an naiven T Zellen im Vergleich zu LSEC-stimulierten T Zellen in den untersuchten Lymphknoten erhöht.

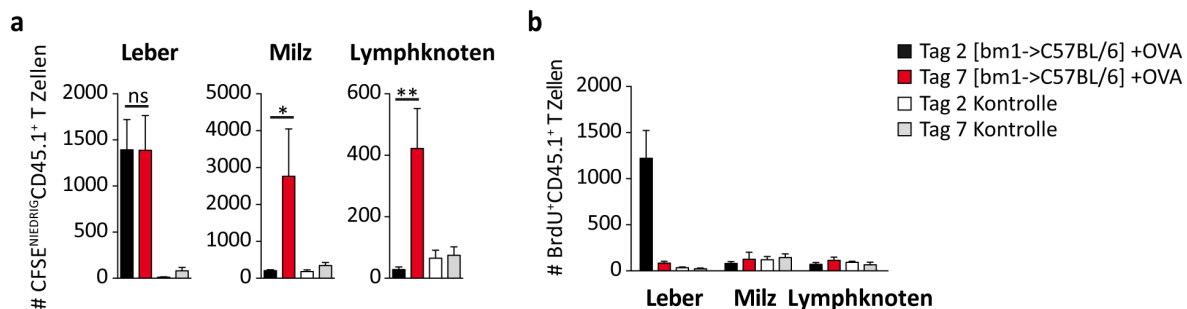


**Abbildung 4.2-2 LSEC-stimulierte T Zellen aber nicht DC-stimulierte T Zellen wandern in lymphatische Organe *in vivo*.** OT-I T Zellen wurden für vier Tage mit OVA-beladenen LSEC oder reifen DC kultiviert. Nach Isolation wurden LSEC-stimulierte T Zellen mit FarRed markiert und 1:1 mit CFSE-markierten naiven OT-I T Zellen (links) oder CFSE-markierten DC-stimulierten OT-I T Zellen (rechts) im Verhältnis von 1:1 gemischt und in C57BL/6 Wildtyp-Mäuse adoptiv transferiert ( $5 \times 10^6$ /Maus). 8h nach T Zell-Transfer wurden auf Gefrierschnitten von lymphatischen Organen die T Zell-Zonen mittels anti-CD3-Antikörper gefärbt und die Anzahl der darin enthaltenen markierten T Zellen quantifiziert. Die Daten aus einem von zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen pro Gruppe sind jeweils für eine Maus gezeigt, wobei jeder Datenpunkt die Quantifizierung einer T Zell-Zone darstellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgt mittels eines zweiseitigen Student's t-Test (ns= nicht signifikant, \*\*\*=  $p < 0.001$ ).

Diese Ergebnisse zeigen, dass T Zellen nach *in vitro* Stimulation durch LSEC die Fähigkeit zum Einwandern in lymphatische Gewebe besitzen, wohingegen reife DC-stimulierte T Zellen hierzu nicht in der Lage sind.

Dies warf die Frage auf, ob solch ein Migrationsverhalten in T Zellen gleichermaßen nach *in vivo* Stimulation durch LSEC ausgelöst wird. Zur Klärung dieser Frage wurden naive CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen in [bm1- $\rightarrow$ C57BL/6] Chimären transferiert und OVA injiziert, was zur LSEC-vermittelten Stimulation dieser CD8<sup>+</sup> T Zellen führt. Die naiven T Zellen wurden vor dem Transfer mit CFSE markiert, um einen Vergleich von LSEC-stimulierten (CFSE<sup>NIEDRIG</sup>) und naiven T Zellen (CFSE<sup>HOCH</sup>) zu ermöglichen. An Tag zwei nach OVA-Injektion konnten

CFSE<sup>NIEDRIG</sup> CD45.1<sup>+</sup> T Zellen in [bm1->C57BL/6] Chimären in der Leber detektiert werden, jedoch nicht in der Kontrollgruppe (**Abb. 4.2-3a**). Die Abwesenheit von CFSE<sup>NIEDRIG</sup> CD45.1<sup>+</sup> T Zellen in Milz und Lymphknoten deutet darauf hin, dass in [bm1->C57BL/6] Chimären vornehmlich LSEC lösliches OVA aber kreuzpräsentieren können, jedoch nicht APC in lymphatischen Organen. Analyierte man nun die Zahl der CFSE<sup>NIEDRIG</sup> T Zellen in den gleichen Organen an Tag 7, so war im Vergleich zu Tag 2 ein starker Anstieg der T Zellen in Milz und Lymphknoten zu beobachten, wohingegen die Zahl der proliferierten T Zellen in der Leber nicht weiter angestiegen war. Um anhaltende Proliferation zu analysieren, wurden CD45.1<sup>+</sup> T Zellen auf den DNA-Einbau des Nukleosidanalogons BrdU, welches jeweils 20h vor der Organentnahme den Mäusen i.v. verabreicht wurde, mittels eines Antikörpers intrazellulär gefärbt. Hier konnten BrdU<sup>+</sup> CD45.1<sup>+</sup> T Zellen ausschließlich in der Leber an Tag 2 beobachtet werden, aber weder in der Leber an Tag 7 noch in Milz oder Lymphknoten zu einem der beiden Zeitpunkte.



**Abbildung 4.2-3** Die antigen-spezifische Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC *in vivo* führt nach lokaler T Zell-Proliferation zur Migration der T Zellen in lymphatische Organe. CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen wurden mit CFSE markiert und adoptiv in [bm1->C57BL/6] Chimären oder in C57BL/6 Mäuse transferiert (1x10<sup>6</sup>/Maus). Nach 4 Stunden wurde entweder lösliches OVA (in [bm1->C57BL/6] Chimären) oder als Kontrolle PBS (in C57BL/6 Mäuse) injiziert. Die Anzahl an (a) LSEC-stimulierten (CFSE<sup>NIEDRIG</sup>) CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen sowie (b) die Anzahl proliferierender (BrdU<sup>+</sup>) CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen wurde an Tag 2 bzw. an Tag 7 nach Antigen-Injektion in Milz, Leber und inguinalen Lymphknoten bestimmt. Zur Bestimmung der proliferierenden CD45.1<sup>+</sup> T Zellen wurde BrdU 20h vor dem jeweiligen Analysezeitpunkt i.p. gespritzt. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die lokale Stimulation von naiven T Zellen durch LSEC in der Leber zu T Zell-Proliferation und anschließender Relokalisierung in lymphatische Organe führt. Dieses Migrationsverhalten beruht vermutlich auf dem CD62L<sup>+</sup> Phänotyp von LSEC-stimulierten T Zellen und auf der Fähigkeit zur CCR7-vermittelten Chemotaxis (vergleiche **Abb. 4.2-1**).

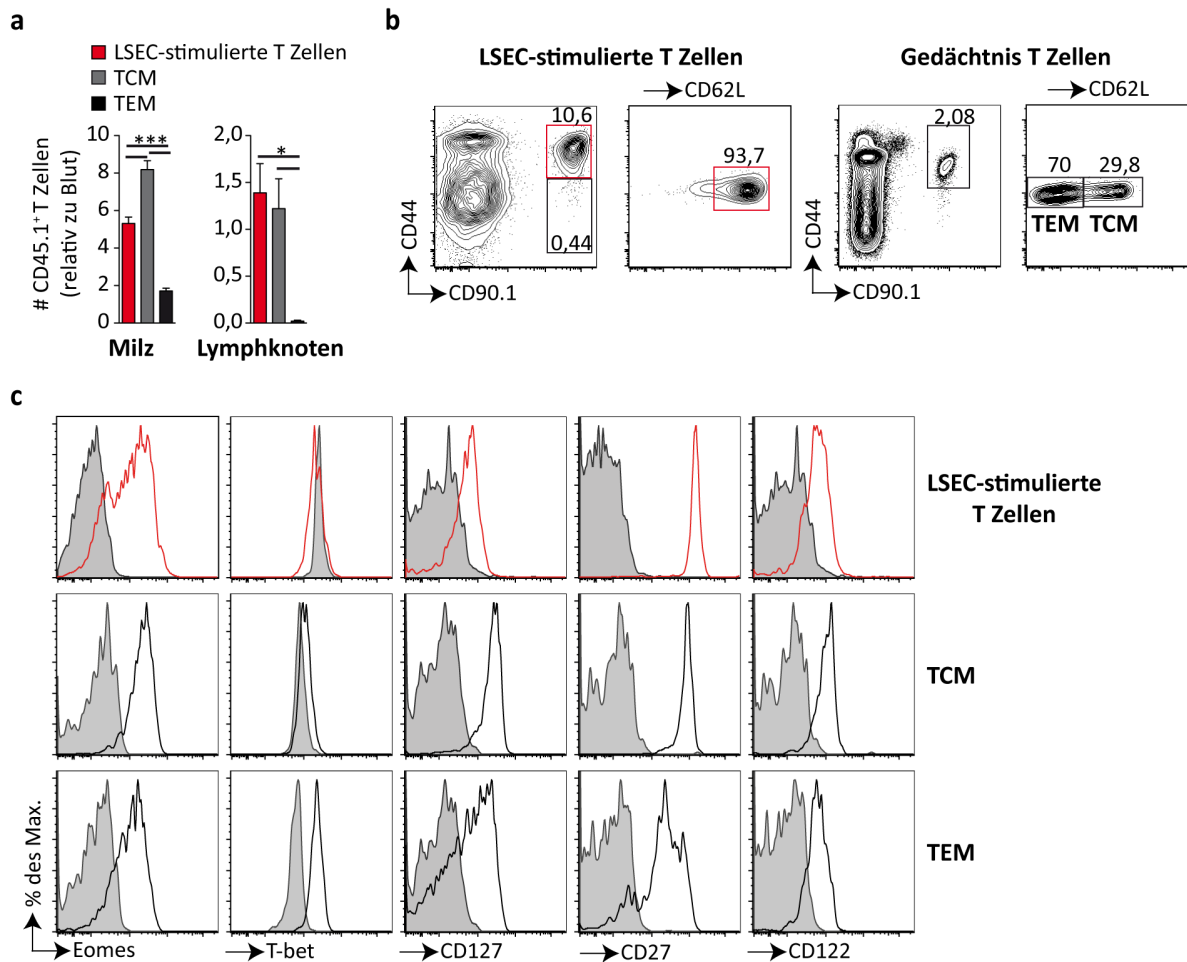


### 4.3 LSEC-stimulierten T Zellen besitzen Eigenschaften von Gedächtnis T Zellen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass LSEC-stimulierte T Zellen die Eigenschaft besitzen, in lymphatische Gewebe einzuwandern. Trotz dieser Gemeinsamkeit zu naiven T Zellen führt die antigen-spezifische Interaktion mit LSEC zu grundlegenden Veränderungen der Genexpression (**Abb. 4.1-3**). So weisen LSEC-stimulierte T Zellen eine hohe Expression von CD44 auf, genau wie CD8<sup>+</sup> T Zellen, die unter inflammatorischen Bedingungen durch reife DC stimuliert werden (**Abb. 4.1-1**; Diehl et al., 2008; Schurich et al., 2010). Unter solchen inflammatorischen Bedingungen, zum Beispiel während einer Infektion, entstehen jedoch nur relativ wenige CD44<sup>+</sup> T Zellen, die auch gleichzeitig CD62L exprimieren. Die Anzahl dieser CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T Zellen, die im Allgemeinen als frühe TCM oder Vorläufer von Gedächtnis T Zellen angesehen werden (Cui and Kaech, 2010; Wakim and Bevan, 2010; Zhang and Bevan, 2011), nimmt erst mit fortschreitender Zeit nach überstandener Infektion zu (Kaech and Cui, 2012; Obar and Lefrancois, 2010). Somit besteht hier ein klarer Unterschied zur Stimulation naiver CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC unter nicht-inflammatorischen Bedingungen. Es ist denkbar, dass sich die schnelle CD62L-Hochregulation von LSEC-stimulierten CD8<sup>+</sup> T Zellen (siehe **Abb. 4.2-1**) und die Migration zu lymphatischen Organen bereits wenige Tage nach Stimulation durch LSEC in einer Verteilung ähnlich zu der von TCM widerspiegelt. Um dies nähergehend zu untersuchen, wurden in einem *in vivo* Infektionsmodell mit rekombinanten *Listeria monocytogenes*-OVA (*L.m.*-OVA) Gedächtnis OT-I T Zellen erzeugt und mit LSEC stimulierten OT-I T Zellen *in vivo* verglichen (siehe auch 3.2.4.9). Auch hier diente der kongene Marker CD45.1 zur Identifizierung der jeweiligen OT-I T Zell-Population. Wie in **Abb. 4.3-1a** gezeigt, war die relative Verteilung – im Vergleich zur jeweiligen T Zell-Population im Blut - von LSEC-stimulierten CD45.1<sup>+</sup> T Zellen an Tag 7 nach OVA-Injektion ähnlich zu der Verteilung von CD45.1<sup>+</sup> TCM >45 Tage nach Infektion mit *L.m.*-OVA. Im Gegensatz dazu waren Effektor Gedächtnis T Zellen (TEM) nicht in Lymphknoten und nur in geringer Zahl in der Milz auffindbar. Es stellte sich die Frage, ob neben der ähnlichen Verteilung von LSEC-stimulierten T Zellen und TCM auch weitere Gemeinsamkeiten zwischen diesen T Zell-Populationen bestehen. Hierzu wurden CD90.1<sup>+</sup> LSEC-stimulierte T Zellen, TCM und TEM aus der Milz isoliert und der Phänotyp dieser T Zell-Populationen verglichen (Gating-Strategie siehe **Abb. 4.3-2b**). Die T-box Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomesodermin (Eomes) spielen eine wichtige

Rolle während der Entwicklung von Gedächtnis T Zellen (Angelosanto and Wherry, 2010; Intlekofer et al., 2005; Rao et al., 2010). Ähnlich zu TCM exprimierten LSEC-stimulierte T Zellen große Mengen des Transkriptionsfaktors Eomes (**Abb. 4.3-1c**). Bemerkenswerterweise war jedoch keine Expression von T-bet in LSEC-stimulierten T Zellen messbar (**Abb. 4.3-1c**), während die T-bet-Expression in beiden Gedächtnis T Zell-Populationen vorhanden war, wenn auch in TCM vergleichsweise niedrig (Angelosanto and Wherry, 2010; Kao et al., 2011).

Des Weiteren exprimierten LSEC-stimulierte T Zellen hohe Mengen an CD127, CD122 und CD27; Rezeptoren die neben dem Transkriptionsfaktor Eomes eine wichtige Rolle im Überleben von Gedächtnis T Zellen spielen (Banerjee et al., 2010; Schluns and Lefrancois, 2003; Surh and Sprent, 2008). Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass Gemeinsamkeiten zwischen LSEC-stimulierten T Zellen und TCM bestehen. Zudem zeigen die hier dargestellten Ergebnisse auf, dass LSEC-stimulierte T Zellen mit Hilfe von typischen Markern für Gedächtnis T Zellen - CD44, CD62L und CD127 - phänotypisch zwar von CD62L<sup>-</sup> TEM, jedoch kaum von CD62L<sup>+</sup> TCM zu unterscheiden sind.

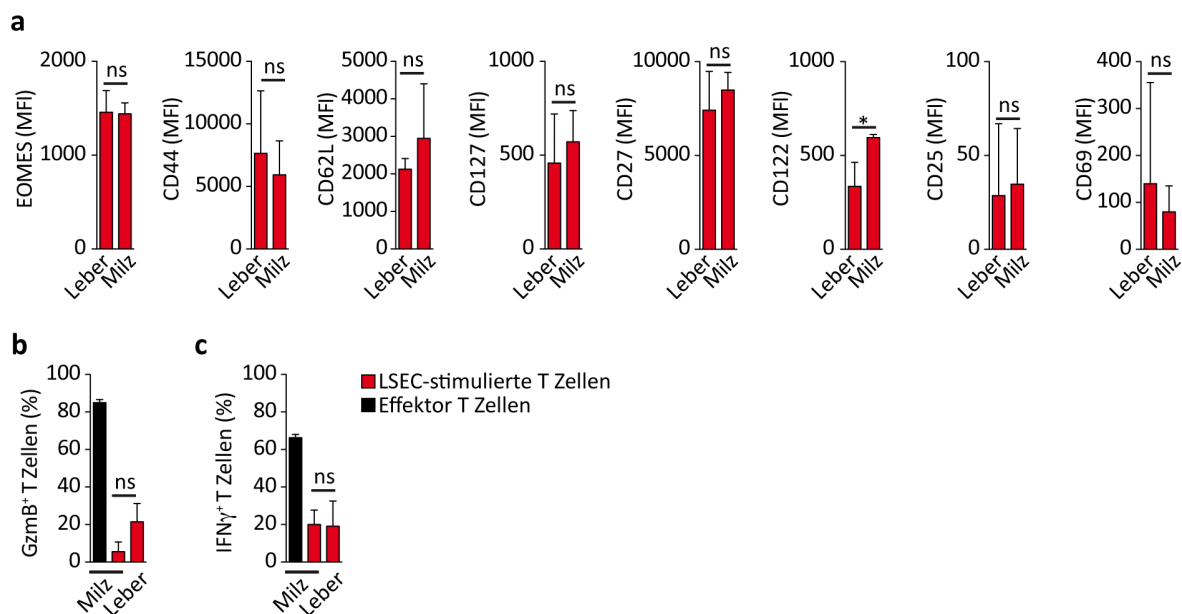


**Abbildung 4.3-1 Die Lokalisation und der Phänotyp von LSEC-stimulierten T Zellen ähnelt TCM. (a)** Verteilung von CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen sieben Tage nach Stimulation durch LSEC in [bm1->C57BL/6] Chimären oder >45 Tage nach *L.m.*-OVA Infektion in C57BL/6 Mäusen. **(b)** Identifizierung und Phänotyp von CD90.1<sup>+</sup> LSEC-stimulierten OT-I T Zellen (Tag 4 nach Stimulation durch LSEC in [bm1->C57BL/6] Chimären) und CD90.1<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen (>45 Tage nach *L.m.*-OVA Infektion) mittels Färbung von lebenden CD8<sup>+</sup> T Zellen auf den kongenen Markers CD90.1. Diese Gating-Strategie ist Grundlage für die Analyse in **(c)**. **(c)** *In vivo* generierte LSEC-stimierte T Zellen, TCM und TEM wurden intrazellulär auf die T-box Transkriptionsfaktoren Eomesodermin (Eomes) und T-bet sowie auf die Oberflächenmoleküle CD127, CD27 und CD122 gefärbt. In grau sind die jeweiligen Färbungen mit der Isotyp-Kontrolle dargestellt. Repräsentative Färbungen für T Zellen aus der Milz aus mindestens vier unabhängigen Experimenten mit 3-5 Tieren pro Gruppe sind gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen SEM an, die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels eines zweiseitigen Student's t-Test (\*= p<0.05, \*\*\*= p<0.001).

Die Stimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC in der Leber führt zwar zur Migration von LSEC-stimulierten T Zellen in lymphatische Organe, jedoch ist eine kleine Population an T Zellen auch nach mehrere Tagen in der Leber aufzufinden (vergleiche **Abb. 4.2-3**). Es stellte sich daher die Frage, ob zwischen LSEC-stimulierten T Zellen in der Leber und in lymphatischen Organen Unterschiede hinsichtlich des hier beschriebenen TCM-ähnlichen Phänotyps bestehen. Um dies zu analysieren, wurden CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen 7 Tage nach

Stimulation durch LSEC in [bm1->C57BL/6] Chimären aus Leber und Milz isoliert und miteinander hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktion verglichen.

Trotz der unterschiedlichen Lokalisation bestand zwischen beiden CD45.1<sup>+</sup> T Zell-Populationen kein Unterschied in der Expression von charakteristischen Oberflächenproteinen wie z.B. CD62L, CD44 und CD127 oder des Transkriptionsfaktors Eomes (**Abb. 4.3-2**). Des Weiteren besaßen LSEC-stimulierte T Zellen aus Leber oder Milz keine CTL-Effektorfunktion, erkennbar an der geringen Prozentzahl an Granzym B<sup>+</sup> (GzmB<sup>+</sup>) T Zellen bzw. niedrigen Menge an IFN $\gamma$ -Produktion im Vergleich zu Effektor T Zellen (**Abb. 4.3-2b,c**). Die einzige Ausnahme bildete eine leicht unterschiedliche Expression von CD122. Diese Ergebnisse weisen auf einen stabilen, homogenen Phänotyp von LSEC-stimulierten T Zellen hin, welcher anscheinend nicht durch das umgebende Gewebe beeinflusst wird.

