

**Rolle und Mechanismen einer
von sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) vermittelten
oralen und tumorantigen- spezifischen
CD8+ T- Zell Toleranz**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich- Wilhelms- Universität Bonn

vorgelegt von

Martina Berg

aus Bonn

Abgabefahr: 2006
Publikationsjahr: 2007

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 an der Universitäts- Klinik Bonn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. Percy Knolle
2. Referent: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 29.03.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert"

Meinen Eltern

Auszüge dieser Arbeit gingen in folgende Publikationen ein:

Eur. J. Immunol. 2005. 35:

Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance

Martina Berg*, Andreas Limmer*, Jutta Ohl*, Gerhard Wingender*, Frank Jüngerkes, Beatrix Schumak, Dominik Djandji, Kai Scholz, Alexandra Klevenz, Silke Hegenbarth, Frank Momburg, Günter J. Hämmerling, Bernd Arnold and Percy A. Knolle

Eur. J. Immunol. 2006. 36:

Tumor evasion following cross-presentation of apoptotic tumor cells and induction of tumor specific T cell tolerance by liver sinusoidal endothelial cells

Martina Berg*; Gerhard Wingender*; Natalio Garbi; Dominik Djandji, Silke Hegenbarth; Frank Momburg; Günter Hämmerling; Andreas Limmer and Percy A. Knolle

(*contributed equally)

Daten dieser Arbeit wurden auf den folgenden Kongressen vorgestellt:

2003 Posterpräsentation auf der Tagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Berlin

2004 Vortrag auf der Tagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Maastricht, Niederlande

Titel: „*Tumor evasion: induction of tumor specific tolerance by liver endothelial cells*“

2006 Vortrag auf dem „1st. Meeting of European Societies of Immunology“, Paris, Frankreich

Titel: „*Cross- presentation of apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to development of CD8+ T cell tolerance towards tumor cell-associated antigen*“

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Andreas Limmer und Prof. Dr. Percy Knolle. Dr. Andreas Limmer möchte ich dafür danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit anfertigen konnte. Vor allem möchte ich mich für seine uneingeschränkte Unterstützung und Motivation bedanken. Danke für die Diskussionen, aus denen ich viel lernen konnte.

Bei Prof. Dr. Percy Knolle möchte ich mich ebenfalls für seine Unterstützung und die anregenden Diskussionen bedanken. An dieser Stelle auch noch einmal meinen herzlichen Dank für die Übernahme des 1. Koreferats.

Herrn Prof. Dr. W. Kolanus möchte ich herzlich für die Übernahme des 2. Koreferats danken. Ebenso Herrn Prof. Dr. Fürst und Herrn Prof. Dr. Kurts für die Übernahme des 3 und 4 Gutachters.

Ein großer Dank geht an die Arbeitsgruppe Limmer: Frank Jüngerkes, Timo Schwandt, Annette Busch, Martina Brock, Beatrix Schumak, Gerrit Gielen und Christina Eich. Der Zusammenhalt, die gute Stimmung und Hilfsbereitschaft innerhalb dieser AG waren etwas ganz besonderes. Danke für kritisches Korrekturlesen, Martina!

Auch bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Knolle möchte ich mich für die stets gute Zusammenarbeit und Hilfe bedanken, hier vor allem bei Silke Hegenbarth.

Meinen Eltern möchte ich danken, dass sie mich immer unterstützt haben. Ohne ihre Hilfe wären Ausbildung, Studium und Promotion nicht möglich gewesen. Vielen, lieben Dank!

Meinem Freund Jens Simon danke ich für die Unterstützung und die Aufmunterung in Phasen in denen es nicht so gut lief, sowie für das Korrekturlesen und seine Hilfe bei dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen IV