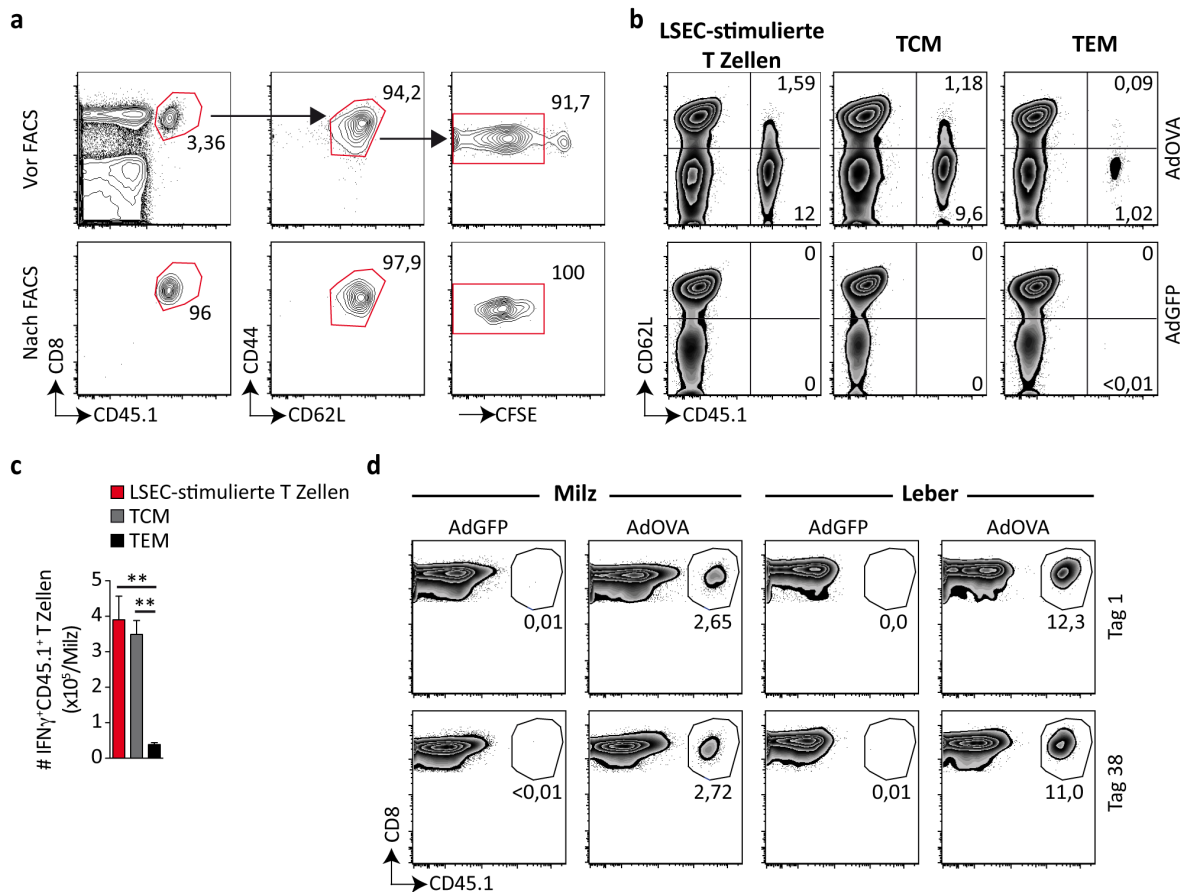


**Abbildung 4.3-2 LSEC-stimulierte T Zellen in Leber und Milz gleichen sich in Phänotyp und Funktion.**

1x10<sup>6</sup> naive CD45.1<sup>+</sup> OT-I Zellen wurden adoptiv in [bm1->C57BL/6] Chimären transferiert. 7 Tage nach LSEC-vermittelter Kreuzpräsentation von löslichem OVA wurden Zellen aus Milz und Leber isoliert und die CD8<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> T Zellen miteinander verglichen. **(a)** Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen und der intrazellulären Expression des Transkriptionsfaktors Eomes. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. **(b)** Prozentzahl der Granzym B<sup>+</sup> T Zellen nach intrazellulärer Färbung sowie **(c)** der IFN $\gamma$ -produzierenden T Zellen 4h nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Für **(b)** und **(c)** dienten CD45.1<sup>+</sup> OT-I Effektor CTL, isoliert aus der Milz an Tag 8 nach AdOVA Infektion, als Kontrolle. Es ist der Mittelwert  $\pm$  SD für eines von zwei Experimenten mit drei Mäusen pro Gruppe gezeigt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels eines zweiseitigen Student's t-Test (ns= nicht signifikant, \*= p<0.05).

Der Mangel an T-bet-Expression in LSEC-stimulierten T Zellen könnte eine Erklärung für die fehlende Produktion von IFN $\gamma$  bei der Stimulation des T Zell Rezeptors sein (Cruz-Guilloty et al., 2009; Szabo et al., 2000). Die beschriebenen Ähnlichkeiten zu TCM (siehe **Abb. 4.3-1**) sowie die Fähigkeit zur Produktion von IFN $\gamma$  bei Stimulation durch reife DC (siehe **Abb. 4.1-1c**) lassen die Deutung zu, dass LSEC-stimulierte T Zellen möglicherweise nicht einen unveränderlichen, ruhenden T Zell-Phänotyp besitzen, sondern ähnlich wie TCM in der Lage sein könnten, in Effektor T Zellen zu differenzieren (Bouneaud et al., 2005; Kaech and Cui, 2012; Wherry et al., 2003). Um die Möglichkeit einer solchen Plastizität zu untersuchen, wurden CD45.1<sup>+</sup> LSEC-stimulierte T Zellen aus [bm1->C57BL/6] Chimären sowie CD45.1<sup>+</sup> TCM oder TEM >45 Tage nach Infektion mit *L.m.*-OVA mittels FACS sortiert und eine identische Anzahl adoptiv in CD45.2<sup>+</sup> Mäuse transferiert. Diese Tiere wurden dann mit einem rekombinanten Adenovirus, das das Modellantigen OVA exprimiert (AdOVA), infiziert und fünf Tage später die Entstehung von CD45.1<sup>+</sup> Effektor T Zellen gemessen. Die Infektion mit GFP-exprimierendem Adenovirus (AdGFP) diente als Kontrolle. Um eine Kontamination von LSEC-stimulierten T Zellen mit naiven T Zellen auszuschließen, wurden nur CD8<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, proliferierte T Zellen (CFSE<sup>NIEDRIG</sup>) aus [bm1->C57BL/6] Chimären für diesen Versuch verwendet (**Abb. 4.3-3a**).

5 Tage nach Infektion konnte eine starke Expansion von CD45.1<sup>+</sup> LSEC-stimulierten T Zellen in AdOVA-infizierten Tieren beobachtet werden, diese zeigten vornehmlich eine Herunterregulation von CD62L (**Abb. 4.3-3b**). Erstaunlicherweise war bezüglich des Ausmaßes der T Zell-Expansion sowie die Gesamtzahl der IFN $\gamma$ -produzierenden T Zellen kein Unterschied zwischen LSEC-stimulierten T Zellen und TCM erkennbar (**Abb. 4.3-3c**). Im Gegensatz dazu waren transferierte CD45.1<sup>+</sup> TEM kaum in der Lage, während der Infektion zu expandieren (Bouneaud et al., 2005; Wherry et al., 2003). Um zu untersuchen, ob LSEC-stimulierte T Zellen die beobachtete Fähigkeit zur Expansion auch nach einer längeren Abwesenheit von Antigen besitzen, wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse nach Transfer der gleichen Anzahl von CD45.1<sup>+</sup> LSEC-stimulierten OT-I Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten infiziert (**Abb. 4.3-3d**). Auch eine Zeitspanne von 38 Tagen zwischen adoptivem T Zell-Transfer und AdOVA-Infektion führte zu einer vergleichbaren Expansion von LSEC-stimulierten T Zellen wie bei einer Infektion an Tag 1 nach Transfer.



**Abbildung 4.3-3 Im Kontext einer Infektion differenzieren LSEC-stimulierte T Zellen und TCM in Effektor T Zellen.** (a) Gating-Strategie zur Sortierung von *in vivo* erzeugten CD45.1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> OT-I CFSE<sup>NIEDRIG</sup> LSEC-stimulierten T Zellen in Abgrenzung zu noch vorhandenen naiven CFSE<sup>HOCH</sup> OT-I T Zellen (obere Teil). Die Reinheit der sortierten LSEC-stimulierten T Zellen wurde nach dem Sortieren validiert (unterer Teil). Die Zahlen beziehen sich auf die jeweilige Zellpopulation innerhalb des Gates. Die so erhaltenen LSEC-stimulierten T Zellen wurden für den adoptiven Transfer benutzt. (b,c) C57BL/6 Wildtyp-Mäusen wurden nach Transfer von 1000 *in vivo* hergestellten LSEC-stimulierten T Zellen, TCM oder TEM entweder mit AdOVA oder AdGFP (5x10<sup>6</sup> PFU/Maus i.v.) infiziert. An Tag 7 nach Infektion wurde die Frequenz der CD45.1<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> Effektor T Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> T Zellen in der Milz (b) sowie die Anzahl der IFN $\gamma$  produzierenden CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen nach Stimulation durch PMA/Ionomycin (c) bestimmt. (d) An Tag 1 oder Tag 38 nach Transfer von 5x10<sup>3</sup> LSEC-stimulierten T Zellen in C57BL/6 Mäuse wurden diese mit AdOVA oder AdGFP (5x10<sup>6</sup> PFU/Maus) infiziert. Gezeigt ist die Frequenz von CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen in Milz und Leber fünf Tage nach Infektion. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils zwei unabhängige Experimente mit 3-4 Tieren pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels eines zweiseitigen Student's t-Test (\*\*= p<0.01).

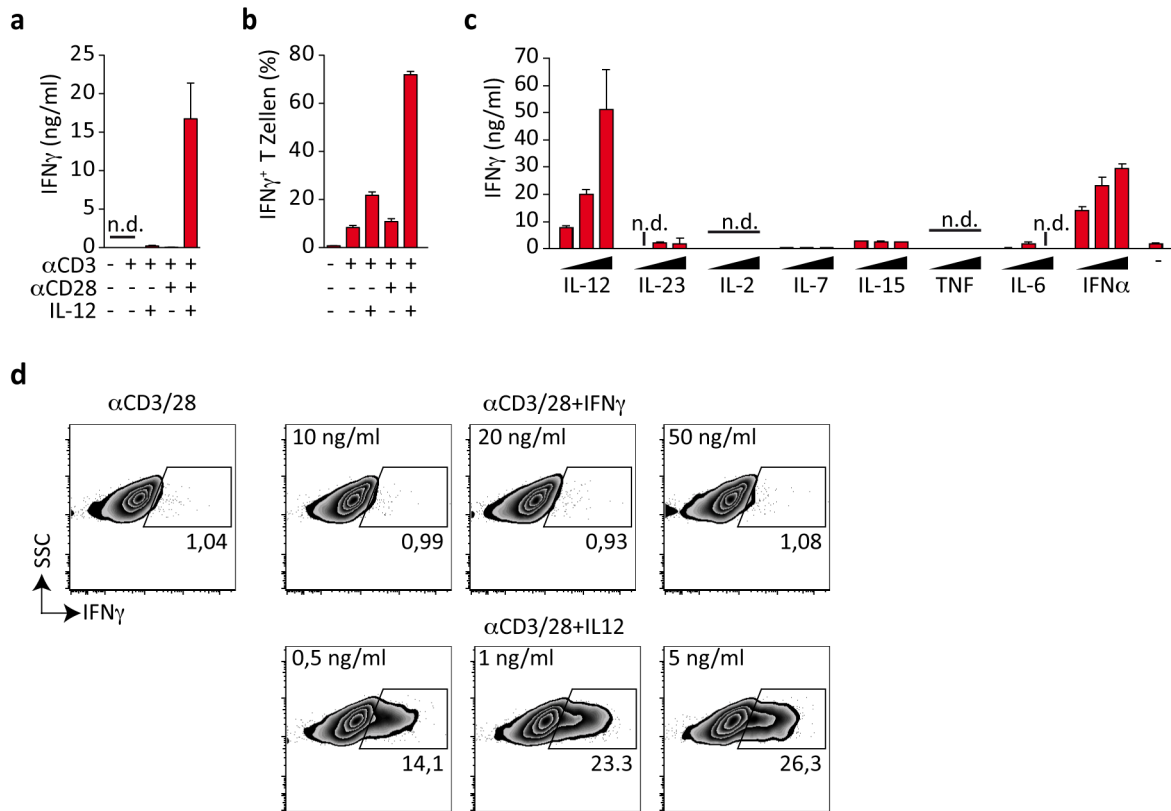
Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass LSEC-stimulierte T Zellen keinen unveränderbaren toleranten Phänotyp besitzen, im Gegensatz zu früheren Annahmen (Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2000). Auch unterscheidet sich der Status von LSEC-stimulierten T Zellen von selbst-reaktiven anergen T Zellen, welche ihren ruhenden Zustand bei Erkennung ihres Antigens im Kontext einer Infektion aufrecht erhalten (Schietinger et al., 2012). Die Stimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC scheint somit vielmehr einen Differenzierungszustand zu induzieren, der funktionelle Gemeinsamkeiten mit TCM aufweist und LSEC-stimulierten T Zellen gleichermaßen erlaubt, unter inflammatorischen Bedingungen Effektor T Zellen zu produzieren.

#### **4.4 Die Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen in Effektor T Zellen beruht auf einem bestimmten molekularen Mechanismus**

Als Nächstes sollte untersucht werden, welcher Mechanismus der Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen zugrunde liegt. In Abschnitt 4.1 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des TCR nicht dazu ausreichte, die Produktion des Effektor-Zytokins IFN $\gamma$  in LSEC-stimulierten T Zellen zu induzieren, die antigen-spezifische Interaktion mit reifen DC jedoch zur IFN $\gamma$  Produktion durch LSEC-stimulierte T Zellen führte. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass neben der Stimulation des TCR zusätzliche kostimulatorische Signale in diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen könnten.

Um dies zu untersuchen, wurden LSEC-stimulierte T Zellen *in vitro* mit anti-CD3/28-beschichteten Partikel ( $\alpha$ CD3/28) - als künstliche APC - in Kombination mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen inkubiert (**Abb. 4.4-1**). Die Kombination von  $\alpha$ CD3/28+IL-12, führte innerhalb von 20h zu einer starken Produktion von IFN $\gamma$ , gemessen durch ELISA im Überstand der Zellkultur (**Abb. 4.4-1a**). Fehlte hingegen eines dieser drei Signale, so war keine Produktion von IFN $\gamma$  detektierbar. Ferner ergab die intrazelluläre Färbung IFN $\gamma$ -produzierender T Zellen nach erneuter Restimulation mit PMA/Ionomycin (**Abb. 4.4-1b**), dass nach der Stimulation mit  $\alpha$ CD3/28+IL-12 nahezu alle T Zellen (>70%) die Fähigkeit erlangt hatten, IFN $\gamma$  zu produzieren. Ersetzte man unter diesen Bedingungen das Zytokin IL-12 durch andere proinflammatorische Zytokine (**Abb. 4.4-1c,d**), zeigte sich, dass nur die Kombination von  $\alpha$ CD3/28 mit IFN $\alpha$  in der Lage war eine IFN $\gamma$ -Produktion durch LSEC-stimulierten T Zellen hervorzurufen. Jedoch ist nicht

auszuschließen, das weitere – hier nicht untersuchte – Zytokine oder membranständige kostimulatorische Proteine einen Einfluss auf die Reaktivierung LSEC-stimulierter T Zellen haben könnten.



**Abbildung 4.4-1 Eine bestimmte Kombination von stimulatorischen Signalen führt zur Expression von IFN $\gamma$  durch LSEC-stimulierte T Zellen.** OT-I T Zellen wurden nach *in vitro* Kokultur mit OVA-beladenen LSEC unterschiedlichen stimulatorischen Signalen ausgesetzt. Stimulation für 20h und Detektion von IFN $\gamma$  im Überstand der Zellkultur durch ELISA (**a**) oder Bestimmung der Prozentzahl von IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T Zellen nach zusätzlichen 4h Restimulation mit PMA/Ionomycin (**b**) mithilfe intrazellulärer Färbung. In (**c**) und (**d**) wurden LSEC-stimulierte T Zellen für eine Zeitspanne von 20h mit αCD3/28 und unterschiedlichen Konzentrationen von Zytokinen (5-20ng/ml bzw. 5-50ng/ml für IFN $\gamma$ ) stimuliert. Die produzierte Menge an IFN $\gamma$  wurde in den Überständen der Zellkultur mittels ELISA gemessen (**c**) oder lebende CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden nach 20h direkt intrazellulär auf IFN $\gamma$  gefärbt (**d**). Repräsentative Daten für drei unabhängige Experimenten sind gezeigt.

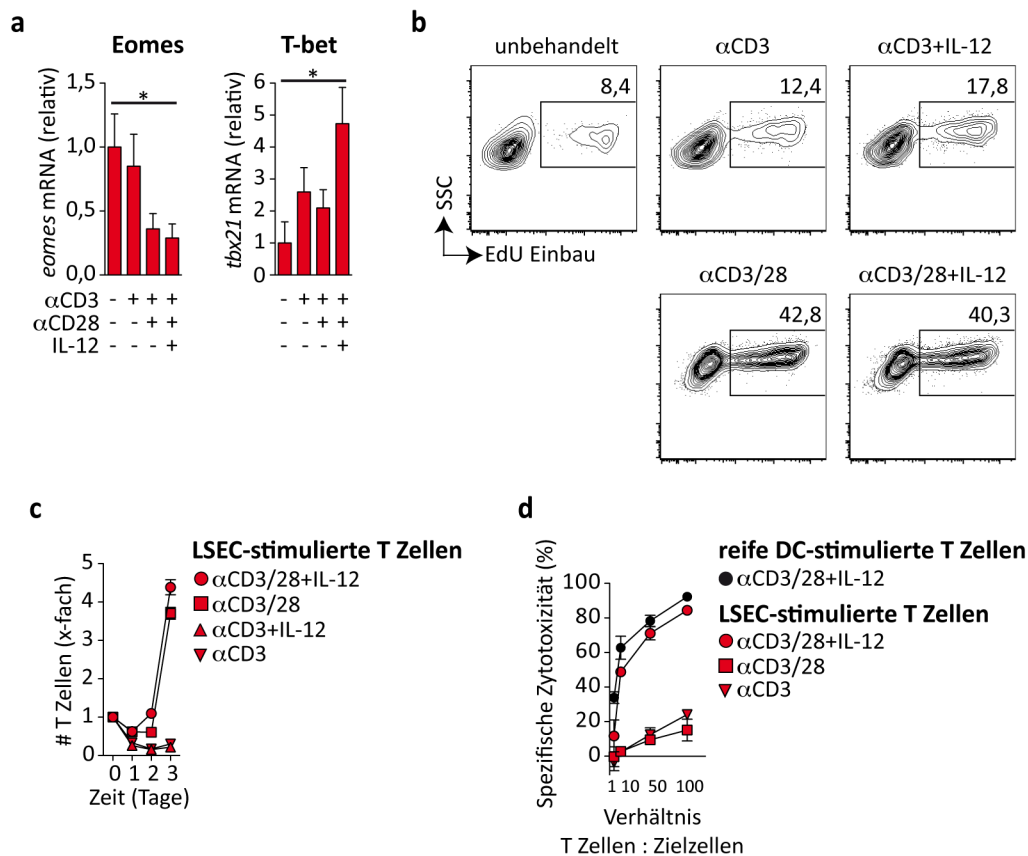
Um weitergehend zu klären, ob die beschriebene Kombination kostimulatorischer Signale in der Lage ist, LSEC-stimulierte T Zellen in Effektor T Zellen zu differenzieren, wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomes mittels Real-Time PCR (RT-PCR) analysiert. Nach 10h Stimulation mit αCD3/28+IL-12 war in LSEC-stimulierten T Zellen eine Hochregulation der *tbx21*-mRNA (T-bet) und eine Herunterregulation von *eomes*-mRNA zu beobachten (**Abb. 4.4-2a**). Diese Ergebnisse sprechen für eine beginnende



Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen zu Effektor T Zellen (Takemoto et al., 2006).

In weiteren Versuchen wurde nun die Bedeutung von kostimulatorischen Signalen für die Expansion von LSEC-stimulierten T Zellen *in vitro* untersucht. Hier zeigte sich, dass die Stimulation mit  $\alpha$ CD3/28, ohne Zugabe von IL-12, sowohl für die Proliferation als auch die Expansion von LSEC-stimulierten T Zellen ausreichend war (**Abb. 4.4-2b,c**). Untersuchte man jedoch unterschiedlich stimulierten T Zellen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, so hing der Erwerb zytotoxischer Fähigkeiten von zusätzlich beigefügtem IL-12 ab und war nach Stimulation von LSEC-stimulierten T Zellen mit  $\alpha$ CD3/28 alleine nicht messbar (**Abb. 4.4-2d**).

Insgesamt demonstrieren diese Ergebnisse, dass die kostimulatorischen Signalen IL-12 und CD28 *in vitro* eine tragende Rolle bei der Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen zu Effektor T Zellen spielen. Jedoch scheinen die CD28- und IL-12-vermittelten Signale für unterschiedliche Aspekte dieses Differenzierungsprozesses verantwortlich zu sein.

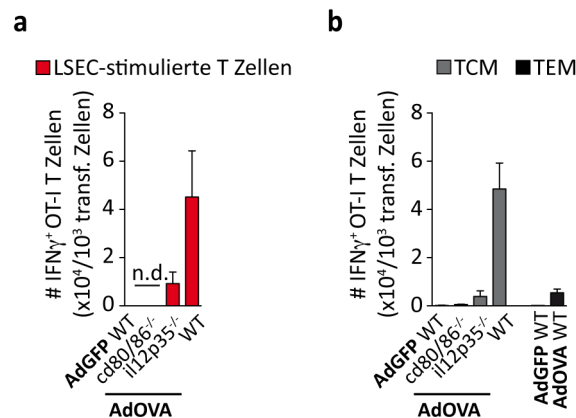


**Abbildung 4.4-2 Die Stimulation mit  $\alpha$ CD3/28+IL-12 veranlasst LSEC-stimulierten T Zellen zur Differenzierung in Effektor T Zellen.** (a) LSEC-stimulierte T Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD3/28 oder  $\alpha$ CD3/28+IL-12 für 10h stimuliert und die RNA dieser Zellen mittels semiquantitativer RT-PCR nach mRNA für T-bet (*tbx21*) und Eomes (*eomes*) hin untersucht. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$ SEM von vier unabhängigen Experimenten. (b) Zur Analyse der T Zell-Proliferation wurden LSEC-stimulierte T Zellen nach *in vitro* Kokultur für 20h in EdU<sup>21</sup>-haltigem Medium stimuliert. Der Einbau von EdU in die zelluläre DNA wurde anschließend in lebenden T Zellen mittels intrazellulärer Färbung bestimmt. (c) Zeitkinetik der T Zell-Expansion und (d) spezifische Zytotoxizität der stimulierten T Zellen 72h nach Beginn der Stimulation *in vitro*. Reife DC-stimulierte T Zellen dienten als Kontrolle in (d). Eines von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die Analyse zur Regulation von T-bet und Eomes auf mRNA-Ebene wurde mit Hilfe von Dr. Imke Atreya aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Neurath, Universitätsklinikum Erlangen, durchgeführt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels eines zweiseitigen Student's t-Test (\*= p<0.1).

Um zu untersuchen, ob diese Art der Kostimulation auch *in vivo* für die beschriebene Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen zu Effektor T Zellen während einer Infektion nötig ist (vergleiche Abschnitt 4.3), wurden CD45.1<sup>+</sup> LSEC-stimulierte T Zellen in Knockout-Mäuse transferiert, in welchen kein CD28-Signal (*cd80/86*<sup>-/-</sup>) oder kein IL-12-Signal (*il12p35*<sup>-/-</sup>) vermittelt werden kann. Bemerkenswerterweise waren fünf Tage nach Infektion mit AdOVA keine CD45.1<sup>+</sup> IFN $\gamma$ -produzierenden T Zellen in *cd80/86*<sup>-/-</sup> Tieren

<sup>21</sup> EdU: 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin

auffindbar. Gleiches galt für die Infektion von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen mit AdGFP, also in Abwesenheit OVA-spezifischer TCR-Stimulation (**Abb. 4.4-3a**). In  $il12p35^{-/-}$  Mäusen waren hingegen  $CD45.1^{+}IFN\gamma^{+}$  Effektor T Zellen detektierbar, allerdings war ihre Anzahl im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen um mehr als 75% reduziert. Diese Daten bestätigen die Schlüsselfunktion von CD28 und IL-12 bezüglich der Entstehung von Effektor T Zellen aus LSEC-stimulierten T Zellen. Weitergehend deutet die Analyse der  $il12p35^{-/-}$  Mäuse darauf hin, dass die Funktion von IL-12 *in vivo* zumindest partiell durch andere kostimulatorische Signale erfüllt werden kann.



**Abbildung 4.4-3 LSEC-stimulierte T Zellen und TCM benötigen die gleiche Kombination an kostimulatorischen Signalen zur Differenzierung in Effektor T Zellen.** Die gleiche Anzahl von **(a)** LSEC-stimulierten OT-I T Zellen (Tag 4 *ex vivo*) oder **(b)** die gleicher Anzahl von TCM (>45 Tage nach *L.m.*-OVA Infektion) wurde adoptiv in C57BL/6 Wildtyp (WT),  $cd80/86^{-/-}$  oder  $il12p35^{-/-}$  Mäuse transferiert. TEM dienten als Kontrolle in **(b)**. Anschließend wurden die Mäuse mit AdOVA oder AdGFP ( $5 \times 10^6$  PFU/Maus) infiziert und fünf Tage später die Menge der  $IFN\gamma^{+} CD45.1^{+}$  OT-I T Zellen pro Milz - nach PMA/Ionomycin Stimulation für 4h - bestimmt. Dargestellt ist jeweils die Anzahl  $IFN\gamma^{+} CD45.1^{+}$  T Zellen relativ zu 1000 ursprünglich transferierten  $CD45.1^{+}$  T Zellen. Die Ergebnisse aus einem von zwei unabhängigen Experimenten mit 3-4 Mäusen pro Gruppe sind dargestellt.

Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft von LSEC-stimulierten T Zellen und Gedächtnis T Zellen könnte man erwarten, dass TCM für die Generierung neuer Effektor T Zellen nicht von kostimulatorischen Signalen abhängig sind, oder zumindest in geringerem Maße als LSEC-stimulierte T Zellen (Allam et al., 2009; Curtsinger et al., 1998; Hamilton and Jameson, 2012; Lefrancois, 2006).

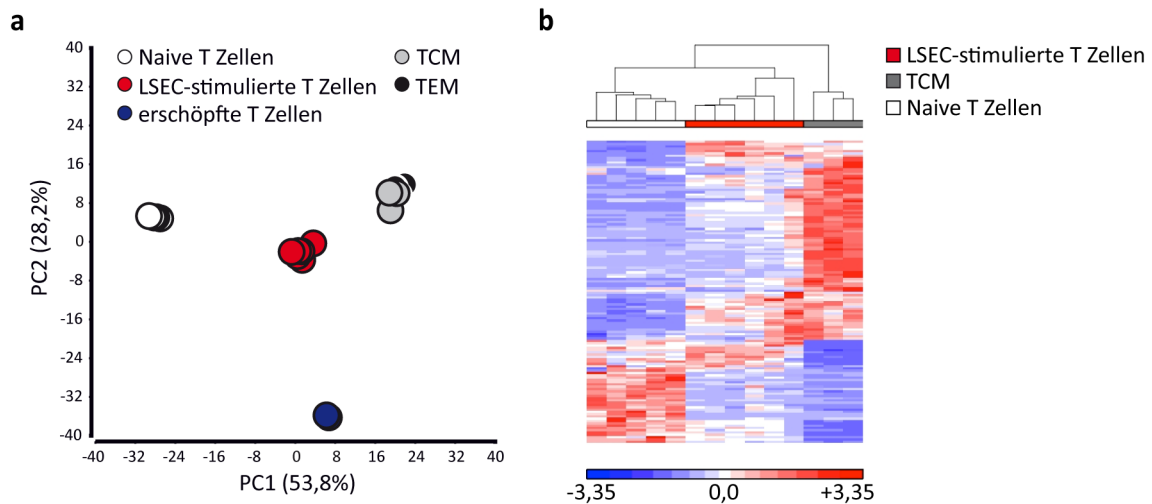
Dies war jedoch nicht der Fall, denn auch TCM zeigten überraschenderweise keine bzw. eine stark verringerte Differenzierung zu Effektor T Zellen in  $cd80/86^{-/-}$  oder  $il12p35^{-/-}$  Mäusen (**Abb. 4.4-3b**). Wie zu erwarten expandierten TEM nach adoptivem Transfer in C57BL/6 Mäuse und anschließender AdOVA-Infektion kaum (**Abb. 4.4-3b**; Bouneaud et al., 2005; Pulendran and Ahmed, 2011). Somit scheint die Entstehung neuer Effektor T Zellen sowohl aus LSEC-stimulierten T Zellen wie auch aus TCM auf der gleichzeitigen Stimulation durch den TCR, CD28 und den IL-12-Rezeptor zu beruhen.

#### **4.5 Die Effektorfunktionen von LSEC-stimulierten T Zellen und Gedächtnis T Zellen sind verschieden stark ausgeprägt**

Bisher konnte eine große Ähnlichkeit zwischen LSEC-stimulierten T Zellen und TCM gezeigt werden. Sowohl TCM als auch LSEC-stimulierte T Zellen hielten sich vornehmlich in lymphatischen Organen auf (**Abb. 4.3-1**) und besaßen zudem die Fähigkeit, unter bestimmten Stimulationsbedingungen in Effektor T Zellen zu differenzieren (siehe **Abb. 4.4-2** und **Abb. 4.4-3**). Jedoch ist die Entstehung dieser beiden T Zell-Populationen fundamental unterschiedlich: LSEC-stimulierte T Zellen entwickeln sich unter nicht-inflammatorischen Bedingungen durch Interaktion mit LSEC in der Leber, TCM hingegen nach Stimulation durch professionelle APC, z.B. reife DC, unter inflammatorischen Bedingungen in lymphatischen Organen (Harty and Badovinac, 2008; Kaech and Cui, 2012; Kurts et al., 2010; Pulendran and Ahmed, 2011; Steinman, 2008)

Es stellte sich deshalb die Frage, ob sich diese unterschiedliche Herkunft trotz eines ähnlichen Phänotyps (vergleiche **Abb. 4.3-1**) auf der Ebene der Genexpression widerspiegelte. Um dies zu untersuchen, wurden naive OT-I T Zellen, LSEC-stimulierte OT-I T Zellen, OT-I TCM und TEM >45 Tage nach *L.m.*-OVA Infektion sowie LCMV-spezifische T Zellen nach chronischer Infektion (erschöpfte T Zellen) *ex vivo* mittels FACS sortiert und eine globale Analyse ihres Transkriptom durchgeföhrt (**Abb. 4.5-1**). Bei dem Vergleich der variabel exprimierten Gene mittels Hauptkomponentenanalyse ist ersichtlich, dass sich die Gensignatur von LSEC-stimulierte T Zellen klar von der Gensignatur von TCM und TEM unterscheidet (**Abb. 4.5-1a**). Gleiches gilt auch für den Vergleich von LSEC-stimulierten T Zellen zu naiven T Zellen und chronisch stimulierten, erschöpften T Zellen.

Merkwürdig ist, die Gensignatur von LSEC-stimulierten T Zellen im Vergleich zur charakteristischen Genexpression von  $CD8^+$  T Zellen, die deletiert werden oder anerg sind (Parish et al., 2009), nur minimale Übereinstimmungen aufweist (Böttcher et al., 2013, *in press* und Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die vorherige Annahme, dass die Stimulation durch LSEC nicht zur T Zell-Deletion führt.



**Abbildung 4.5-1 Der Differenzierungszustand von LSEC-stimulierten T Zellen unterscheidet sich von anderen antigen-erfahrenen  $CD8^+$  T Zell-Populationen.** (a) Hauptkomponentenanalyse der am stärksten variabel exprimierten Gene ( $n=671$  Gene,  $FDR < 0.000005$ ) in naiven OT-I T Zellen ( $n=5$ ), LSEC-stimulierten OT-I T Zellen (Tag 4-6 nach Stimulation durch LSEC *in vivo*,  $n=6$ ), erschöpften LCMV-spezifischen  $CD8^+$  T Zellen ( $n=2$ ) und OT-I TCM ( $n=3$ ) oder TEM ( $n=3$ ) an Tag 45-60 nach *L.m.*-OVA Infektion (siehe Böttcher et al., 2013, *in press*). (b) Regulation von TCM-spezifischen Genen in LSEC-stimulierten T Zellen (siehe Böttcher et al., 2013, *in press*). Gene wurden als unterschiedlich reguliert eingestuft, wenn folgende Kriterien auf die Genexpression im Vergleich zu naiven T Zellen zutrafen:  $FC \geq 2$ ,  $p < 0.05$ , Unterschied der Mittelwerte  $> 100$  und 10% FDR. Die hier gezeigten Analysen wurden zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Schultze am LIMES Institut der Universität Bonn durchgeführt.

Die hier durchgeführte Genexpressionsanalyse belegt eindeutig, dass die Stimulation von T Zellen durch LSEC und die Induktion von Gedächtnis T Zellen während einer Infektion nicht in der Entstehung identischer T Zell-Populationen resultiert; trotz der beschriebenen Ähnlichkeiten (vergleiche Abschnitte 4.3 und 4.4). Es stellte sich nun die Frage, ob die beschriebenen funktionellen Gemeinsamkeiten dennoch innerhalb der Gensignaturen von TCM und LSEC-stimulierten T Zellen zu finden sind. Um dieser Frage nachzugehen wurden die Gensignaturen von TCM und LSEC-stimulierten T Zellen nach bestimmten Genen durchsucht, die zu einer beschriebenen Kernsignatur von Gedächtnis T Zellen gehören (Wirth et al., 2010). Die Regulation der Genexpression von TCM zeigte mit dieser Kernsignatur eine Überlappung von 33% (Abb. 4.5-1b). Wurden nun diese

TCM-spezifischen Gene zum Vergleich mit LSEC-stimulierten T Zellen herangezogen, zeigte sich eine gleichgerichtete Regulation von >40% der Gene in LSEC-stimulierten T Zellen und TCM (**Abb. 4.5-1b**; siehe auch Böttcher et al., 2013, *in press*). Auch zeigte keines der nicht signifikant regulierten Gene eine gegensätzliche Regulation in LSEC-stimulierten T Zellen (Daten nicht gezeigt). Trotz dieser Gemeinsamkeit von LSEC-stimulierten T Zellen und TCM ist hervorzuheben, dass das Ausmaß der Genexpression von diesen in signifikant regulierten Genen in LSEC-stimulierten T Zellen geringer war als in TCM.

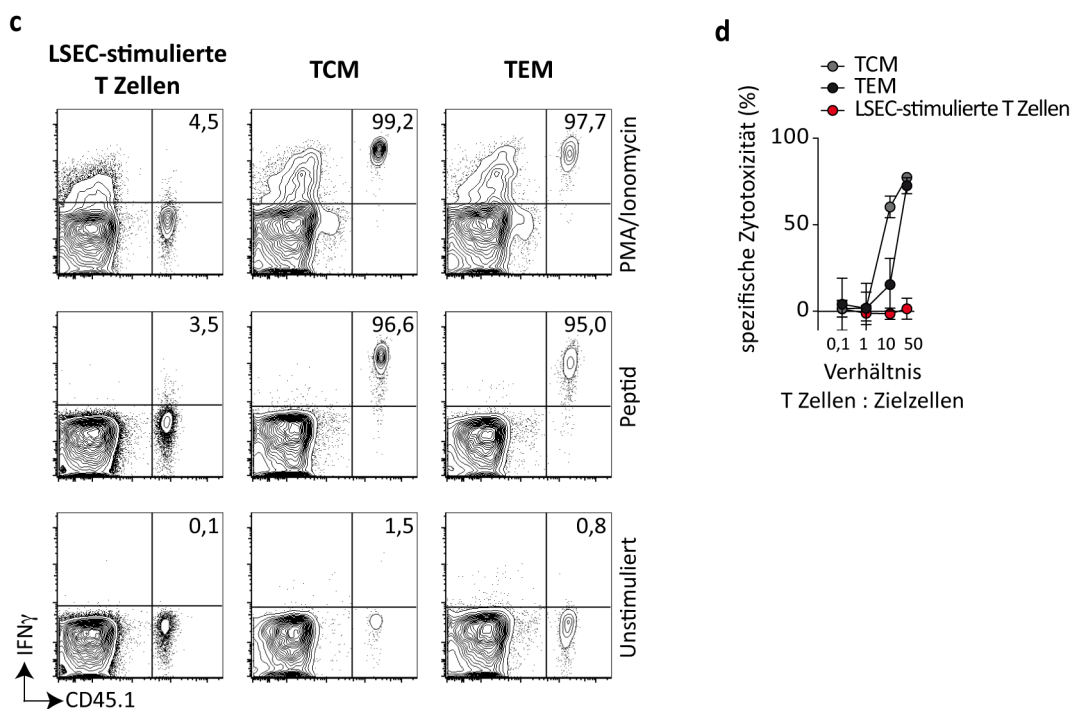
KEGG Signalweg	Anzahl	%	P-Wert	Gene
NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität	15	3.54	1.001E-05	H2-K1, ICAM1, PRF1, PTPN6, PIK3CD, KLRK1, HCST, RAC2, PTK2B, IFNG, ZAP70, PPP3CC, FASL, PPP3CA, IFNGR1
JAK-STAT Signalweg	12	2.83	0.005	PTPN6, IL2RB, SOCS2, CCND3, IFNG, PIK3CD, IL2RG, JAK3, IL7R, CISH, IFNGR1, STAT3
T Zell-Rezeptor Signalweg	10	2.36	0.007	ITK, CDC42, PTPN6, MAP3K8, IFNG, PIK3CD, ZAP70, PPP3CC, PPP3CA, CDK4
Zytokin-Zytokin-Rezeptor Interaktion	15	3.54	0.011	IL18R1, IL2RB, IL18RAP, TNFRSF25, TNFSF14, CXCR3, CCL5, IL7R, CCR5, IFNG, CXCR6, TNFRSF18, FASL, IL2RG, IFNGR1
Chemokin Signalweg	11	2.59	0.039	ITK, CDC42, CCR5, RAC2, PTK2B, PIK3CD, CXCR6, JAK3, CXCR3, CCL5, STAT3

**Tabelle 4.5-1 Mehrere KEGG-Signalwege sind im Vergleich von LSEC-stimulierten T Zellen mit TCM signifikant herunterreguliert.** Die Analyse von KEGG Signalwegen mittels DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>; Huang da et al., 2009) wurde angewandt, um diejenigen KEGG Signalwege zu identifizieren, die in LSEC-stimulierten T Zellen im Vergleich zu TCM signifikant herunter reguliert sind. Diese Analyse wurde auf der Basis von Genexpressionsdaten durchgeführt, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Schultze (LIMES Institut, Universität Bonn) erhoben wurden.

Diese Daten lieferten zudem Hinweise dafür, dass bestimmte Signalwege oder Funktionen in LSEC-stimulierten T Zellen im Vergleich zu TCM nur schwach oder gar nicht angeschaltet sein könnten. Tatsächlich zeigte eine Analyse von KEGG-Signalwegen, dass die Signalwege für Zytotoxizität, Zytokin-Zytokin-Interaktionen sowie der T Zell-Rezeptor Signalweg in TCM im Vergleich zu LSEC-stimulierten T Zellen hochreguliert waren (**Tabelle 4.5-1**). Insbesondere die Hochregulation von Genen für CTL Effektorfunktionen – z.B. IFNG, FASL, IL18R1 – könnte bedeuten, dass TCM im Gegensatz zu LSEC-stimulierten T Zellen solche Effektorfunktionen besitzen und unmittelbar ausüben können. Tatsächlich

zeigte sich, dass TCM ähnlich zu TEM innerhalb von 4h große Mengen IFN $\gamma$  produzierten, wenn sie mit PMA/Ionomycin oder ihrem antigen-spezifischen Peptid stimuliert wurden (**Abb. 4.5-2a**). Auch zeigten beide Gedächtnis T Zell-Populationen eine starke Zytotoxizität gegen peptid-beladene Zielzellen (**Abb. 4.5-2b**). Hingegen besaßen LSEC-stimulierte T Zellen *ex vivo* weder die Fähigkeit zur direkten Produktion von IFN $\gamma$  noch waren sie in der Lage, peptid-beladene Zielzellen zu lysieren (**Abb. 4.5-2a,b**).

Zusammengenommen lässt sich aus diesen Ergebnisse ableiten, dass LSEC-stimulierte T Zellen einen eigenständigen Differenzierungszustand innehaben. LSEC-stimulierten T Zellen fehlen im Vergleich zu Gedächtnis T Zellen direkte CTL-Effektorfunktionen, jedoch besitzen sie ähnlich zu TCM das Potential zur Ausbildung neuer Effektor T Zellen.



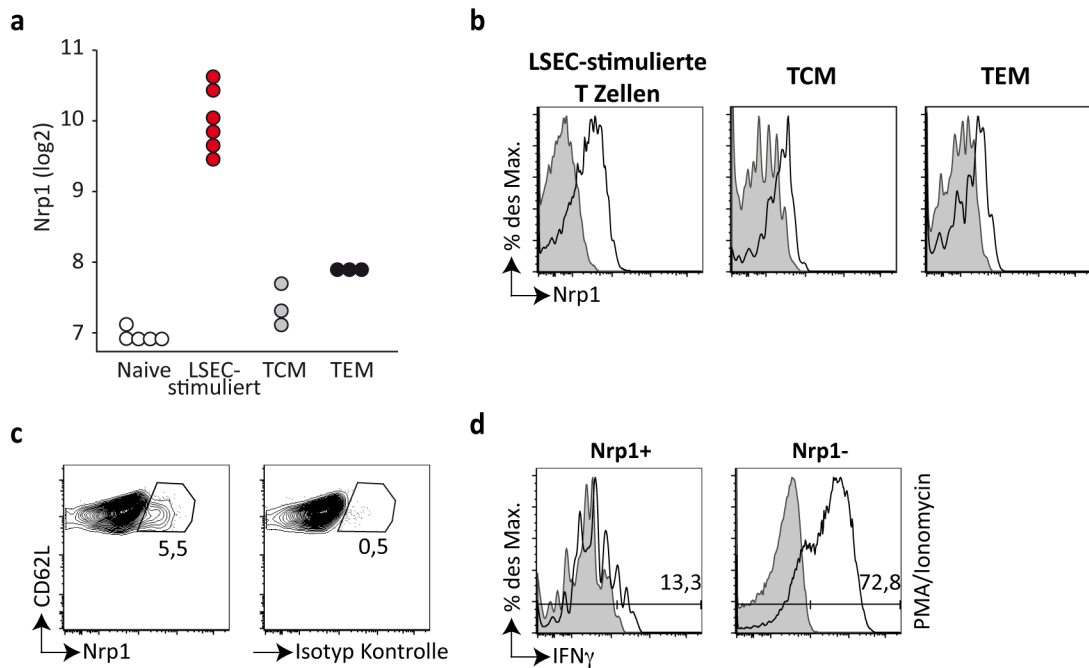
**Abbildung 4.5-2 Im Gegensatz zu TCM und TEM besitzen LSEC-stimulierte T Zellen keine unmittelbaren Effektorfunktionen.** CD45.1<sup>+</sup> LSEC-stimulierte T Zellen (an Tag 4 nach Stimulation durch LSEC *in vivo*), TCM und TEM (>Tag 45 nach Infektion) wurden mittels FACS sortiert. **(a)** Intrazelluläre Färbung der IFN- $\gamma$ -Produktion 4h nach Restimulation auf CD45.2<sup>+</sup> Milzzellen mit dem OVA-Peptid SIINFEKL oder PMA/Ionomycin. Unstimulierte T Zellen dienen als Kontrolle. **(b)** Spezifische Zytotoxizität *ex vivo*. Repräsentative Daten von mindestens 2 Experimenten mit 3-4 Mäusen pro Gruppe sind gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

#### 4.6 Die Neuropilin-1-Expression unterscheidet zwischen LSEC-stimulierten T Zellen und TCM

Wie in Abschnitt 4.3 gezeigt, sind konventionelle Marker für Gedächtnis T Zellen nicht zur Unterscheidung zwischen LSEC-stimulierten T Zellen und TCM geeignet. Deshalb wurde eine Cluster Analyse (siehe 3.2.9.3) auf Basis der Genexpressionsdaten von naiven T Zellen, TCM, TEM und LSEC-stimulierten T Zellen durchgeführt, um Gencluster zu identifizieren, die spezifisch für LSEC-stimulierten T Zellen sind. Anhand dieser Analyse konnten Gencluster mit 266 Genen ermittelt werden, die spezifisch in LSEC-stimulierte T Zellen exprimiert werden (siehe auch Böttcher et al., 2013, *in press*). Innerhalb dieser Gene war Neuropilin-1 (Nrp1) das Oberflächenmolekül mit der größten differentiellen Expression in LSEC-stimulierten T Zellen (mit um den Faktor 6,83 erhöhte Expression im Vergleich zu naiven T Zellen; **Abb. 4.6-1a**). Nrp1 konnte *ex vivo* auf LSEC-stimulierten T Zellen angefärbt werden, die Färbung von TCM und TEM zeigte eine vergleichsweise geringe Expression von Nrp1 (**Abb. 4.6-1b**).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Färbung von Nrp1 zur Unterscheidung von LSEC-stimulierten T Zellen und TCM im endogenen T Zell-Repertoire benutzt werden kann. Um dies weitergehend zu untersuchen, wurden CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen auf Nrp1 gefärbt. Innerhalb des endogene T Zell-Repertoires exprimierten 3-5% der antigen-erfahrenen CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen Nrp1 (**Abb. 4.6-1c**). Um weitergehend zu untersuchen, ob diese Nrp1<sup>+</sup> T Zellen des endogenen Repertoires LSEC-stimulierten T Zellen ähneln, wurden endogene Nrp1<sup>+</sup> und Nrp1<sup>-</sup> T Zellen aus CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen sortiert und mit PMA/Ionomycin stimuliert (**Abb. 4.6-1d**). In Analogie zu LSEC-stimulierten T Zellen zeigte sich, dass Nrp1<sup>+</sup> T Zellen bei derartiger Stimulation kein IFN $\gamma$  produzierten (**Abb. 4.6-1d**). Nrp1<sup>-</sup> T Zellen waren hingegen in der Lage, große Mengen an IFN $\gamma$  zu produzieren. Diese Daten deuten an, dass Nrp1<sup>+</sup> T Zellen des endogenen Repertoires eine unmittelbare CTL-Effektorfunktion fehlt. Insgesamt liefern diese Ergebnisse folglich Hinweise darauf, dass die Expression von Nrp1 zur Identifizierung von denjenigen CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen benutzt werden kann, die möglicherweise aus der Stimulation von naiven endogenen CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC hervorgegangen sind.





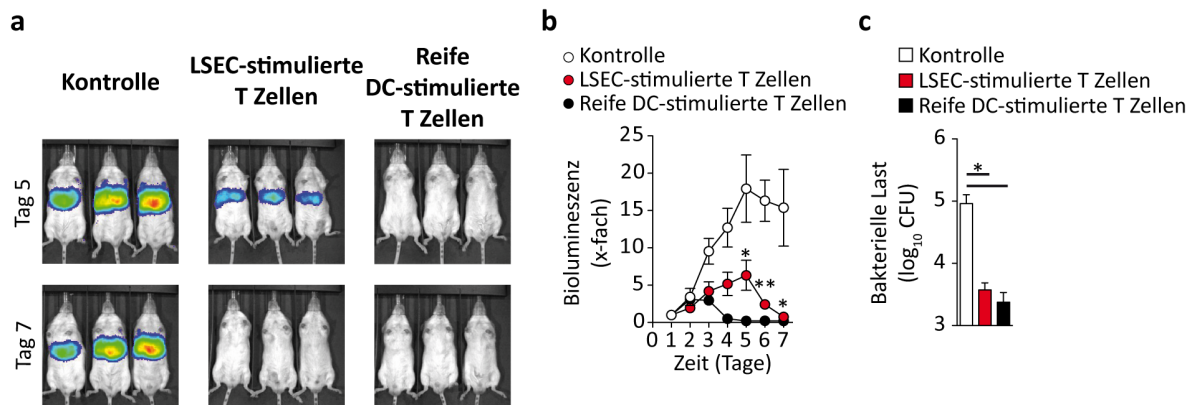
**Abbildung 4.6-1 Neuropilin-1 identifiziert LSEC-stimulierte T Zellen.** (a) Analyse von Neuropilin-1 (Nrp1) mRNA Expression basierend auf Daten der globalen Genexpressions-Analyse aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Schultze (LIMES Institut, Universität Bonn). (b) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenfärbung von Nrp1 auf OT-I TCM, TEM und LSEC-stimulierten T Zellen *ex vivo*. Die Färbung mit einem Isotyp-Antikörper diente jeweils als Kontrolle (graue Histogramme). (c) Prozentzahl der Nrp1<sup>+</sup> T Zellen innerhalb von CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen der Milz einer C57BL/6 Wildtyp-Maus. (d) Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion durch Nrp1<sup>+</sup> und Nrp1<sup>-</sup> T Zellen nach Stimulation von CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen der Milz aus Wildtyp-Mäusen mit PMA/Ionomycin. Die gezeigten Ergebnisse in (b-d) sind repräsentativ für mindestens 2 unabhängige Experimente.

#### 4.7 Die Stimulation naiver CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC trägt zur Abwehr von Infektionen bei

Wie bisher beschrieben sind LSEC-stimulierte T Zellen in der Lage, im Kontext einer Infektion zu expandieren und in Effektor T Zellen zu differenzieren (Abschnitte 4.3 und 4.4). Deshalb stellte sich die Frage, ob solche Effektor T Zellen auch zur Bekämpfung einer Infektion beitragen. Um dies zu untersuchen, wurde ein experimentelles Infektionsmodell benutzt, in dem die Effektor T Zell-Antwort als Reduktion der *in vivo* Biolumineszenz von Luciferase-exprimierenden Zellen der Leber gemessen werden kann (Stabenow et al., 2010). Nach Infektion von C2J Mäusen mit einem rekombinanten Adenovirus, das ein Fusionsprotein aus Luciferase und OVA exprimiert (AdOVA-LUC), erhielten diese Mäuse einen Tag später entweder LSEC-stimulierte OT-I T Zellen oder reife DC-stimulierte OT-I Zellen in gleicher Zahl. Die Messung der Biolumineszenz über die Zeit ergab, dass Mäuse

durch Erhalt von LSEC-stimulierten T Zellen die Luciferase-Expression innerhalb von 7 Tagen kontrollierten (**Abb. 4.7-1a,b**). Dies ist gleichbedeutend mit einer durch LSEC-stimulierte T Zellen generierten Effektor T Zell-Antwort gegen infizierte Leberzellen (Stabenow et al., 2010). Im Vergleich dazu konnten Mäuse ohne transferierte T Zellen (Kontrolle) die Luciferase-Expression innerhalb von 7 Tagen nicht kontrollieren (**Abb. 4.7-1a,b**). Zu beachten ist, dass der adoptive Transfer von DC-stimulierten OT-I Zellen eine beschleunigte Klärung der Luciferase-Expression zur Folge hatte, vermutlich weil diese T Zellen bereits direkte Effektor T Zellfunktion besitzen.

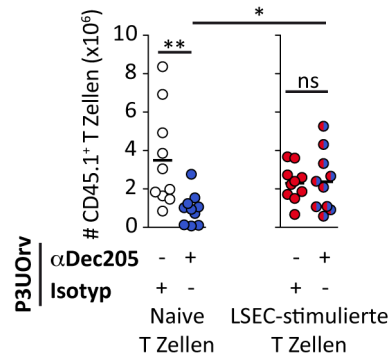
LSEC-stimulierte OT-I T Zellen kontrollierten neben solch einer Infektion mit replikationsunfähigem Adenovirus auch die Infektion mit replikationsfähigen *L.m.*-OVA (**Abb. 4.7-1c**). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass LSEC-stimulierte T Zellen durch die Generierung von Effektor T Zellen zur adaptiven Immunantwort gegen pathogene Infektionen beitragen. Darüber hinaus bedeutet dies, dass die Differenzierung in Effektor T Zellen mit ausreichender Geschwindigkeit abläuft, so dass die dafür verantwortliche Infektion wirksam bekämpft werden kann.



**Abbildung 4.7-1 LSEC-stimulierte T Zellen tragen zur Infektabwehr bei.** LSEC-stimulierte OT-I T Zellen oder reife DC-stimulierte OT-I Zellen wurden adoptiv in C2J Mäuse transferiert, welche einen Tag zuvor mit  $5 \times 10^5$  AdOVA-LUC infiziert worden waren. Tägliche Messungen der *in vivo* Biolumineszenz wurden zur Bestimmung der Effektor CTL Funktion, gerichtet gegen Luciferase-exprimierende Hepatozyten, benutzt. In **(a)** sind repräsentative Bilder der Biolumineszenz für Tag 5 und Tag 7 gezeigt; in **(b)** ist der Verlauf der Biolumineszenz gegen die Zeit ab dem Zeitpunkt der Infektion dargestellt. Für **(c)** wurden OT-I T Zellen *in vitro* mit OVA-beladenen LSEC oder OVA-beladenen reifen DC kultiviert und adoptiv in Wildtyp-Mäuse transferiert, die 2h später mit *L.m.*-OVA ( $5 \times 10^4$  CFU/Maus i.p.) infiziert wurden. Die Auswirkung von  $1 \times 10^6$  transferierten OT-I T Zellen auf die Bakterienlast in der Leber 4 Tage nach Infektion mit *L.m.*-OVA ( $5 \times 10^4$  CFU/Maus) ist abgebildet. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse, die keine T Zellen erhielten. Gezeigte Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels eines zweiseitigen Student's t-Test (\*=  $p < 0.05$ , \*\*=  $p < 0.01$ ).

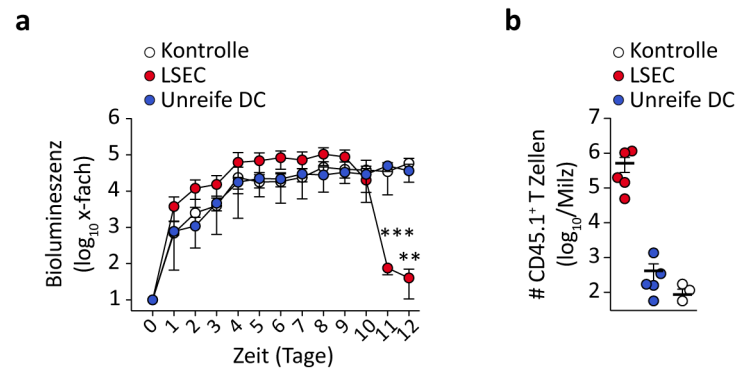
Manche Pathogene besitzen Evasionsstrategien, um der Erkennung durch das angeborene Immunsystem zeitweise zu entgehen und somit keine Inflammation auszulösen. Die Verteilung der Antigene solcher Pathogene ohne Induktion einer systemischen Inflammation, z.B. bei viralen Infektionen (Protzer et al., 2012), birgt das Risiko, dass diese Antigene von unreifen DC an naive pathogen-spezifische T Zellen präsentiert werden. Dies hätte die Deletion dieser pathogen-spezifischen T Zellen zur Folge. Die Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC anstatt durch DC führte in Abwesenheit von Inflammation im Gegensatz dazu jedoch nicht zur Deletion von T Zellen (**Abb. 4.1-1b**). Es stellte sich aber die Frage, ob LSEC-stimulierte T Zellen im Falle einer systemischen Verteilung von Antigen in Abwesenheit von Inflammation nachträglich eliminiert würden, falls sie ihr Antigen zu einem späteren Zeitpunkt erneut auf unreifen DC erkennen. Um dies zu untersuchen, wurde die gleiche Anzahl an LSEC-stimulierten und naiven CD45.1<sup>+</sup> OT-I Zellen in Wildtyp-Mäuse transferiert und danach DEC205:P3UOrv injiziert, um T Zell-Stimulation durch unreife DC auszulösen. Als Kontrolle diente die Injektion mit OVA-gekoppeltem Isotyp-Antikörper (Isotyp:P3UOrv). Wurden naive T Zellen in diesem Versuch durch unreife DC stimuliert, so zeigten diese aufgrund der Deletion eine verringerte Fähigkeit der Expansion nach AdOVA Infektion (**Abb. 4.7-2**; Bonifaz et al., 2002; Kratzer et al., 2010). Im Gegensatz dazu war die Expansion von LSEC-stimulierten T Zellen nach AdOVA-Infektion durch eine vorangegangene Erkennung von OVA auf unreifen DC nicht eingeschränkt.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Stimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC zu einem Schutz der LSEC-stimulierten T Zellen vor Deletion durch andere APC, wie z.B. unreife DC, führt.



**Abbildung 4.7-2 LSEC-stimulierte T Zellen sind resistent gegenüber Deletion durch unreife DC *in vivo*.**  $1 \times 10^5$  CD45.1<sup>+</sup> naive OT-I T Zellen oder LSEC-stimulierte OT-I T Zellen wurden ex vivo adoptiv in kongene CD45.2<sup>+</sup> Mäuse transferiert. Anschließend wurde allen Tieren OVA gebunden an anti-DEC-205 (DEC205:P3UOrv) oder OVA gebunden an die entsprechende Isotyp-Kontrolle (Isotyp-P3UOrv) injiziert. 12 Tage später wurden alle Tiere mit AdOVA ( $5 \times 10^6$  PFU) infiziert und 5 Tage nach Infektion die Anzahl an CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen in der Milz bestimmt. Daten von zwei unabhängigen Versuchen mit insgesamt 10 Tieren pro Gruppe sind dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte durch einen zweiseitigen Student's t-Test (\*=  $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ ).

Abschließend sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Antigenpräsentation durch unreife DC oder LSEC in Abwesenheit von Inflammation auf die anti-virale Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T Zellen hat. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst die gleiche Anzahl von CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen ( $5 \times 10^5$ /Maus) *in vivo* durch LSEC oder DC stimuliert (siehe Abschnitt 3.2.4.10). Anschließend wurde eine identische Anzahl von endogenen CD8<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz dieser Tiere (inklusive der stimulierten CD45.1<sup>+</sup> T Zellen) in AdOVA-LUC-infizierte  $rag2^{-/-}$  Mäuse transferiert. Da  $rag2^{-/-}$  Mäuse weder T Zellen noch B Zellen besitzen, erlaubt solch ein Transfer, auch eine geringe Anzahl an CD45.1<sup>+</sup> T Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Generierung einer Effektor T Zell-Antwort gegen die adenovirale Infektion zu untersuchen (siehe Abschnitt 3.2.4.10).



**Abbildung 4.7-3 Die Präsentation von löslichen Antigenen an naive CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC ermöglicht eine zukünftige Effektor T Zell-Antwort.** CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen wurden nach Stimulation durch LSEC oder unreife DC *in vivo* adoptiv in rag2<sup>-/-</sup> Mäuse, welche zwei Tage zuvor mit AdOVA-LUC infiziert worden waren (siehe 3.2.4.10). Als Kontrolle diente der Transfer von C57BL/6 T Zellen. **(a)** Entwicklung der Biolumineszenz über die Zeit und **(b)** Anzahl der CD45.1<sup>+</sup> T Zellen in der Milz an Tag 13 nach Infektion. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit 3-5 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test durchgeführt (\*\*= p<0.01, \*\*\*= p<0.001).

Die von unreifen DC stimulierten T Zellen waren nicht in der Lage die Luciferase-Expression zu kontrollieren, genauso wie transferierte T Zellen aus C57BL/6 Kontrolltieren (**Abb. 4.7-3a**). Dies war allerdings nicht der Fall, wenn T Zellen ihr Antigen zuvor von LSEC präsentiert worden war: anhand der Reduktion der Biolumineszenz sieht man jedoch, dass diese T Zellen in den infizierten Tieren expandierten (**Abb. 4.7-4b**) und eine Immunantwort gegen infizierte Leberzellen ausführten (**Abb. 4.7-4a**).

Insgesamt liefern diese Daten Hinweise darauf, dass bei einer systemischen Verteilung von Antigenen von Pathogenen auch in Abwesenheit von Inflammation eine spätere antivirale CD8<sup>+</sup> T Zell-Antwort generiert werden kann, unter der Voraussetzung, dass diese Antigene von LSEC und nicht von unreifen DC an CD8<sup>+</sup> T Zellen präsentiert werden.



## 5 Diskussion

Die antigen-spezifische Aktivierung von naiven  $CD8^+$  T Zellen wird maßgeblich durch die Art der antigen-präsentierenden Zellen (APC) und den Kontext der Antigenpräsentation reguliert (Banchereau and Steinman, 1998; Steinman et al., 2003b). Im Allgemeinen wird angenommen, dass sowohl die Entstehung von Effektor T Zellen als auch die Entwicklung von T Zell-Gedächtnis nur dann möglich ist, wenn an die aktivierten T Zellen zusätzlich zu ihrem Antigen auch Kostimulation und inflammatorische Signale vermittelt werden, so z.B. von reifen dendritischen Zellen (DC; Curtsinger and Mescher, 2010; Steinman et al., 2003b). In Abwesenheit solcher zusätzlichen inflammatorischen Signale resultiert die Stimulation von naiven T Zellen in T Zell-Toleranz oder Deletion, insbesondere wenn sie durch unreife DC oder residente APC in Lymphknoten durchgeführt wird (Cohen et al., 2010; Fletcher et al., 2010; Gardner et al., 2008; Kurts et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulation von naiven  $CD8^+$  T Zellen durch organresidente APC der Leber, die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC), näher charakterisiert. Während die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen an naive  $CD8^+$  T Zellen durch DC unter nicht-inflammatorischen Bedingungen erwartungsgemäß zur T Zell-Deletion führte, war dies bei der Antigenpräsentation durch LSEC nicht der Fall. Stattdessen führte die Stimulation von naiven  $CD8^+$  T Zellen durch LSEC innerhalb kurzer Zeit zur Ausbildung eines ruhenden Differenzierungszustandes, durch den sich LSEC-stimulierte T Zellen eindeutig von naiven T Zellen und Effektor T Zellen unterschieden. Zudem besaßen LSEC-stimulierte T Zellen eine eigenständige Gensignatur. Die nähere Analyse dieser Gensignatur und weitere Versuche deckten Ähnlichkeiten von LSEC-stimulierten T Zellen zu zentralen Gedächtnis T Zellen (TCM) auf. So wanderten T Zellen kurz nach ihrer Stimulation durch LSEC in der Leber in lymphatische Organe ein und besaßen das Potential, bei einer Infektion effizient neue Effektor T Zellen zu generieren. Weitere Versuchen demonstrierten, dass LSEC-stimulierte T Zellen durch die Differenzierung in Effektor T Zellen zur Bekämpfung von Infektionen beitragen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen somit einen neuen Mechanismus der T Zell-Stimulation in Abwesenheit von inflammatorischen Bedingungen auf, welcher durch LSEC und nicht durch DC ausgeübt wird. Diese immunologische Funktion von LSEC führt zur

Entwicklung einer neuartigen Population von leber-induzierten Gedächtnis T Zellen und trägt dadurch zur Unterstützung von T Zell-vermittelter Immunität bei.

### **5.1 Die Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC induziert weder T Zell-Deletion noch T Zell-Toleranz**

Die Entstehung von T Zell-Toleranz ist ein wichtiger Mechanismus zum Schutz vor Autoimmunität. Die Elimination selbst-reaktiver T Zellen während der negativen Selektion im Thymus (Gallegos and Bevan, 2006; Klein et al., 2009) wird dabei durch die Antigenpräsentation unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in der Peripherie ergänzt (Kurts et al., 1997; Kurts et al., 2010; Mueller, 2010; Steinman et al., 2003b).

Vor allem unreife oder tolerogene DC sind für die Induktion von peripherer Toleranz von großer Bedeutung: sie präsentieren neben Selbst-Antigenen auch zirkulierende Antigene mittels Kreuzpräsentation an naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001; Steinman et al., 2003b). Unter homöostatischen Bedingungen resultiert dies in T Zell-Deletion oder Inaktivierung der T Zellen (Hawiger et al., 2001; Probst et al., 2005; Redmond and Sherman, 2005; Steinman et al., 2003b). Eine Deletion von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch antigen-präsentierende, unreife DC konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch eigene Versuche bestätigt werden (Bonifaz et al., 2002; Kratzer et al., 2010).

Zusätzlich zu DC in lymphatischen Geweben besitzen auch nicht-professionelle APC die Fähigkeit zur Ausübung peripherer Toleranz. So präsentieren Stromazellen in Lymphknoten konstant Selbst-Antigene zu naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen, was zur Elimination von selbst-reaktiven T Zellen führt (Cohen et al., 2010; Fletcher et al., 2010; Gardner et al., 2008). Gleiches geschieht in der Leber durch Hepatozyten (Bertolino et al., 1998). Hervorzuheben ist, dass sowohl Stromazellen im Lymphknoten als auch Hepatozyten in der Leber ausschließlich Antigene präsentieren, welche von ihnen selbst exprimiert werden. Die Toleranzinduktion gegenüber exogenen, löslichen Antigenen durch Kreuzpräsentation dieser Antigene ist nahezu ausschließlich auf knochenmarksabhängige APC wie DC beschränkt (Kurts et al., 2010; Steinman et al., 2003b).

Allerdings können lösliche, zirkulierende Antigene nicht nur durch DC, sondern auch durch LSEC in der Leber effizient aufgenommen und kreuzpräsentiert werden (Limmer et al., 2000; Schurich et al., 2009; Thomson and Knolle, 2010). Die Aufnahme und



Prozessierung von löslichen Antigenen scheint in LSEC sogar mit höherer Effizienz abzulaufen, sodass sie DC in dieser Hinsicht überlegen sind (Schurich et al., 2009; von Oppen et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde die Kreuzpräsentation löslicher Antigene durch LSEC *in vivo* hinsichtlich der Auswirkungen auf naive CD8<sup>+</sup> T Zellen näher untersucht. Diese Versuche bestätigten eindeutig die Annahme, dass die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen an naive CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC im Gegensatz zu unreifen DC nicht zur Deletion der stimulierten T Zellen führt (Diehl et al., 2008). Dies spiegelte sich auch auf molekularer Ebene wider: Neben der beschriebenen Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Diehl et al., 2008) wiesen LSEC-stimulierte T Zellen auf Ebene der Genexpression nahezu keine Übereinstimmungen zu CD8<sup>+</sup> T Zellen auf, die deletiert werden oder anerg sind (Böttcher et al., 2013, *in press*; Parish et al., 2009). Interessanterweise lieferten weitere Versuche zudem Hinweise darauf, dass CD8<sup>+</sup> T Zellen nach der Stimulation durch LSEC nicht von unreifen DC eliminiert werden können und dementsprechend vor Deletion durch tolerogene APC geschützt sind.

Welche Signale sind für die Induktion des LSEC-stimulierten T Zell-Phänotyps und für das Überleben dieser T Zellen verantwortlich? Die Deletion von naiven T Zellen durch DC wird über die Rezeptoren PD-1 und CTLA-4, welche von T Zellen nach ihrer Aktivierung exprimiert werden, vermittelt (Probst et al., 2005). Auch LSEC exprimieren PD-Ligand-1 (B7-H1) und können so PD-1-Signale an naive T Zellen übermitteln, was deren Differenzierung in Effektor T Zellen verhindert (Diehl et al., 2008). Jedoch wird PD-1 zwar auf CD8<sup>+</sup> T Zellen im Zuge der Stimulation durch LSEC hochreguliert, allerdings nur für relativ kurze Zeit (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigen CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation durch LSEC *in vivo* im Vergleich zu naiven T Zellen keine erhöhte Expression von CTLA-4 (vergleiche Böttcher et al., 2013, *in press*). Auch exprimieren LSEC im Gegensatz zu DC kaum CD80 und CD86, die Liganden für CTLA-4 (Diehl et al., 2008). Somit erscheint sowohl eine verstärkte Interaktion von CTLA-4 auf LSEC-stimulierten T Zellen mit CD80/CD86 auf LSEC oder auf anderen APC eher unwahrscheinlich. Ein weiteres Indiz für eine geringe CTLA-4 Stimulation ist die konstant hohe Expression des Transkriptionsfaktors Eomes in LSEC-stimulierten T Zellen (Böttcher et al., 2013, *in press* und Daten nicht gezeigt), da eine CTLA-4-vermittelte Stimulation von T Zellen zur

Unterdrückung von Eomes führt (Hegel et al., 2009). Somit ist zu vermuten, dass LSEC-stimulierte T Zellen nur relativ schwache Deletionssignale erhalten.

Bei der Deletion von T Zellen durch Apoptose ist zudem zu Bedenken, dass dieser Prozess auf einem Gleichgewicht zwischen Deletionssignalen und Überlebenssignalen beruht (Strasser, 2005; Wojciechowski et al., 2007). Daher ist auch vorstellbar, dass LSEC vermehrt Überlebenssignale zu CD8<sup>+</sup> T Zellen vermitteln, die z.B. die Induktion von anti-apoptotischen Molekülen wie Bcl-2 in LSEC-stimulierten T Zellen zur Folge haben (Diehl et al., 2008). In früheren Studien wurde beschrieben, dass die Antigenpräsentation durch LSEC zu einer initialen Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen führt, einhergehend mit der Produktion von IL-2 und der transienten Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors (CD25; Diehl et al., 2008; Schurich et al., 2010; von Oppen et al., 2009). Solch basale Mengen an IL-2 könnten deshalb ähnlich wie bei Gedächtnis T Zellen einen positiven Effekt auf das Überleben von LSEC-stimulierten T Zellen haben (Castro et al., 2011; Malek and Castro, 2010). Auch ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Eomes - unter anderem durch die Regulation von CD122 und der damit vermittelten Sensitivität gegenüber IL-15 - für die Langlebigkeit von Gedächtnis T Zellen verantwortlich ist (Banerjee et al., 2010; Castro et al., 2011; Intlekofer et al., 2005; Kaech and Cui, 2012). Somit könnte die beschriebene hohe Expression von Eomes in LSEC-stimulierten T Zellen in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein.

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass LSEC-stimulierte T Zellen nach Stimulation in der Leber in lymphatisches Gewebe einwandern und wenige Tage nach der Interaktion mit LSEC in großer Zahl in Lymphknoten und Milz vorhanden sind (siehe Abschnitt 4.2). Für lymphatische Gewebe ist bekannt, dass dort die Zytokine IL-7 und IL-15 das Überleben von naiven T Zellen und Gedächtnis T Zellen unterstützen (Schluns and Lefrancois, 2003; Surh and Sprent, 2008). Denkbar ist folglich, dass LSEC-stimulierte T Zellen aufgrund ihres Migrationsverhaltens ebenfalls auf diese Überlebenssignale treffen. LSEC-stimulierte T Zellen exprimieren außerdem CD127 und CD122, die entsprechenden Rezeptoren für IL-7 und IL-15 (Diehl et al., 2008). Weitergehend konnte in eigenen Versuchen bestätigt werden, dass sich die Inkubation mit IL-7 oder IL-15 *in vitro* positiv auf das Überleben von LSEC-stimulierten T Zellen auswirkt (Böttcher et al., 2013, *in press*). Insgesamt lassen diese Daten darauf schließen, dass LSEC-stimulierte T Zellen nach der Stimulation durch LSEC in der Leber oder kurze Zeit später in

lymphatischen Organen vermehrt Überlebenssignale erhalten und für diese empfänglich sind.

In dieser Arbeit konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob ein bestimmter molekularer Mechanismus dafür ausschlaggebend ist, dass LSEC-stimulierten T Zellen im Vergleich zu unreifen DC-stimulierten T Zellen überleben und nicht deletiert werden. Vorstellbar ist, dass nicht ein einzelner Mechanismus, sondern die Gesamtheit von verschiedenen Überlebens- bzw. Deletionssignalen das Schicksal der stimulierten T Zellen bestimmt (Strasser, 2005; Wojciechowski et al., 2007). Auch die Frage, warum LSEC-stimulierte T Zellen im Gegensatz zu naiven T Zellen nicht für eine DC-vermittelte Deletion empfänglich sind, bleibt ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die LSEC-vermittelte Stimulation naiver CD8<sup>+</sup> T Zellen unterscheidet sich jedoch nicht nur von der Stimulation durch tolerogene, unreife DC, sondern auch zur Aktivierung durch reife DC. So erwerben naive CD8<sup>+</sup> T Zellen kurz nach Stimulation durch LSEC bereits wieder einen ruhenden Phänotyp, der sie nicht zur Ausübung von T Zell-Effektorfunktionen bei Stimulation des TCR befähigt (Böttcher et al., 2013, *in press*; Diehl et al., 2008; Schurich et al., 2010). Damit unterscheiden sich LSEC-stimulierte T Zellen klar von Effektor T Zellen, die durch reife DC generiert wurden. Diese Beobachtung konnte auch durch den Vergleich dieser beiden T Zell-Populationen auf der Genexpressionsebene bestätigt werden. Zudem ergab die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der globalen Genexpression, dass LSEC-stimulierte T Zellen eine charakteristische Gensignatur aufweisen, welche diese nicht nur von naiven T Zellen und Effektor T Zellen, sondern ebenfalls von anderen antigen-erfahrenen T Zell-Populationen unterscheidet. Der auf Genexpressionsebene beobachtete Unterschied zu erschöpften T Zellen wird weitergehend dadurch unterstützt, dass LSEC-stimulierte T Zellen weder TIM-3 noch Blimp-1 und nur wenig PD-1 exprimieren – charakteristische Identifizierungsmarker von erschöpften T Zellen (Wherry, 2011 und Daten nicht gezeigt). Auch exprimieren LSEC-stimulierte T Zellen konstante Mengen an CD8 und können durch Stimulation des TCR in Anwesenheit von IL-2 nicht aktiviert werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der ruhende Zustand von LSEC-stimulierten T Zellen darauf basiert, dass sie anerg (Mescher et al., 2006; Schwartz, 2003) oder durch die kürzlich stattgefundenene Interaktion mit LSEC unempfindlich geworden sind (Xiao et al., 2007). Die Fähigkeit von LSEC-

stimulierten T Zellen, bei geeigneter Stimulation in Effektor T Zellen zu differenzieren, demonstriert außerdem eindeutig, dass dieser ruhende Zustand von LSEC-stimulierten T Zellen nicht endgültig ist. Hier besteht somit ein klarer Unterschied zu anergen, selbstreaktiven CD8<sup>+</sup> T Zellen, deren inaktiver funktionaler Phänotyp durch externe Signale nicht mehr veränderbar ist (Hamilton-Williams et al., 2005; Schietinger et al., 2012).

Zusammenfassend weisen die hier durchgeführten Versuche auf einen bisher unbekanntem Mechanismus der T Zell-Stimulation durch nicht-professionelle APC hin: Eine Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC führt in Abwesenheit von Inflammation weder zu T Zell-Deletion noch zu der Entstehung von Effektor T Zellen, sondern induziert einen eigenständigen, bisher nicht beschriebenen Differenzierungsstatus. Erstaunlicherweise ermöglicht dieser Differenzierungsstatus LSEC-stimulierten T Zellen die Unterstützung von T Zell-Immunität.

## **5.2 LSEC-stimulierte T Zellen besitzen ein hohes Potential zur Differenzierung in Effektor T Zellen**

Welchen Einfluss hat die Interaktion mit LSEC auf das weitere Verhalten der stimulierten CD8<sup>+</sup> T Zellen? In den Versuchen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass LSEC-stimulierte T Zellen zunächst in lymphatisches Gewebe einwandern. Verantwortlich dafür sind voraussichtlich CD62L und chemotaktische Signale über CCR7, die in ähnlicher Weise für die Migration von naiven T Zellen und TCM in lymphatische Gewebe entscheidend sind (Girard et al., 2012). Zudem zeigte die Analyse der Gensignatur von LSEC-stimulierten T Zellen sowie weitere eigene Versuche, dass die Stimulation durch LSEC zu der Herunterregulation von CD103 in T Zellen führt (Böttcher et al., 2013, *in press* und Daten nicht gezeigt), einem Molekül das die periphere Retention von T Zellen vermittelt (Jiang et al., 2012; Mueller et al., 2012; Sheridan and Lefrancois, 2011). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass LSEC-stimulierte T Zellen nicht in der Leber zurückgehalten werden, sondern bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Interaktion mit LSEC aktiv in lymphatische Gewebe einwandern.

Das für LSEC-stimulierte T Zellen beschriebene Migrationsverhalten stellt daher eine unerwartete Gemeinsamkeit mit TCM dar (Girard et al., 2012). Von besonderem Interesse ist, dass LSEC-stimulierten T Zellen der Zugang zu lymphatischen Organen bereits wenige Tage nach der Stimulation mit LSEC möglich ist.

Im Laufe einer Infektion erkennen DC Pathogene und wandern nach Reifung in die T Zell-Zonen lymphatischer Gewebe ein, um dort Antigene an naive T Zellen und TCM zu präsentieren (Harty and Badovinac, 2008; Junt et al., 2008; Kaech and Cui, 2012; Pulendran and Ahmed, 2011; Steinman, 2008). Eine derartige Aktivierung von TCM durch antigen-präsentierende DC führt zur Entstehung von Effektor T Zellen, ein entscheidender Prozess für die schnellen Bekämpfung einer sekundären Infektion (Kaech and Cui, 2012; Lefrancois, 2006). Der Aufenthalt von LSEC-stimulierten T Zellen innerhalb der T Zell-Zonen von lymphatischen Organen könnte ähnlich zu TCM eine Interaktion mit antigen-präsentierenden, reifen DC ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb TCM mit LSEC-stimulierten T Zellen hinsichtlich ihres Verhaltens bei einer Infektion miteinander verglichen. Hier zeigte sich überraschenderweise, dass LSEC-stimulierte T Zellen wie TCM in der Lage waren, in Effektor T Zellen zu differenzieren. Von besonderer Bedeutung ist, dass sich die entstandenen Populationen von Effektor T Zellen in Bezug auf ihren Phänotyp und ihre Funktionalität stark glichen, trotz ihrer unterschiedlichen Herkunft. So war die Größe der aus LSEC-stimulierten T Zellen oder TCM gebildeten Populationen von Effektor T Zellen identisch, außerdem produzierten diese Effektor T Zellen  $IFN\gamma$  und zeigten eine gleichermaßen niedrige Expression von CD62L. Im Gegensatz zu dieser hochgradigen Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen und TCM hatten TEM ein nur sehr gering ausgeprägtes Potential, neue Effektor T Zellen zu generieren (Bouneaud et al., 2005; Roberts et al., 2005; Wherry et al., 2003).

Diese Ergebnisse liefern eindeutige Hinweise darauf, dass das proliferative Potential und die Fähigkeit zur Differenzierung in Effektor T Zellen in TCM und LSEC-stimulierten T Zellen gleichermaßen ausgeprägt ist. Die Ursachen hierfür könnten in den initialen Stimulationsbedingungen der T Zellen begründet liegen und werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

### **5.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Entwicklung von LSEC-stimulierten T Zellen und TCM**

Wie bereits ausführlich beschrieben, sind LSEC-stimulierte T Zellen und TCM in mehreren Aspekten ähnlich. Klar ersichtlich wird dies vor allem an der Fähigkeit von LSEC-stimulierten T Zellen, in Effektor T Zellen zu differenzieren - auch nach einer längeren Phase der Abwesenheit von Antigen. Diese Ähnlichkeit zwischen TCM und LSEC-stimulierten T Zellen ist insofern unerwartet, als dass sich die Herkunft von LSEC-stimulierten T Zellen drastisch von der Herkunft von Effektor und Gedächtnis T Zellen unterscheidet. Bemerkenswerterweise bilden LSEC-stimulierte T Zellen zudem eine homogene T Zell-Population mit einheitlichen Phänotyp, wohingegen die DC-vermittelte Stimulation von naiven T Zellen zur Ausbildung von kurzlebigen Effektor T Zellen, TCM und TEM führt; also zu verschiedenen Differenzierungsstadien (Chang et al., 2007; Jameson and Masopust, 2009; Kaech and Cui, 2012; Stemberger et al., 2007).

Die Entstehung von Effektor T Zellen und langlebigen Gedächtnis T Zellen setzt die Reifung von DC voraus (Mescher et al., 2006; Steinman, 2008; Steinman et al., 2003b), welche in lymphatischen Geweben unter inflammatorischen Bedingungen Antigen an naive CD8<sup>+</sup> T Zellen (kreuz-)präsentieren (Kurts et al., 2010; Zhang and Bevan, 2011). Ohne die Übermittlung von proinflammatorischen Signalen während dieser initialen T Zell-Stimulation entstehen keine funktionalen Gedächtnis T Zellen (Kolumam et al., 2005; Li et al., 2006; Mescher et al., 2006; Williams and Bevan, 2007). LSEC-stimulierte T Zellen entstehen jedoch in der Abwesenheit von Inflammation: Nach Kreuzpräsentation löslicher Antigene durch LSEC in der Leber, einem Organ mit bekanntermaßen tolerogenem Milieu (Crispe, 2009; Diehl et al., 2008; von Oppen et al., 2009).

Wie kommt es also, dass CD8<sup>+</sup> T Zellen unter derartigen Voraussetzungen, die eine Entstehung von Effektor T Zellen und Gedächtnis T Zellen nicht zulassen, bei LSEC-vermittelter Stimulation dennoch eine TCM-ähnliche Plastizität entwickeln, die es ihnen ermöglicht, bei einer Infektion in Effektor T Zellen zu differenzieren ?

Interessanterweise ist auch für die Entwicklung von Gedächtnis T Zellen beschrieben, dass die Einschränkung von proinflammatorischen Signalen zu einer beschleunigten bzw. vermehrten Differenzierung von TCM führt. Dies gilt sowohl für eine artifizielle zeitliche

Verkürzung der Inflammation durch Gabe von Antibiotika bei bakterieller Infektion (Badovinac et al., 2004) als auch für eine abgeschwächte Stimulation von T Zellen (Badovinac et al., 2005; D'Souza and Lefrancois, 2003; Sarkar et al., 2008; Sarkar et al., 2007). Insbesondere das stammzell-ähnliche Potential, bei antigen-spezifischer Stimulation neue Populationen von funktionalen Effektor T Zellen zu formen, ist in gering stimulierten Gedächtnis T Zellen stärker ausgeprägt (Gattinoni et al., 2011; Gattinoni et al., 2009). Im Gegensatz dazu haben die starke Stimulation von T Zellen und proinflammatorische Signale wie IL-2 und IL-12 zur Folge, dass hauptsächlich terminal differenzierte Effektor T Zellen und TEM entstehen - einhergehend mit einem Verlust von funktionalen TCM (Cui et al., 2009; Joshi et al., 2007; Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010).

Die Antigenpräsentation durch LSEC liefert nur wenig Kostimulation für T Zellen (Diehl et al., 2008), auch produzieren LSEC kein proinflammatorisches IL-12, selbst bei Stimulation durch mikrobielle PAMPs (Crispe, 2009; Kern et al., 2009). Des Weiteren wird die TCR-vermittelte Stimulation von T Zellen durch Hochregulation des koinhibitorischen Moleküls B7-H1 auf LSEC aktiv gedämpft bzw. abgeschaltet (Diehl et al., 2008; Lohse et al., 1996). Zusätzlich ist nicht nur die Stärke der Stimulation, sondern auch die Dauer der Antigenpräsentation durch LSEC limitiert: zwar präsentieren LSEC lösliches Antigen mit größerer Effizienz als DC aus der Milz, jedoch mit geringer Halbwertszeit (Schurich et al., 2009). Insgesamt sind somit eindeutige Parallelen bezüglich der Stimulationsbedingungen von naiven T Zellen während der Entwicklung von LSEC-stimulierten T Zellen und der Differenzierung von TCM erkennbar.

Nicht nur eine abgeschwächte Stimulation von naiven T Zellen, sondern auch aktive Schutzmechanismen durch anti-inflammatorische Moleküle fördern die Entwicklung von TCM: so verhindern die Zytokine IL-10 und IL-21 mittels der Aktivierung von STAT3 eine starke CTL-Differenzierung der Vorläufer von Gedächtnis T Zellen und erhalten so ein hohes proliferatives Potential in diesen Zellen, Ähnliches gilt für TGF- $\beta$  (Cui et al., 2011; Foulds et al., 2006; Kaech and Cui, 2012). Dass solche anti-inflammatorischen Signale auch bei der Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen eine Rolle spielen ist denkbar, da sowohl IL-10 als auch TGF- $\beta$  im Mikromilieu der Leber vorhanden sind (Crispe, 2009; Thomson and Knolle, 2010).

Zusammenfassend scheint also die Stimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC unter Voraussetzungen abzulaufen, die zwar nachteilig für die Differenzierung von Effektor T Zellen sind, dafür aber die Entwicklung bzw. den Erhalt von TCM-ähnlichen Eigenschaften begünstigen.

Hierfür lieferten auch weitere Analysen von LSEC-stimulierten T Zellen Hinweise. So fehlt LSEC-stimulierten T Zellen die Expression von T-bet, einem Transkriptionsfaktor der für Effektorfunktionen von T Zellen, aber gleichzeitig auch für ihre terminale Differenzierung verantwortlich ist (Intlekofer et al., 2007; Joshi et al., 2007; Yeo and Fearon, 2011). Da LSEC-stimulierte T Zellen zudem den molekularen Gegenspieler von T-bet, Eomes, exprimieren, könnte diese Dichotomie - ähnlich wie für TCM beschrieben - für den Erhalt der proliferativen Leistungsfähigkeit von LSEC-stimulierten T Zellen und ihre Langlebigkeit verantwortlich sein (Banerjee et al., 2010; Kaech and Cui, 2012; Zhou et al., 2010). In früheren Studien wurde außerdem nachgewiesen, dass der Wnt-β-Catenin Signalweg eine wichtige Rolle für die stammzell-ähnliche Plastizität von Gedächtnis T Zellen hat, einhergehend mit einer geringeren Effektor T Zell-Differenzierung (Gattinoni et al., 2009; Zhao et al., 2010; Zhou et al., 2010). Eigene Versuche lieferten Hinweise darauf, dass die Stimulation durch LSEC ebenfalls diesen Signalweg induziert. So war der für die Ausbildung von TCM entscheidende Transkriptionsfaktor Tcf1, der durch den Wnt-β-Catenin Signalweg induziert wird, in LSEC-stimulierten T Zellen 50-fach höher exprimiert als in reife-DC stimulierten Effektor T Zellen (Böttcher et al., 2013, *in press*). In eigenen Versuchen konnte zudem bestätigt werden, dass LSEC-stimulierte T Zellen ähnlich wie TCM die Moleküle CD27, CD127 und CD122 exprimieren (vergleiche auch Diehl et al., 2008). Im Falle von TCM wird diesen Molekülen eine tragende Rolle für deren Langlebigkeit in Abwesenheit von Antigen zugeschrieben (Allam et al., 2009; Harty and Badovinac, 2008; Hendriks et al., 2000; Kaech et al., 2002a).

Die Interaktion mit LSEC veranlasst also in LSEC-stimulierten T Zellen die Expression vieler Moleküle, die während der Differenzierung von Gedächtnis T Zellen letztendlich für das Überleben von TCM und deren hohe Plastizität entscheidend sind. Eine kurzzeitige Stimulation naiver T Zellen durch LSEC unter nicht-inflammatorischen Bedingungen reicht nicht für die Entwicklung von Effektor T Zellen aus, stellt aber voraussichtlich die



Grundlage der Plastizität des Differenzierungszustandes von LSEC-stimulierten T Zellen dar. LSEC scheinen daher im Gegensatz zu DC die Fähigkeit zu besitzen, auch ohne inflammationsbedingte Reifung antigen-erfahrene CD8<sup>+</sup> T Zellen mit dem hohen Differenzierungspotential von TCM zu erzeugen, anstatt T Zell-Deletion hervorzurufen. Folglich können LSEC-stimulierte T Zellen unter Bedingungen entstehen, die nicht die DC-vermittelte Entwicklung von Gedächtnis T Zellen erlauben.

#### **5.4 Der molekularer Mechanismus der Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen**

LSEC-stimulierte T Zellen besitzen wie in dieser Arbeit gezeigt keine unmittelbaren Effektorfunktionen (Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2000; Schurich et al., 2010). Die Stimulation des TCR von LSEC-stimulierten T Zellen löste weder Proliferation noch die Produktion von IFN $\gamma$  aus, letzteres war nicht einmal bei Stimulation mit PMA/Ionomycin zu beobachten. Eine kombinierte Stimulation aus TCR-Signal, Kostimulation durch CD28 und dem proinflammatorischen Zytokin IL-12 hatte jedoch grundlegende Auswirkungen auf den funktionalen Phänotyp von LSEC-stimulierten T Zellen: zusammen führten diese Signale zu Proliferation, Expansion und Effektor T Zell-Differenzierung. Somit zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse einen bisher unbekanntem Mechanismus der Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen.

Bei der Restimulation von LSEC-stimulierten T Zellen war die Kombination aus TCR-Stimulation mit CD28-vermittelter Kostimulation (CD3/28) für die Proliferation und Expansion dieser T Zellen bereits ausreichend. Zusätzliches IL-12 hatte im Falle der Vermehrung von LSEC-stimulierten T Zellen nur einen vernachlässigbaren Einfluss. Ähnlich wie bei naiven T Zellen hängt die Expansion von LSEC-stimulierten T Zellen im Rahmen der Reaktivierung somit vornehmlich von CD28-Signalen ab (Allison, 1994; Lenschow et al., 1996). Interessanterweise besteht hier dennoch ein merklicher Unterschied zwischen naiven T Zellen und LSEC-stimulierten T Zellen. Die Expansion von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen wird zwar ebenfalls durch CD28-Signale induziert, jedoch ist der Zeitraum bis zum Eintritt in die Proliferation im Vergleich zu LSEC-stimulierten T Zellen länger (van Stipdonk et al., 2001 und Daten nicht gezeigt).

Wie beschrieben reagierten LSEC-stimulierte T Zellen bei einer optimalen Stimulation mit  $\alpha$ CD3/28+IL-12 innerhalb von 20h zusätzlich mit der Produktion von IFN $\gamma$ . Auch hier besteht ein gravierender Unterschied zu naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen: Letztere produzieren vergleichbare Mengen an IFN $\gamma$  zu einem späteren Zeitpunkt als LSEC-stimulierte T Zellen (Daten nicht gezeigt und Agarwal et al., 2009). Diese beiden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zu überkommene Hürde zur Reaktivierung LSEC-stimulierter T Zellen gleichermaßen hoch ist wie die zur Aktivierung naiver T Zellen. Sobald allerdings solch ein Schwellenwert überschritten wird, reagieren LSEC-stimulierte T Zellen zumindest *in vitro* schneller als naive T Zellen. Ob diese Beobachtungen im Kontext einer Infektion von Relevanz sind und dementsprechend LSEC-stimulierte T Zellen *in vivo* schneller in Effektor T Zellen differenzieren als naive T Zellen, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Festzuhalten bleibt, dass die Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen und die Aktivierung von naiven T Zellen auf den gleichen drei Signalen beruht (Agarwal et al., 2009; Curtsinger et al., 1999; Zhang and Bevan, 2011): Der Stimulation des TCR (Signal 1), CD28-vermittelter Kostimulation (Signal 2) und den proinflammatorischen Zytokinen IL-12 bzw. IFN $\alpha$  (Signal 3). Nur eine derartige optimale Stimulation löst die Umprogrammierung von LSEC-stimulierten T Zellen in Effektor T Zellen aus.

Diese Abhängigkeit von ergänzenden stimulatorischen Signalen ist auch in Bezug auf die Entstehung von Autoimmunität von wichtiger Bedeutung. Da LSEC bei der Kreuzpräsentation von löslichen Antigenen nicht zwischen eigenen und fremden Antigenen unterscheiden, ist grundsätzlich eine Stimulation von selbst-reaktiven naiven T Zellen durch LSEC vorstellbar. Nichtsdestotrotz erhöht sich dadurch vermutlich nicht das Risiko der Entstehung von T Zell-vermittelter Autoimmunität, da solche selbst-reaktiven LSEC-stimulierten T Zellen - genauso wie naive T Zellen - für die Differenzierung in Effektor T Zellen zwingend weitere Aktivierungssignale benötigen, die nur unter inflammatorischen Bedingungen bereitgestellt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten eine entscheidende Rolle für das Zytokin IL-12 in der Entstehung von Effektor T Zellen aus LSEC-stimulierten T Zellen nachweisen. So konnten LSEC-stimulierte T Zellen in Abwesenheit von IL-12 nur zu einer

minimalen Produktion von IFN $\gamma$  angeregt werden und erlangten auch nach längerer Stimulation keine Zytotoxizität. Auch im Falle der Effektor T Zell-Differenzierung von naiven T Zellen kommt dem proinflammatorischen Zytokin IL-12 eine entscheidende Bedeutung zu. Diese Differenzierung wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor T-bet gesteuert, dessen Expression in naiven T Zellen zunächst durch den TCR-Signalweg induziert wird (Szabo et al., 2000). Jedoch ist eine IL-12-vermittelte Aufrechterhaltung der T-bet Expression unbedingt notwendig, um die vollständige Differenzierung von Effektor T Zellen zu gewährleisten (Cruz-Guilloty et al., 2009; Curtsinger et al., 2003b; Joshi et al., 2007; Rao et al., 2010). Auch in LSEC-stimulierten T Zellen hatte die  $\alpha$ CD3/28+IL-12 Stimulation eine verstärkte Hochregulation von T-bet zur Folge, einhergehend mit der Herunterregulation eines zweiten Transkriptionsfaktors, Eomes. Diese gegensätzliche Regulation der beiden T-box Transkriptionsfaktoren spricht für eine komplette Umprogrammierung von LSEC-stimulierten T Zellen zu Effektor T Zellen (Joshi et al., 2007; Takemoto et al., 2006).

Im Falle der Effektor T Zell-Differenzierung von naiven T Zellen übt IL-12 seine Rolle hauptsächlich durch STAT4-vermittelte Signale aus (Li et al., 2006; Rao et al., 2012; Zhu et al., 2012). Neben IL-12 ist eine derartige Aktivierung von STAT4 auch für Typ I Interferone wie IFN $\alpha$  beschrieben (Nguyen et al., 2002; Wiesel et al., 2011b). In der Tat war IFN $\alpha$  ebenfalls in der Lage, die Produktion von IFN $\gamma$  in LSEC-stimulierten T Zellen hervorzurufen. Somit scheint für die Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen in Effektor T Zellen eine gewisse Redundanz für proinflammatorische Zytokine als Signal 3 zu bestehen (Agarwal et al., 2009).

Wie in dieser Arbeit gezeigt waren LSEC-stimulierte T Zellen auch *in vivo* in der Lage, bei erneutem Kontakt mit ihrem Antigen im Kontext einer Infektion in Effektor T Zellen zu differenzieren – dieser Vorgang ermöglichte eine beschleunigte Bekämpfung derselben Infektion. Somit lag die Vermutung nahe, dass für diesen Prozess derselbe molekulare Mechanismus verantwortlich ist, der *in vitro* für die Effektor T Zell-Differenzierung von LSEC-stimulierten T Zellen ausreichend war. Allerdings bestand die Möglichkeit, dass die *in vivo* beobachtete Entstehung von Effektor T Zellen auf einem anderen Mechanismus basierte.

Um deshalb die Relevanz von IL-12 und CD28 für eine solche Differenzierung *in vivo* zu testen, wurden LSEC-stimulierte T Zellen in *il12p35<sup>-/-</sup>* oder *cd80/86<sup>-/-</sup>* Knockout-Mäuse transferiert. Bei anschließender Infektion mit antigen-exprimierendem Adenovirus oder antigen-exprimierenden *L. monocytogenes* (siehe Böttcher et al., 2013, *in press*) zeigte sich, dass in beiden Fällen ein Fehlen von CD28-Signalen (in *cd80/86<sup>-/-</sup>* Knockout-Mäusen) keine Entstehung von Effektor T Zellen erlaubte. In Abwesenheit von IL-12 (in *il12p35<sup>-/-</sup>* Knockout-Mäusen) war eine Population von - aus LSEC-stimulierten T Zellen entstandenen - Effektor T Zellen zwar detektierbar, jedoch stark reduziert (siehe Böttcher et al., 2013, *in press*).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass im Kontext der untersuchten Infektionen die Entstehung von Effektor T Zellen aus LSEC-stimulierten T Zellen *in vivo* von den gleichen Signalen abhängt, die für eine derartige Differenzierung *in vitro* ausreichend sind. Allerdings scheint IL-12 *in vivo* teilweise von einem anderen Signal ersetzt werden zu können, möglicherweise ähnlich wie *in vitro* durch Typ I Interferon, z.B. IFN $\alpha$ . Auch ist vorstellbar, dass andere proinflammatorische Signale an der Reaktivierung von LSEC-stimulierten T Zellen beteiligt sind. Dies mag im Kontext von Infektionen zusätzlich von dem jeweiligen Pathogen abhängen.

Für eine Reihe von Infektionen ist beschrieben, dass IL-12 oder Typ I IFN eine wichtige Rolle in der Aktivierung naiver T Zellen spielen (Curtsinger and Mescher, 2010; Keppler and Aichele, 2011; Keppler et al., 2009). Im Allgemeinen wird angenommen, dass diese Zytokine von professionellen APC wie reifen DC produziert werden, auch wenn insbesondere für IFN $\alpha$  weitere Quellen wie Makrophagen und infizierte Körperzellen in Frage kommen (Cui et al., 2009; Curtsinger and Mescher, 2010; Honke et al., 2012; Trinchieri, 2003). Die Reifung von DC führt außerdem zur Expression der CD28-Liganden CD80 und CD86 und veranlasst die Migration von DC in die T Zell-Zonen lymphatischer Organe (Banchereau and Steinman, 1998; Trinchieri, 2003). Da LSEC-stimulierte T Zellen in lymphatischen Organen sitzen, ist es wahrscheinlich, dass sie bei einer Infektion mit reifen DC interagieren, und somit alle drei Signale bereitgestellt werden, die für eine Differenzierung in Effektor T Zellen nötig sind. In der Tat konnten eigene Versuche belegen, dass reife DC *in vitro* fähig sind, LSEC-stimulierte T Zellen zu aktivieren (vergleiche auch Böttcher et al., 2013, *in press*). Allerdings ist für die Stimulation von LSEC-stimulierten T Zellen *in vivo* ebenfalls vorstellbar, dass die antigen-spezifische

Stimulation von reifen DC vermittelt wird, proinflammatorische Zytokine wie IL-12 oder Typ I IFN aber von anderen Zellen wie Makrophagen stammen („Bystander“ Aktivierung; Cui et al., 2009; Honke et al., 2012; Zhang and Bevan, 2011).

Auch TCM halten sich vorwiegend in lymphatischen Organen auf. Im Gegensatz zu ihrer Entstehung benötigt die Aktivierung von bereits existierenden Gedächtnis T Zellen jedoch nur das TCR-vermittelte Signal. Kostimulation, insbesondere lösliche Mediatoren wie z.B. IL-12, sind hier von keiner großen Bedeutung (Curtsinger et al., 1998; Hamilton and Jameson, 2012; Schmidt and Mescher, 2002). Auch in eigenen Versuchen konnte diese Unabhängigkeit von Kostimulation für die Ausübung von Effektorfunktionen durch Gedächtnis T Zellen belegt werden. Die Stimulation von TCM und TEM *ex vivo* durch Peptid oder PMA/Ionomycin führte zur unmittelbaren Produktion großer Mengen IFN $\gamma$ , zudem waren TCM und TEM *per se* zytotoxisch. Somit reicht das TCR-vermittelte Signal aus, um direkte Effektorfunktionen in Gedächtnis T Zellen auszulösen, hier besteht nachweislich ein großer Unterschied zu LSEC-stimulierten T Zellen (Böttcher et al., 2013, *in press*).

Überraschenderweise war eine derart gesteigerte Sensitivität von Gedächtnis T Zellen jedoch nicht bei der Generierung von neuen Effektor T Zellen *in vivo* auszumachen: Hier war für die Expansion und Entstehung von Populationen neuer Effektor T Zellen durch TCM wie für LSEC-stimulierte T Zellen eine kombinierte Stimulation durch  $\alpha$ CD3/28+IL-12 nötig. Somit scheinen CD28-Signale, die vermutlich den Eintritt in den Zellzyklus und die Produktion von IL-2 auslösen (Borowski et al., 2007; Fuse et al., 2008), für TCM und LSEC-stimulierten T Zellen eine gleichermaßen wichtige Rolle zu spielen. Ausserdem zeigte sich für beiden T Zell-Populationen eine stark verringerte Effektor T Zell-Entstehung in *il12p35<sup>-/-</sup>* Knockout-Mäusen nach adenoviraler Infektion.

Somit kommt inflammatorischen Signalen bei der Entwicklung großer Mengen von funktionalen Effektor T Zellen und der damit verbundenen Bekämpfung einer Infektion eine enorme Bedeutung zu, die für TCM und LSEC-stimulierte T Zellen gleichermaßen gegeben ist.

## 5.5 Die Rolle von LSEC-stimulierten T Zellen in der Immunabwehr gegen Pathogene

In Bezug auf lösliche Antigene besitzen LSEC wie in den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen eine einzigartige Funktion: Sie sind im Gegensatz zu unreifen DC in der Lage, auch unter nicht-inflammatorischen Bedingungen antigen-spezifische T Zellen zu stimulieren, ohne deren Zelltod auszulösen. Aus einem anderem Blickwinkel betrachtet bedeutet dies, dass die Möglichkeit einer T Zell-vermittelten, adaptiven Immunantwort gegen zuvor zirkulierende Antigene nur dann besteht, wenn zuvor LSEC dieses Antigen an naive T Zellen präsentiert haben. In welchen Situationen könnte diese Fähigkeit von LSEC von Relevanz sein?

Ungeklärt ist bisher, wie adaptive Immunantworten initiiert werden können, wenn zuvor mikrobielle Antigene systemisch verteilt werden, ohne Inflammation und die Reifung von professionellen APC auszulösen. Dies gilt z.B. für Oberflächenproteine oder Strukturproteine von Viren, die sich der Erkennung des angeborenen Immunsystems entziehen (Crispe, 2009; Protzer et al., 2012; Rehermann and Nascimbeni, 2005). Eine ausschließliche Präsentation dieser Antigene durch unreife DC hätte die Deletion der pathogen-spezifischen T Zellen zur Folge, eine nachfolgende T Zell-Antwort gegen solche Antigene wäre in diesem Fall kaum vorstellbar. Im Gegensatz dazu haben LSEC wie gezeigt die Fähigkeit, naive T Zellen vor Deletion zu schützen und zudem einen plastischen Differenzierungszustand in T Zellen zu induzieren, der eine spätere Effektor T Zell-Differenzierung ermöglicht. Somit lässt sich spekulieren, dass die Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen in der Leber durch LSEC den Verlust von pathogen-spezifischen T Zellen auch in solchen Situationen verhindert, die es professionellen APC nicht erlauben, das Überleben dieser T Zellen zu gewährleisten.

Solch ein Vorgang könnte besonders für hepatotrope Infektionen eine Rolle spielen, bei denen Pathogene der Erkennung des angeborenen Immunsystems in der frühen Phase der Infektion umgehen (Protzer et al., 2012; Rehermann and Nascimbeni, 2005). Für virale Infektionen der Leber trifft dies sowohl auf Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV) zu: So führt die Erkennung von HBV durch Kupferzellen nicht zu einer Typ I Interferon Antwort, sondern unter anderem zur IL-10-

Produktion (Dunn et al., 2009; Hosel et al., 2009). Auch HCV ist in ähnlicher Weise in der Lage, der Erkennung durch Zellen des angeborenen Immunsystems zu entgehen bzw. eine inflammatorische Antwort dieser Zellen aktiv zu unterbinden (Ke and Chen, 2011). Zeitgleich befinden sich Antigene dieser Viren aber in der Zirkulation, die Gefahr der Deletion von naiven pathogen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen durch unreife DC sowie durch antigen-exprimierende Hepatozyten ist also gegeben (Bertolino et al., 1998; Protzer et al., 2012; Rehermann and Nascimbeni, 2005; Steinman et al., 2003b).

Auch andere Mechanismen tragen zur Immunevasion von leber-spezifischen Pathogenen bei: So umgehen die Sporozysten der Malariaerreger, *Plasmodium spp.*, die direkte Erkennung durch Kupfferzellen und entziehen sich zudem durch eine schnelle Infektion von Hepatozyten der weiteren Erkennung durch professionelle APC (Protzer et al., 2012). Zusätzlich ist bei Immunantworten in der Leber zu bedenken, dass die lokalen APC durch die Blutzufuhr aus dem Darmtrakt konstant PRR-Liganden ausgesetzt sind (Crispe, 2009; Thomson and Knolle, 2010). Dies resultiert in einer aktiven Toleranz von APC gegenüber solcher ansonsten aktivierenden Liganden, ein wichtiger Mechanismus zum Schutz vor chronischer Inflammation. Allerdings erschwert dieser Mechanismus die Reifung von professionellen APC in der Leber bei Kontakt zu hepatotropen Pathogenen (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Protzer et al., 2012; Thomson and Knolle, 2010).

Speziell für die beschriebenen hepatotropen Pathogene liegen somit Bedingungen vor, in denen mikrobielle Antigene lokal und systemisch vorhanden sind, aber die Entstehung von Effektor T Zellen durch die Abwesenheit von Inflammation nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich ist.

Auch Antigene von Mikroorganismen, welche sich in anderen Organen befinden, gelangen über die Blutzirkulation in die Leber und können dort von LSEC aufgenommen und kreuzpräsentiert werden. Im Speziellen gilt dies für Antigene von Bakterien, die den Darm kolonisieren (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Crispe, 2009; Hooper and Macpherson, 2010; Knolle and Gerken, 2000). Hierbei ist zu erwähnen, dass der Großteil der Darmbakterien nicht von schädlicher, sondern vorteilhafter Wirkung für den Organismus ist. Diese Symbiose spielt unter anderem eine wichtige Rolle in Stoffwechsel und Verdauung (Knolle and Gerken, 2000; Lee and Mazmanian; Mazmanian et al., 2005). Immunreaktionen gegen die kommensalen Bakterien der Darmflora müssen daher streng

kontrolliert werden, um chronische Inflammation zu verhindern (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Crispe, 2009; Hooper and Macpherson, 2010; Knolle and Gerken, 2000). Andererseits befinden sich im Darm neben kommensalen Bakterien auch Pathogene sowie potenziell gefährliche Symbionten, sogenannte Pathobionten (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Lee and Mazmanian). Folglich besteht die Gefahr, dass eine Veränderung des Gleichgewichtes der Darmflora zur Vermehrung von Pathobionten oder der Ausbreitung pathogener Mikroorganismen führt, die eventuell die Barrieren des Darmsystems überwinden und systemische Infektionen auslösen (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Hooper and Macpherson, 2010).

Um im Falle einer solchen Translokation von Bakterien für eine adaptive Immunantwort gewappnet zu sein, wäre eine vorherige Deletion von pathogen-spezifischen T Zellen, z.B. durch unreife DC, fatal. In der Tat kommt es trotz der erwähnten Verteilung löslicher Antigene von Darmbakterien zu einer schnellen T Zell-Antwort, sobald Pathogene die Barrieren der Haut oder des Darms überwinden (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Duerkop et al., 2009). Das adaptive Immunsystem ist also in der Lage, in solchen Situationen flexibel zu reagieren, was gegen eine vorherige Deletion von pathogen-spezifischen T Zellen spricht (Duerkop et al., 2009; Lee and Mazmanian; Slack et al., 2009). Somit ist gut vorstellbar, dass auch LSEC-stimulierte CD8<sup>+</sup> T Zellen - nachdem sie vorher durch die Zufuhr von antigen-reichem Blut aus dem Darmtrakt in die Leber und anschließender Kreuzpräsentation dieser Antigene durch LSEC entstanden sind - zur Kontrolle solch translozierender Bakterien über die Differenzierung zu Effektor T Zellen beitragen.

Man kann sich LSEC-stimulierte T Zellen also als eine schnell mobilisierbare Quelle für Effektor T Zellen vorstellen, die zusätzlich zu TCM existiert. Dies mag insbesondere für diejenigen Pathogene relevant sein, die entweder harmlos sind und nur unter bestimmten Bedingungen eine Infektion auslösen, oder gewöhnlich der Erkennung durch das angeborene Immunsystem entgehen. Die Stimulation von pathogen-spezifischen naiven T Zellen durch LSEC würde in diesem Modell eine Anpassung des T Zell-Repertoires an im Organismus präsente Antigene bedeuten, die eine flexible T Zell-Antwort im Falle von Infektionen gewährleistet. Es bedarf weiterer Untersuchungen, ob in den beschriebenen Situationen tatsächlich LSEC-stimulierte T Zellen entstehen und wie



groß der Beitrag dieser T Zell-Populationen schlussendlich bei der Infektionsbekämpfung ist.

## 5.6 Neuropilin-1 als Marker für LSEC-stimulierte T Zellen

LSEC kommen *in vivo* kontinuierlich mit zirkulierenden Antigenen in Kontakt, nehmen diese auf und präsentieren sie zu CD8<sup>+</sup> T Zellen (Crispe, 2009; Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010). Infolgedessen müsste unter homöostatischen Bedingungen konstant eine gewisse Anzahl LSEC-stimulierter T Zellen im T Zell-Repertoire vorhanden sein. Jedoch ist nicht bekannt, ob und in welchem Ausmaß LSEC-vermittelte Kreuzpräsentation die Zusammensetzung des endogenen T Zell-Repertoires beeinflusst.

Die Suche nach Oberflächenmolekülen, die in der Lage sind, LSEC-stimulierte T Zellen zu identifizieren und insbesondere von TCM zu unterscheiden (siehe Abschnitt 4.6), ergab, dass dies mittels Neuropilin-1 (Nrp1) möglich ist. Bei der anschließenden Untersuchung des endogenen T Zell-Repertoires von Mäusen zeigte sich, dass Nrp1<sup>+</sup> T Zellen mit einer Frequenz von 3-5% einen substantiellen Anteil der antigen-erfahrenen CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen ausmachen. Im Gegensatz zu Nrp1<sup>-</sup> T Zellen waren Nrp1<sup>+</sup> T Zellen zudem nicht in der Lage, bei Stimulation mit PMA/Ionomycin das Zytokin IFN $\gamma$  zu produzieren. Somit stimmten Nrp1<sup>+</sup> T Zellen mit LSEC-stimulierten T Zellen funktional überein. Insgesamt liefern diese Ergebnisse Hinweise dafür, dass Nrp1 tatsächlich zur Identifizierung von LSEC-stimulierten T Zellen benutzt werden kann. Jedoch muss die genaue Übereinstimmung des Phänotyps von LSEC-stimulierten T Zellen und Nrp1<sup>+</sup> T Zellen noch in weiteren Versuchen validiert werden.

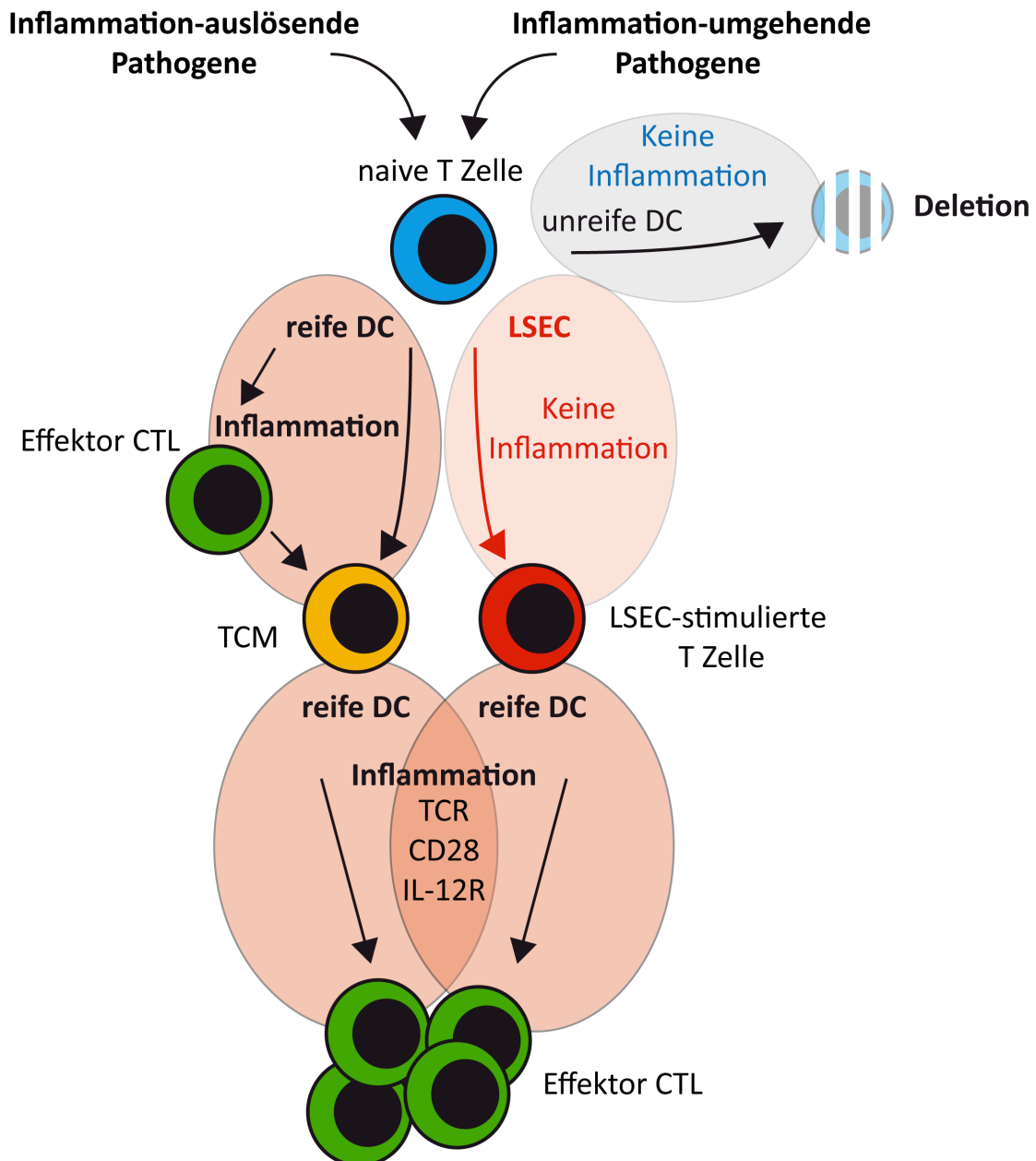
Es ist beschrieben, dass Nrp1 auch auf kürzlich aktivierten T Zellen exprimiert ist (Kaech et al., 2002a), jedoch können solche Effektor T Zellen unter anderem aufgrund ihrer niedrigen CD62L-Expression von CD62L<sup>+</sup> LSEC-stimulierten T Zellen klar unterschieden werden. Des Weiteren wird Nrp1 auch von NKT Zellen (Milpied et al., 2011) und regulatorischen CD4<sup>+</sup> T Zellen (T<sub>REG</sub>) exprimiert (Bruder et al., 2004; Sarris et al., 2008), in letztgenannten dient die Expression von Nrp1 der Unterscheidung zwischen natürlichen T<sub>REG</sub> und induzierten T<sub>REG</sub> (Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). Die genaue Funktion von Nrp1 in T Zellen ist nicht eindeutig geklärt, jedoch ist beschrieben, dass Nrp1 mittels homotypischer Interaktion Zell-Zell-Kontakt vermitteln kann oder Hedgehog-Signale

positiv verstärkt (Bruder et al., 2004; Hillman et al., 2011). Interessanterweise reduzieren Hedgehog-Signale die TCR-vermittelte Stimulation von T Zellen und führen so zu einer geringeren T Zell-Aktivierung (Crompton et al., 2007). Es ist jedoch nicht klar, inwiefern Nrp1 für die Entwicklung von LSEC-stimulierten T Zellen eine Rolle spielt, so z.B. über die Modulation von Hedgehog-Signalen. Auch bleibt die Frage offen, ob die in dieser Arbeit beschriebene Population an Nrp1<sup>+</sup> T Zellen in normalen Mäusen stabil ist, oder Nrp1 nur zeitweise auf LSEC-stimulierten T Zellen exprimiert wird. Zwar exprimieren LSEC-stimulierte T Zellen in der Milz Nrp1, somit auch noch nach Verlassen der Leber. Für T<sub>REG</sub> wurde allerdings kürzlich beschrieben, dass die Nrp1 Expression durch Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-6 beeinflusst werden kann, auch wenn sie unter homöostatischen Bedingungen stabil ist (Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). Wie sich Nrp1 auf LSEC-stimulierten T Zellen bei einer erneuten TCR-Stimulation verhält, gegebenenfalls während einer Infektion, ist ebenfalls ungewiss.

Trotz dieser nicht geklärten Fragen in Bezug auf Nrp1 deuten die hier dargestellten Daten darauf hin, dass die Expression von Nrp1 LSEC-stimulierte T Zellen innerhalb von antigen-erfahrenen CD8<sup>+</sup> T Zellen identifiziert. Demzufolge haben LSEC unter homöostatischen Bedingungen einen maßgeblichen Anteil an der Anpassung des T Zell-Repertoires an lösliche Antigene, welche die Leber über die Zirkulation erreichen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine bisher unbekannt immunologische Funktion der Leber schließen, die durch organresidente APC ausgeübt wird (vergleiche auch Böttcher et al., 2013, *in press*). Durch die Kreuzpräsentation von zirkulierenden Antigenen durch LSEC werden antigen-spezifische naive CD8<sup>+</sup> T Zellen am Leben erhalten und differenzieren in kurzer Zeit in eine neue Form von Gedächtnis T Zellen. Obwohl diese LSEC-stimulierten T Zellen im Gegensatz zu klassischen Gedächtnis T Zellen keine unmittelbaren Effektorfunktionen besitzen, sind sie nicht wie bisher vermutet gegenüber erneutem Kontakt mit ihrem Antigen tolerant, sondern befinden sich in einem ruhenden Entwicklungszustand (Diehl et al., 2008; Hamilton-Williams et al., 2005; Schietinger et al., 2012; Schurich et al., 2010). Im Gegensatz zu toleranten T Zellen ermöglicht dieser besondere Entwicklungszustand LSEC-stimulierten T Zellen, bei erneuter antigen-spezifischer Stimulation unter inflammatorischen Bedingungen schnell

in neue Effektor T Zellen zu differenzieren und dadurch zur T Zell-vermittelten Immunität beizutragen (**Abb. 5.6-1**; Hamilton-Williams et al., 2005; Schietinger et al., 2012). Insofern stellen LSEC-stimulierte CD8<sup>+</sup> T Zellen eine neue Form von leber-induzierten Gedächtnis T Zellen („Liver-primed T cells“) dar, deren Differenzierung die konventionelle Entwicklung von Effektor und Gedächtnis T Zellen ergänzt (vergleiche auch Böttcher et al., 2013, *in press*).



**Abbildung 5.6-1** Schematische Darstellung der Entstehung von LSEC-stimulierten T Zellen und ihrer Bedeutung für die adaptive Immunantwort. Modifiziert nach Böttcher et al., 2013, *in press*.

Herauszustellen ist, dass der LSEC-vermittelte Selektionsprozess von naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen für die Entwicklung in leber-induzierte Gedächtnis T Zellen unter Bedingungen abläuft, die eine klassische Entstehung von CD8<sup>+</sup> Effektor und Gedächtnis T Zellen durch antigen-präsentierende DC nicht erlauben (siehe Abschnitte 5.3 und 5.5). Daher lässt sich vermuten, dass die Entstehung von leber-induzierten Gedächtnis T Zellen auch dann stattfindet, wenn die klassische Erkennung des Immunsystems umgangen wird, wie z.B. bei der systemischen Verteilung von Tumorantigenen oder viralen Antigenen im Kontext von chronischen, hepatotropen Infektionen (Hochst et al., 2012; Protzer et al., 2012; Rehermann and Nascimbeni, 2005). Der in dieser Arbeit dargestellte molekulare Mechanismus der Reaktivierung von leber-induzierten Gedächtnis T Zellen könnte daher bei der Bekämpfung solcher Erkrankungen von therapeutischem Nutzen sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Agarwal, P., Raghavan, A., Nandiwada, S.L., Curtsinger, J.M., Bohjanen, P.R., Mueller, D.L., and Mescher, M.F. (2009). Gene Regulation and Chromatin Remodeling by IL-12 and Type I IFN in Programming for CD8 T Cell Effector Function and Memory. *The Journal of Immunology* *183*, 1695-1704.

Ahmed, R., Bevan, M.J., Reiner, S.L., and Fearon, D.T. (2009). The precursors of memory: models and controversies. *Nat Rev Immunol* *9*, 662-668.

Allam, A., Conze, D.B., Giardino Torchia, M.L., Munitic, I., Yagita, H., Sowell, R.T., Marzo, A.L., and Ashwell, J.D. (2009). The CD8+ memory T-cell state of readiness is actively maintained and reversible. *Blood* *114*, 2121-2130.

Allison, J.P. (1994). CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* *6*, 414-419.

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Chen, Z., Berzins, S.P., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* *23*, 227-239.

Angelosanto, J.M., and Wherry, E.J. (2010). Transcription factor regulation of CD8+ T-cell memory and exhaustion. *Immunol Rev* *236*, 167-175.

Arens, R., and Schoenberger, S.P. (2010). Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol Rev* *235*, 190-205.

Badovinac, V.P., Messingham, K.A., Jabbari, A., Haring, J.S., and Harty, J.T. (2005). Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* *11*, 748-756.

Badovinac, V.P., Porter, B.B., and Harty, J.T. (2004). CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature immunology* *5*, 809-817.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *18*, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.

Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *Journal of immunology* *185*, 4988-4992.

Bannard, O., Kraman, M., and Fearon, D. (2009a). Pathways of memory CD8+ T-cell development. *Eur J Immunol* *39*, 2083-2087.

Bannard, O., Kraman, M., and Fearon, D.T. (2009b). Secondary replicative function of CD8+ T cells that had developed an effector phenotype. *Science* *323*, 505-509.

Barbier, L., Tay, S.S., McGuffog, C., Triccas, J.A., McCaughan, G.W., Bowen, D.G., and Bertolino, P. (2012). Two lymph nodes draining the mouse liver are the preferential site of DC migration and T cell activation. *J Hepatol*, 1-31.

Bertolino, P., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Fazekas de St Groth, B. (2001). Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *Journal of immunology* *166*, 5430-5438.

Bertolino, P., Trescol-Biemont, M.C., and Roubardin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* *28*, 221-236.

Bevan, M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of experimental medicine* **143**, 1283-1288.

Biswas, S.K., and Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology* **30**, 475-487.

Bluestone, J.A., Mackay, C.R., O'Shea, J.J., and Stockinger, B. (2009). The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* **9**, 811-816.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627-1638.

Borowski, A.B., Boesteanu, A.C., Mueller, Y.M., Carafides, C., Topham, D.J., Altman, J.D., Jennings, S.R., and Katsikis, P.D. (2007). Memory CD8<sup>+</sup> T cells require CD28 costimulation. *Journal of immunology* **179**, 6494-6503.

Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (1997). B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **6**, 303-313.

Böttcher, J.P., Knolle, P.A., and Stabenow, D. (2011). Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver. *Dig Dis* **29**, 384-390.

Böttcher J.P., Schanz O., Wohlleber D., Abdullah Z., Debey-Pascher S., Staratschek-Jox A., Höchst B., Hegenbarth S., Grell J., Limmer A., Atreya I., Neurath M.F., Busch D.H., Schmitt E., van Endert P., Kolanus W., Kurts C., Schultze J.L., Diehl L., and Knolle P.A. (2013). Liver-primed memory T cells generated under non-inflammatory conditions provide anti-infectious immunity. *Cell Reports*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.008>, *in press*.

Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *J Exp Med* **201**, 579-590.

Braet, F., and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* **1**, 1.

Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A.M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J., and Hansen, W. (2004). Frontline: Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* **34**, 623-630.

Castro, I., Yu, A., Dee, M.J., and Malek, T.R. (2011). The Basis of Distinctive IL-2- and IL-15-Dependent Signaling: Weak CD122-Dependent Signaling Favors CD8<sup>+</sup> T Central-Memory Cell Survival but Not T Effector-Memory Cell Development. *Journal of immunology* **187**, 5170-5182.

Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* **10**, 735-744.

Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., *et al.* (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**, 1687-1691.

Clarke, S.R., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunology and cell biology* **78**, 110-117.

- Cohen, J.N., Guidi, C.J., Tewalt, E.F., Qiao, H., Rouhani, S.J., Ruddell, A., Farr, A.G., Tung, K.S., and Engelhard, V.H. (2010). Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med* 207, 681-688.
- Cousens, L.P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J.D., Ahmed, R., and Biron, C.A. (1999). Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *The Journal of experimental medicine* 189, 1315-1328.
- Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27, 147-163.
- Croft, M. (1994). Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol* 6, 431-437.
- Croft, M., Bradley, L.M., and Swain, S.L. (1994). Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 152, 2675-2685.
- Crompton, T., Outram, S.V., and Hager-Theodorides, A.L. (2007). Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. *Nat Rev Immunol* 7, 726-735.
- Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y., and Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* 206, 51-59.
- Cui, W., Joshi, N.S., Jiang, A., and Kaech, S.M. (2009). Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* 27, 2177-2187.
- Cui, W., and Kaech, S.M. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* 236, 151-166.
- Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J., and Kaech, S.M. (2011). An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells. *Immunity* 35, 792-805.
- Curtsinger, J.M., Johnson, C.M., and Mescher, M.F. (2003a). CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* 171, 5165-5171.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (1998). CD8+ memory T cells (CD44<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>+</sup>) are more sensitive than naive cells to (CD44<sup>low</sup>, Ly-6C<sup>-</sup>) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *J Immunol* 160, 3236-3243.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003b). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197, 1141-1151.
- Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol*.
- Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K., and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162, 3256-3262.
- Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., and Mescher, M.F. (2005). Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174, 4465-4469.

- D'Souza, A.D., Parish, I.A., McKay, S.E., Kaech, S.M., and Shadel, G.S. (2011). Aberrant CD8+ T-cell responses and memory differentiation upon viral infection of an ataxia-telangiectasia mouse model driven by hyper-activated Akt and mTORC1 signaling. *The American journal of pathology* *178*, 2740-2751.
- D'Souza, W.N., and Lefrancois, L. (2003). IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* *171*, 5727-5735.
- Davey, G.M., Kurts, C., Miller, J.F., Bouillet, P., Strasser, A., Brooks, A.G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* *196*, 947-955.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* *334*, 395-402.
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., and Knolle, P.A. (2008). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology* *47*, 296-305.
- Duerkop, B.A., Vaishnava, S., and Hooper, L.V. (2009). Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Gastroenterology* *31*, 368-376.
- Dunn, C., Peppas, D., Khanna, P., Nebbia, G., Jones, M., Brendish, N., Lascar, R.M., Brown, D., Gilson, R.J., Tedder, R.J., *et al.* (2009). Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* *137*, 1289-1300.
- Elvevold, K., Simon-Santamaria, J., Hasvold, H., McCourt, P., Smedsrod, B., and Sorensen, K.K. (2008). Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity. *Hepatology* *48*, 2007-2015.
- Elvevold, K.H., Nedredal, G.I., Revhaug, A., and Smedsrod, B. (2004). Scavenger properties of cultivated pig liver endothelial cells. *Comp Hepatol* *3*, 4.
- Fletcher, A.L., Lukacs-Kornek, V., Reynoso, E.D., Pinner, S.E., Bellemare-Pelletier, A., Curry, M.S., Collier, A.R., Boyd, R.L., and Turley, S.J. (2010). Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med* *207*, 689-697.
- Foulds, K.E., Rotte, M.J., and Seder, R.A. (2006). IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology* *177*, 2565-2574.
- Friedman, S.L. (2008a). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* *88*, 125-172.
- Friedman, S.L. (2008b). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* *134*, 1655-1669.
- Fuse, S., Zhang, W., and Usherwood, E.J. (2008). Control of memory CD8+ T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response. *J Immunol* *180*, 1148-1157.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* *200*, 1039-1049.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2006). Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* *209*, 290-296.
- Garcia, K.C., and Adams, E.J. (2005). How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell* *122*, 333-336.



- Gardner, J.M., Devoss, J.J., Friedman, R.S., Wong, D.J., Tan, Y.X., Zhou, X., Johannes, K.P., Su, M.A., Chang, H.Y., Krummel, M.F., and Anderson, M.S. (2008). Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 321, 843-847.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., *et al.* (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine* 17, 1290-1297.
- Gattinoni, L., Zhong, X.S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L.M., *et al.* (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med* 15, 808-813.
- Gebhardt, T., and Mackay, L.K. (2012). Local immunity by tissue-resident CD8+ memory T cells. *Frontiers in Immunology* 3.
- Gebhardt, T., Mueller, S.N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2012). Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells. *Trends Immunol.*
- Gebhardt, T., Wakim, L.M., Eidsmo, L., Reading, P.C., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol.*
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5, R80.
- Gerlach, C., van Heijst, J.W., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J., Schepers, K., and Schumacher, T.N. (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Med* 207, 1235-1246.
- Girard, J.-P., Moussion, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, -.
- Gregory, S.H., Barczynski, L.K., and Wing, E.J. (1992). Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol* 51, 421-424.
- Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 258-263.
- Hamilton, S.E., and Jameson, S.C. (2012). CD8 T cell quiescence revisited. *Trends in immunology.*
- Hamilton-Williams, E.E., Lang, A., Benke, D., Davey, G.M., Wiesmuller, K.H., and Kurts, C. (2005). Cutting edge: TLR ligands are not sufficient to break cross-tolerance to self-antigens. *Journal of immunology* 174, 1159-1163.
- Harty, J.T., and Badovinac, V.P. (2008). Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol* 8, 107-119.
- Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology* 18, 275-308.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.

- Heath, W.R., Kurts, C., Miller, J.F., and Carbone, F.R. (1998). Cross-tolerance: a pathway for inducing tolerance to peripheral tissue antigens. *J Exp Med* 187, 1549-1553.
- Hegel, J.K., Knieke, K., Kolar, P., Reiner, S.L., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2009). CD152 (CTLA-4) regulates effector functions of CD8+ T lymphocytes by repressing Eomesodermin. *Eur J Immunol* 39, 883-893.
- Hendriks, J., Gravestein, L.A., Tesselaar, K., van Lier, R.A., Schumacher, T.N., and Borst, J. (2000). CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1, 433-440.
- Hendriks, J., Xiao, Y., and Borst, J. (2003). CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* 198, 1369-1380.
- Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L., and Sherman, L.A. (2001). Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* 194, 707-717.
- Hickman, H.D., Takeda, K., Skon, C.N., Murray, F.R., Hensley, S.E., Loomis, J., Barber, G.N., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2008). Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nature immunology* 9, 155-165.
- Hillman, R.T., Feng, B.Y., Ni, J., Woo, W.M., Milenkovic, L., Hayden Gephart, M.G., Teruel, M.N., Oro, A.E., Chen, J.K., and Scott, M.P. (2011). Neuropilins are positive regulators of Hedgehog signal transduction. *Genes & development* 25, 2333-2346.
- Hochst, B., Schildberg, F.A., Bottcher, J., Metzger, C., Huss, S., Turler, A., Overhaus, M., Knoblich, A., Schneider, B., Pantelis, D., *et al.* (2012). Liver sinusoidal endothelial cells contribute to CD8 T cell tolerance toward circulating carcinoembryonic antigen in mice. *Hepatology* 56, 1924-1933.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Honke, N., Shaabani, N., Cadeddu, G., Sorg, U.R., Zhang, D.E., Trilling, M., Klingel, K., Sauter, M., Kandolf, R., Gailus, N., *et al.* (2012). Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nature immunology* 13, 51-57.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 10, 159-169.
- Hosel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., Tedjokusumo, R., Esser, K., Arzberger, S., Kirschning, C.J., *et al.* (2009). Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 50, 1773-1782.
- Hsu, W., Shu, S.A., Gershwin, E., and Lian, Z.X. (2007). The current immune function of hepatic dendritic cells. *Cell Mol Immunol* 4, 321-328.
- Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57.
- Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., Arima, M., Kuroda, Y., and Tokuhiya, T. (2002). Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nature immunology* 3, 558-563.
- Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y., and Tokuhiya, T. (2004). Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *Journal of immunology* 173, 883-891.

- Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S.M., Dejong, C.S., Shin, H., Hunter, C.A., Wherry, E.J., Lindsten, T., and Reiner, S.L. (2008). Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321, 408-411.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Kao, C., Banerjee, A., Schambach, F., Northrop, J.K., Shen, H., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2007). Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 204, 2015-2021.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., *et al.* (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6, 1236-1244.
- Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature immunology* 4, 733-739.
- Jameson, S.C., and Masopust, D. (2009). Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31, 859-871.
- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jeannot, G., Boudousquie, C., Gardiol, N., Kang, J., Huelsken, J., and Held, W. (2010). Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9777-9782.
- Jiang, X., Clark, R.A., Liu, L., Wagers, A.J., Fuhlbrigge, R.C., and Kupper, T.S. (2012). Skin infection generates non-migratory memory CD8+ TRM cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227-231.
- Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27, 281-295.
- Joshi, N.S., and Kaech, S.M. (2008). Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol* 180, 1309-1315.
- Jung, Y.W., Rutishauser, R.L., Joshi, N.S., Haberman, A.M., and Kaech, S.M. (2010). Differential localization of effector and memory CD8 T cell subsets in lymphoid organs during acute viral infection. *J Immunol* 185, 5315-5325.
- Junt, T., Scandella, E., and Ludewig, B. (2008). Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nature reviews. Immunology* 8, 764-775.
- Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, -.
- Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002a). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111, 837-851.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002b). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2, 251-262.
- Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2 $\alpha$  expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32, 91-103.

Kallies, A., Xin, A., Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2009). Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31, 283-295.

Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., and Wherry, E.J. (2011). Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8(+) T cell responses during chronic infection. *Nature immunology* 12, 663-671.

Karrar, A., Broome, U., Uzunel, M., Qureshi, A.R., and Sumitran-Holgersson, S. (2007). Human liver sinusoidal endothelial cells induce apoptosis in activated T cells: a role in tolerance induction. *Gut* 56, 243-252.

Ke, P.Y., and Chen, S.S. (2011). Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *The Journal of Clinical Investigation* 121, 37-56.

Keppler, S.J., and Aichele, P. (2011). Signal 3 requirement for memory CD8(+) T-cell activation is determined by the infectious pathogen. *European journal of immunology*.

Keppler, S.J., Theil, K., Vucikuj, S., and Aichele, P. (2009). Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 39, 1774-1783.

Kern, M., Popov, A., Scholz, K., Schumak, B., Djandji, D., Limmer, A., Eggle, D., Sacher, T., Zawatzky, R., Holtappels, R., *et al.* (2009). Virally Infected Mouse Liver Endothelial Cells Trigger CD8+ T-cell Immunity. *Gastroenterology*.

Klein, I., Cornejo, J.C., Polakos, N.K., John, B., Wuensch, S.A., Topham, D.J., Pierce, R.H., and Crispe, I.N. (2007). Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 110, 4077-4085.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9, 833-844.

Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P.A., Hamann, A., and Crispe, I.N. (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, 2407-2413.

Knolle, P.A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174, 21-34.

Knolle, P.A., and Limmer, A. (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly* 133, 501-506.

Knolle, P.A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A.W. (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, 1428-1440.

Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of experimental medicine* 202, 637-650.

Kratzer, R., Mauvais, F.X., Burgevin, A., Barilleau, E., and van Endert, P. (2010). Fusion proteins for versatile antigen targeting to cell surface receptors reveal differential capacity to prime immune responses. *J Immunol* 184, 6855-6864.

- Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Kuhl, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Hamann, A., and Klugewitz, K. (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*.
- Kurts, C., Heath, W.R., Carbone, F.R., Allison, J., Miller, J.F., and Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* *184*, 923-930.
- Kurts, C., Heath, W.R., Carbone, F.R., Kosaka, H., and Miller, J.F. (1998). Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity. *Novartis Found Symp* *215*, 172-181; discussion 181-190.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* *186*, 239-245.
- Kurts, C., Robinson, B.W., and Knolle, P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* *10*, 403-414.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2002). Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature reviews. Immunology* *2*, 982-987.
- Lee, Y.K., and Mazmanian, S.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* *330*, 1768-1773.
- Lefrancois, L. (2006). Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. *Immunol Rev* *211*, 93-103.
- Lefrancois, L., and Marzo, A.L. (2006). The descent of memory T-cell subsets. *Nat Rev Immunol* *6*, 618-623.
- Lefrancois, L., and Obar, J.J. (2010). Once a killer, always a killer: from cytotoxic T cell to memory cell. *Immunol Rev* *235*, 206-218.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* *14*, 233-258.
- Li, Q., Eppolito, C., Odunsi, K., and Shrikant, P.A. (2006). IL-12-programmed long-term CD8+ T cell responses require STAT4. *Journal of immunology* *177*, 7618-7625.
- Limmer, A., and Knolle, P.A. (2001). Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* *49 Suppl 1*, S7-11.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* *6*, 1348-1354.
- Lohse, A.W., Knolle, P.A., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G., and Meyer Zum Buschenfelde, K.H. (1996). Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* *110*, 1175-1181.
- Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., Schmidt, D., Mahnke, K., Bachmann, M.F., Marconi, P., Deeg, C.A., and Brocker, T. (2008). Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo. *Immunity* *28*, 521-532.
- Malek, T.R., and Castro, I. (2010). Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* *33*, 153-165.

Malovic, I., Sorensen, K.K., Elvevold, K.H., Nedredal, G.I., Paulsen, S., Erofeev, A.V., Smedsrod, B.H., and McCourt, P.A. (2007). The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor. *Hepatology* 45, 1454-1461.

Mardiney, M., 3rd, and Malech, H.L. (1996). Enhanced engraftment of hematopoietic progenitor cells in mice treated with granulocyte colony-stimulating factor before low-dose irradiation: implications for gene therapy. *Blood* 87, 4049-4056.

Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2006). Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J Immunol* 176, 2079-2083.

Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Levees of immunological tolerance. *Nat Immunol* 11, 3-6.

Matzinger, P., and Kamala, T. (2011). Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nature reviews. Immunology* 11, 221-230.

Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., and Kasper, D.L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107-118.

Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F., and Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211, 81-92.

Milpied, P., Massot, B., Renand, A., Diem, S., Herbelin, A., Leite-de-Moraes, M., Rubio, M.T., and Hermine, O. (2011). IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression. *Blood* 118, 2993-3002.

Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.

Mueller, D.L. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 11, 21-27.

Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2012). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu Rev Immunol* 31, 121205110820006.

Nguyen, K.B., Watford, W.T., Salomon, R., Hofmann, S.R., Pien, G.C., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J.J., and Biron, C.A. (2002). Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297, 2063-2066.

Obar, J.J., and Lefrancois, L. (2010). Early Signals during CD8+ T Cell Priming Regulate the Generation of Central Memory Cells. *J Immunol*.

Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65, 305-317.

Oldstone, M.B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., and Lewicki, H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65, 319-331.

Parish, I.A., Rao, S., Smyth, G.K., Juelich, T., Denyer, G.S., Davey, G.M., Strasser, A., and Heath, W.R. (2009). The molecular signature of CD8+ T cells undergoing deletional tolerance. *Blood*.

Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C.A., *et al.* (2003). Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302, 1041-1043.

- Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32, 79-90.
- Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., and van den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6, 280-286.
- Protzer, U., Maini, M.K., and Knolle, P.A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. 1-13.
- Pulendran, B., and Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nature immunology* 12, 509-517.
- Racanelli, V., and Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54-62.
- Rao, R.R., Li, Q., Bupp, M.R.G., and Shrikant, P.A. (2012). Transcription Factor Foxo1 Represses T-bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8+ T Cell Differentiation. *Immunity* 36, 374-387.
- Rao, R.R., Li, Q., Odunsi, K., and Shrikant, P.A. (2010). The mTOR Kinase Determines Effector versus Memory CD8(+) T Cell Fate by Regulating the Expression of Transcription Factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity*.
- Redmond, W.L., and Sherman, L.A. (2005). Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22, 275-284.
- Redmond, W.L., Wei, C.H., Kreuwel, H.T., and Sherman, L.A. (2008). The apoptotic pathway contributing to the deletion of naive CD8 T cells during the induction of peripheral tolerance to a cross-presented self-antigen. *J Immunol* 180, 5275-5282.
- Rehermann, B., and Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5, 215-229.
- Roberts, A.D., Ely, K.H., and Woodland, D.L. (2005). Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Med* 202, 123-133.
- Rock, K.L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-921.
- Rock, K.L., York, I.A., and Goldberg, A.L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nature immunology* 5, 670-677.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology* 24, 419-466.
- Rutishauser, R.L., and Kaech, S.M. (2010). Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev* 235, 219-233.
- Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., and Kaech, S.M. (2009). Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 31, 296-308.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

- Sanjabi, S., Mosaheb, M.M., and Flavell, R.A. (2009). Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity* 31, 131-144.
- Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* 205, 625-640.
- Sarkar, S., Teichgraber, V., Kalia, V., Polley, A., Masopust, D., Harrington, L.E., Ahmed, R., and Wherry, E.J. (2007). Strength of stimulus and clonal competition impact the rate of memory CD8 T cell differentiation. *J Immunol* 179, 6704-6714.
- Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Gastroenterology* 28, 402-413.
- Schietinger, A., Delrow, J.J., Basom, R.S., Blattman, J.N., and Greenberg, P.D. (2012). Rescued tolerant CD8 T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state. *Science* 335, 723-727.
- Schildberg, F.A., Hegenbarth, S.I., Schumak, B., Limmer, A., and Knolle, P.A. (2008). Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Immunol* 38, 957-967.
- Schildberg, F.A., Wojtalla, A., Siegmund, S.V., Endl, E., Diehl, L., Abdullah, Z., Kurts, C., and Knolle, P.A. (2011). Murine hepatic stellate cells veto CD8 T cell activation by a CD54-dependent mechanism. *Hepatology* 54, 262-272.
- Schluns, K.S., and Lefrancois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 3, 269-279.
- Schmidt, C.S., and Mescher, M.F. (2002). Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *J Immunol* 168, 5521-5529.
- Schumacher, T.N.M., Gerlach, C., and van Heijst, J.W.J. (2010). Mapping the life histories of T cells. *Nat Rev Immunol* 10, 621-631.
- Schurich, A., Berg, M., Stabenow, D., Bottcher, J., Kern, M., Schild, H.J., Kurts, C., Schuette, V., Burgdorf, S., Diehl, L., *et al.* (2010). Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 184, 4107-4114.
- Schurich, A., Bottcher, J.P., Burgdorf, S., Penzler, P., Hegenbarth, S., Kern, M., Dolf, A., Endl, E., Schultze, J., Wiertz, E., *et al.* (2009). Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology*.
- Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334.
- Sheridan, B.S., and Lefrancois, L. (2011). Regional and mucosal memory T cells. *Nature immunology* 131, 485-491.
- Shi, J., Fujieda, H., Kokubo, Y., and Wake, K. (1996). Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology* 24, 1256-1263.
- Shin, H., Blackburn, S.D., Intlekofer, A.M., Kao, C., Angelosanto, J.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2009). A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 31, 309-320.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., and *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.



- Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M.A., Geuking, M.B., Beutler, B., Tedder, T.F., Hardt, W.D., *et al.* (2009). Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 325, 617-620.
- Sprenth, J., Cho, J.H., Boyman, O., and Surh, C.D. (2008). T cell homeostasis. *Immunol Cell Biol* 86, 312-319.
- Srinivasan, M., and Frauwirth, K.A. (2009). Peripheral tolerance in CD8(+) T cells. *Cytokine*.
- Stabenow, D., Frings, M., Truck, C., Gartner, K., Forster, I., Kurts, C., Tuting, T., Odenthal, M., Dienes, H.P., Cederbrant, K., *et al.* (2010). Bioluminescence imaging allows measuring CD8 T cell function in the liver. *Hepatology* 51, 1430-1437.
- Steimle, V., Siegrist, C.A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B., and Mach, B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265, 106-109.
- Steinman, R.M. (2008). Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 29, 319-324.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., and Nussenzweig, M. (2003a). Dendritic Cell Function in Vivoduring the Steady State: A Role in Peripheral Tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 987, 15-25.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003b). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.
- Stemberger, C., Huster, K.M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2007). A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* 27, 985-997.
- Stemberger, C., Neuenhahn, M., Gebhardt, F.E., Schiemann, M., Buchholz, V.R., and Busch, D.H. (2009). Stem cell-like plasticity of naive and distinct memory CD8(+) T cell subsets. *Semin Immunol* 21, 62-68.
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.
- Surh, C.D., and Sprenth, J. (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29, 848-862.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Takemoto, N., Intlekofer, A.M., Northrup, J.T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2006). Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 177, 7515-7519.
- Tang, L., Yang, J., Liu, W., Tang, X., Chen, J., Zhao, D., Wang, M., Xu, F., Lu, Y., Liu, B., *et al.* (2009). Liver sinusoidal endothelial cell lectin, LSECtin, negatively regulates hepatic T-cell immune response. *Gastroenterology* 137, 1498-1508 e1491-1495.
- Tavassoli, M., Kishimoto, T., and Kataoka, M. (1986a). Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *The Journal of cell biology* 102, 1298-1303.
- Tavassoli, M., Kishimoto, T., Soda, R., Kataoka, M., and Harjes, K. (1986b). Liver endothelium mediates the uptake of iron-transferrin complex by hepatocytes. *Experimental cell research* 165, 369-379.
- Theocharidis, A., van Dongen, S., Enright, A.J., and Freeman, T.C. (2009). Network visualization and analysis of gene expression data using BioLayout Express(3D). *Nat Protoc* 4, 1535-1550.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 10, 753-766.

- Tokita, D., Ohdan, H., Onoe, T., Hara, H., Tanaka, Y., and Asahara, T. (2005). Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 18, 237-245.
- Trambas, C.M., and Griffiths, G.M. (2003). Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* 4, 399-403.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E., and Schoenberger, S.P. (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2, 423-429.
- Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.
- von Oppen, N. (2008). Charakterisierung der toleranzinduzierenden Interaktion zwischen naiven CD8 T-Zellen und den sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC). 1-116.
- von Oppen, N., Schurich, A., Hegenbarth, S., Stabenow, D., Tolba, R., Weiskirchen, R., Geerts, A., Kolanus, W., Knolle, P., and Diehl, L. (2009). Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology* 49, 1664-1672.
- Wakim, L.M., and Bevan, M.J. (2010). From the thymus to longevity in the periphery. *Curr Opin Immunol*.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., *et al.* (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 209, 1723-1742, S1721.
- Weninger, W., Crowley, M.A., Manjunath, N., and von Andrian, U.H. (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med* 194, 953-966.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nature immunology* 131, 492-499.
- Wherry, E.J., Teichgraber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4, 225-234.
- Wiesel, M., Crouse, J., Bedenikovic, G., Sutherland, A., Joller, N., and Oxenius, A. (2011a). Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8(+) T cells in vivo. *European journal of immunology*.
- Wiesel, M., Kratky, W., and Oxenius, A. (2011b). Type I IFN substitutes for T cell help during viral infections. *Journal of immunology* 186, 754-763.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171-192.
- Williams, M.A., Holmes, B.J., Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2006). Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol Rev* 211, 146-153.
- Wirth, T.C., Xue, H.H., Rai, D., Sabel, J.T., Bair, T., Harty, J.T., and Badovinac, V.P. (2010). Repetitive Antigen Stimulation Induces Stepwise Transcriptome Diversification but Preserves a Core Signature of Memory CD8(+) T Cell Differentiation. *Immunity* 33, 128-140.

- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., and McCuskey, R.S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5, 683-692.
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gärtner, K., Frings, M.K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., Börner, C., Arnold, B., Hämmerling, G., Nieswandt, B., *et al.* (2012). TNF-Induced Target Cell Killing by CTL Activated through Cross-Presentation. *CellReports* 2, 478-487.
- Wojciechowski, S., Tripathi, P., Bourdeau, T., Acero, L., Grimes, H.L., Katz, J.D., Finkelman, F.D., and Hildeman, D.A. (2007). Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*.
- Wolf, P.R., and Ploegh, H.L. (1995). How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 267-306.
- Woodland, D.L., and Kohlmeier, J.E. (2009). Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 9, 153-161.
- Xiao, Z., Casey, K.A., Jameson, S.C., Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2009). Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *Journal of immunology* 182, 2786-2794.
- Xiao, Z., Mescher, M.F., and Jameson, S.C. (2007). Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. *The Journal of experimental medicine* 204, 2667-2677.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., *et al.* (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209, 1713-1722, S1711-1719.
- Yeo, C.J., and Fearon, D.T. (2011). T-bet-mediated differentiation of the activated CD8+ T cell. *European journal of immunology* 41, 60-66.
- Zehn, D., and Bevan, M.J. (2006). T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 25, 261-270.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35, 161-168.
- Zhao, D.M., Yu, S., Zhou, X., Haring, J.S., Held, W., Badovinac, V.P., Harty, J.T., and Xue, H.H. (2010). Constitutive activation of Wnt signaling favors generation of memory CD8 T cells. *J Immunol* 184, 1191-1199.
- Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33, 229-240.
- Zhu, J., Jankovic, D., Oler, A.J., Wei, G., Sharma, S., Hu, G., Guo, L., Yagi, R., Yamane, H., Puskosdy, G., *et al.* (2012). The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. *Immunity*, 1-14.



## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 3.2-1</b> Die für die Kreuzpräsentation von OVA nötige Expression von H-2K <sup>b</sup> ist in [bm1->C57BL/6] Chimären auf LSEC beschränkt .....	45
<b>Abbildung 3.2-2</b> Schematische Darstellung der Stimulation von naiven CD8 <sup>+</sup> OT-I T Zellen <i>in vivo</i> .....	47
<b>Abbildung 3.2-3</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Vergleich der T Zell-Antwort von OT-I T Zellen nach Stimulation durch LSEC oder unreife DC <i>in vivo</i> .	50
<b>Abbildung 4.1-1</b> Die Stimulation durch LSEC führt zur Entstehung einer eigenständigen CD8 <sup>+</sup> T Zell-Population, die durch reife DC reaktiviert werden kann .....	63
<b>Abbildung 4.1-2</b> LSEC-stimulierte T Zellen unterscheiden sich von naiven T Zellen und reife DC-stimulierten T Zellen durch ihre Gensignatur.....	64
<b>Abbildung 4.2-1</b> LSEC-stimulierte T Zellen exprimieren CD62L und migrieren in Richtung von CCR7-Liganden .....	66
<b>Abbildung 4.2-2</b> LSEC-stimulierte T Zellen aber nicht DC-stimulierte T Zellen wandern in lymphatische Organe <i>in vivo</i> .....	67
<b>Abbildung 4.2-3</b> Die antigen-spezifische Stimulation von naiven CD8 <sup>+</sup> T Zellen durch LSEC <i>in vivo</i> führt nach lokaler T Zell-Proliferation zur Migration der T Zellen in lymphatische Organe .....	68
<b>Abbildung 4.3-1</b> Die Lokalisation und der Phänotyp von LSEC-stimulierten T Zellen ähnelt TCM .....	71
<b>Abbildung 4.3-2</b> LSEC-stimulierte T Zellen in Leber und Milz gleichen sich in Phänotyp und Funktion .....	72
<b>Abbildung 4.3-3</b> Im Kontext einer Infektion differenzieren LSEC-stimulierte T Zellen und TCM in Effektor T Zellen.....	74
<b>Abbildung 4.4-1</b> Eine bestimmte Kombination von stimulatorischen Signalen führt zur Expression von IFN $\gamma$ durch LSEC-stimulierte T Zellen.....	76
<b>Abbildung 4.4-2</b> Die Stimulation mit $\alpha$ CD3/28+IL-12 veranlasst LSEC-stimulierten T Zellen zur Differenzierung in Effektor T Zellen.....	78
<b>Abbildung 4.4-3</b> LSEC-stimulierte T Zellen und TCM benötigen die gleiche Kombination an kostimulatorischen Signalen zur Differenzierung in Effektor T Zellen.....	79
<b>Abbildung 4.5-1</b> Der Differenzierungszustand von LSEC-stimulierten T Zellen unterscheidet sich von anderen antigen-erfahrenen CD8 <sup>+</sup> T Zell-Populationen.....	81
<b>Abbildung 4.5-2</b> Im Gegensatz zu TCM und TEM besitzen LSEC-stimulierte T Zellen keine unmittelbaren Effektorfunktionen .....	83
<b>Abbildung 4.6-1</b> Neuropilin-1 identifiziert LSEC-stimulierte T Zellen.....	85
<b>Abbildung 4.7-1</b> LSEC-stimulierte T Zellen tragen zur Infektabwehr bei.....	86
<b>Abbildung 4.7-2</b> LSEC-stimulierte T Zellen sind resistent gegenüber Deletion durch unreife DC <i>in vivo</i> .....	88

**Abbildung 4.7-3** Die Präsentation von löslichen Antigenen an naive CD8<sup>+</sup> T Zellen durch LSEC ermöglicht eine zukünftige Effektor T Zell-Antwort ..... 89

**Abbildung 5.6-1** Schematische Darstellung der Entstehung von LSEC-stimulierten T Zellen und ihrer Bedeutung für die adaptive Immunantwort ..... 111

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 4.5-1</b> Mehrere KEGG-Signalwege sind im Vergleich von LSEC-stimulierten T Zellen mit TCM signifikant herunterreguliert .....	82
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----





## 9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
Ad	Adenovirus
AIRE	<i>Engl.:</i> Autoimmune regulator
APC	antigen-präsentierende Zellen ( <i>Engl.:</i> antigen-presenting cells)
B7-H1	B7 Homolog 1 bzw. PD-Ligand-1
Bcl	<i>Engl.:</i> B-cell lymphoma
BHI	<i>Engl.:</i> Brain-Heart-Infusion
Blimp-1	<i>Engl.:</i> B lymphocyte-induced maturation protein 1
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Engl.:</i> bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
CCL	Chemokin (CC-Motiv) Ligand
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	Unterscheidungsgruppen ( <i>Engl.:</i> cluster of differentiation)
CFSE	Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester
CFU	<i>Engl.:</i> colony forming units
CTL	zytotoxische T Zellen ( <i>Engl.:</i> cytotoxic T lymphocytes)
CTLA-4	<i>Engl.:</i> Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DC	dendritische Zellen ( <i>Engl.:</i> dendritic cells)
dd	bidestilliert ( <i>Engl.:</i> double-distilled)
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Engl.:</i> Deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
ELISA	<i>Engl.:</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Eomes	Eomesodermin
et al.	und andere ( <i>Lat.:</i> et alteres)
FACS	<i>Engl.:</i> fluorescence activated cell sorting

FC	<i>Engl.:</i> fold change
FCS	fötales Kälberserum ( <i>Engl.:</i> fetal calf serum)
FDR	<i>Engl.:</i> false discovery rate
Foxp3	Forkhead-Box P3
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GBSS	<i>Engl.:</i> Gey's Balanced Salt Solution
GzmB	Granzym B
h	Stunde
H2	<i>Engl.:</i> Histocompatibility-2
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>Engl.:</i> Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Engl.:</i> Iscove's Modified Dulbecco's Media
KEGG	<i>Engl.:</i> Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
l	Liter
<i>L.m.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	sinusoidale Endothelzellen der Leber ( <i>Engl.:</i> liver sinusoidal endothelial cells)
M	Molar
m	milli bzw. Meter
MACS	Magnetische Zellseparation ( <i>Engl.:</i> Magnetic Activated Cell Sorting)
MFI	<i>Engl.:</i> Mean Fluorescence Intensity

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Engl.:</i> major histocompatibility complex)
Min.	Minute
mm	Millimeter
mTEC	medulläre Thymus Epithelzellen ( <i>Engl.:</i> Medullary thymic epithelial cells)
mTOR	<i>Engl.:</i> mammalian target of Rapamycin
n	nano
n.d.	nicht detektiert
Nrp1	Neuropilin-1
ns	nicht signifikant
OD600	optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
OVA	Ovalbumin
p	P-Wert
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Strukturen ( <i>Engl.:</i> pathogen associated molecular patterns)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Engl.:</i> phosphate buffered saline)
PCA	Hauptkomponentenanalyse ( <i>Engl.:</i> Principal Component Analysis)
PD-1	<i>Engl.:</i> Programmed death 1
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Engl.:</i> plaque forming units
pH	<i>Lat.:</i> potentia Hydrogenii
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Strukturerkennungs-Rezeptor ( <i>Engl.:</i> pattern recognition receptor)
rag	<i>Engl.:</i> recombination activating gene
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Engl.:</i> ribonucleic acid)
RT-PCR	<i>Engl.:</i> Real-time Polymerase Chain Reaction
Runx3	<i>Engl.:</i> Runt related transcription factor 3
s	Sekunde
SD	Standardabweichung ( <i>Engl.:</i> standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>Engl.:</i> standard error of the mean)

SIINFEKL	OVA <sub>257-264</sub> Peptid
SLEC	kurzlebige Effektor T Zellen ( <i>Engl.</i> : short-lived effector cells)
<i>spp.</i>	<i>Lat.</i> : species pluralis
STAT	<i>Engl.</i> : Signal Transducer and Activator of Transcription
Tcf1	<i>Engl.</i> : Transcription Factor 1
TCM	zentrale Gedächtnis T Zellen ( <i>Engl.</i> : central memory T cells)
TCR	T Zell Rezeptor ( <i>Engl.</i> : T cell receptor)
TEM	Effektor Gedächtnis T Zellen ( <i>Engl.</i> : effector memory T cells)
TGF-β	<i>Engl.</i> : Transforming growth factor-β
TIM-3	<i>Engl.</i> : T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3
TLR	<i>Engl.</i> : Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>REG</sub>	regulatorische T Zellen
TRM	organresidente Gedächtnis T Zellen ( <i>Engl.</i> : tissue resident memory T cells)
U	Unit, Internationale Einheit der Enzymaktivität
v/v	Volumenprozent
VCAM	<i>Engl.</i> : Vascular Cell Adhesion Molecule
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
α	anti-
μ	mikro