Abbildungsverzeichnis VIII

1 Einleitung 1

1.1 Das Immunsystem 1

1.1.1 Die angeborene Immunabwehr 1

1.1.2 Das adaptive Immunsystem 2

1.1.3 T- Zellaktivierung 3

1.1.4 T- Zell Toleranz 8

1.2 Orale Toleranz 10

1.2.1 Mechanismen der Induktion oraler Toleranz 10

1.3 Tumor Immunologie 12

1.3.1 Die *immune surveillance* und *immune editing* Hypothese 13

1.3.2 Tumormunität 14

1.3.3 Tumor Toleranz 15

1.4 Die Kontrolle der Immunantwort in der Leber 16

1.4.1 Die Mikroarchitektur der Leber - der Sinusoid 17

1.4.2 Die Zellen der hepatischen Sinusoide 19

1.4.3 Die Sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) 20

2 Material und Methoden 22

2.1 Material 22

2.2 Allgemeine Laborgeräte 22

2.2.1 Verbrauchsmaterialien 25

2.2.2 Chemikalien, Reagenzien und Reaktionskits 26

2.2.3 Allgemeine Lösungen 30

2.2.4 Herstellung von OVA Futter 32

2.2.5 Verwendete Marker, Enzyme und Zytokine 32

2.2.6 Verwendete Antikörper, Streptavidin- und Fluorochromkonjgate 33

2.2.7 Magnetische Kügelchen ('MicroBeads'): 37

2.2.8 Verwendete Zelllinien 37

2.2.9 Verwendete Mauslinien 38

2.2.10 Verwendete rekombinante Viren 39

2.3	Methode.....	39
2.3.1	Isolierung primärer Zellen aus der Leber.....	40
2.3.2	Isolierung primärer Zellen aus der Milz.....	42
2.3.3	Isolierung primärer Zellen aus dem Knochenmark	43
2.3.4	Isolierung von T- Lymphozyten und Dendritischen Zellen aus peripheren Lymphknoten	44
2.3.5	Zellkulturmethoden.....	44
2.3.6	Immunfluorometrische Methoden.....	46
2.3.7	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	49
2.3.8	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.3.9	Proteinchemische Methoden.....	53
2.3.10	Statistische Analyse	55
3	Zielsetzung	56
4	Ergebnisse	58
4.1	Die Rolle der LSEC bei der Induktion oraler Toleranz.....	58
4.1.1	Aufnahme und Kreuzpräsentation oraler Antigene durch LSEC.....	58
4.1.2	Kreuzpräsentation oraler Antigene durch LSEC induzierte eine spezifische Toleranz in naiven CD8+ T- Zellen <i>in vivo</i>	59
4.1.3	Abschalten aktivierter T- Zellen durch Induktion einer oralen Toleranz	60
4.2	Tumore nutzen die tolerogene Umgebung der Leber, um einer Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen.....	65
4.2.1	NK- und NKT- Zellen eliminieren Tumorzellen in der Leber in einer ersten „Antitumorantwort“	65
4.2.2	Einfluss einer ersten Antitumorantwort auf eine spätere Immunantwort	67
4.2.3	Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial durch LSEC <i>in vitro</i>	69
4.2.4	Aufnahme apoptotischer Tumorzellen durch LSEC <i>in vivo</i>	71
4.2.5	Kreuzpräsentation Tumor- assoziierter Antigene durch LSEC.....	72
4.2.6	LSEC die Tumor- assoziierter Antigene kreuzpräsentieren induzieren Toleranz in naiven CD8+ T- Zellen <i>in vitro</i>	73
4.2.7	LSEC induzieren CD8 T- Zell Toleranz gegenüber Tumor- assoziierter Antigene <i>in vivo</i>	76
4.3	Charakterisierung zellulärer Mechanismen der T- Zelltoleranz.....	80
4.3.1	Toleranter T- Zellphänotyp an Tag 5 einer Kokultur mit LSEC.....	80
4.3.2	Im Verlauf der Toleranz werden T- Zellen zunächst stimuliert.....	81
4.3.3	IL-2 kann die Toleranzentstehung beeinflussen	84
4.3.4	Parakrines IL-2, kann die Toleranzinduktion durch LSEC <i>in vitro</i> beeinflussen.....	88
4.3.5	Toleranz basiert auf einer definierten Interaktionszeit	90
4.3.6	Etablierung eines weiteren Toleranzsystems <i>in vitro</i> , durch Generierung tolerogener Knochenmark- DC	93

5	Diskussion	98
5.1	LSEC tragen zu der Etablierung oraler Toleranz bei.....	98
5.2	Tumor <i>escape</i> durch Präsentation von Tumor- assoziierten Antigenen durch LSEC in der Leber	102
5.3	Zelluläre Mechanismen einer durch LSEC vermittelten T- Zelltoleranz	106
6	Zusammenfassung	112
7	Literaturverzeichnis	113
	<i>Curriculum vitae</i>	130

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen
A

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonsäure
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin, Antigen präsentierende Zelle (<i>'antigen presenting cell'</i>),

B

Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>'bovine serum albumine'</i>)
BM-DC	Knochenmark DC (<i>'bone marrow DC'</i>)
BZR	B- Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise

C

C	Celsius
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen (<i>'cluster of differentiation'</i>)
cDNA	zu mRNA komplementäre DNA (<i>'copy DNA'</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester

D

D	Dalton ($1D = 1,6601 \times 10^{-27} \text{kg}$)
DC	Dendritische Zellen (<i>'dendritic cell'</i>)
d. h.	das heißt
DMEM	<i>'Dulbeccos Modified Eagle Medium'</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>'desoxyribonucleic acid'</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>'EnzymeLinked Immonosorbent Assay'</i>
et al.	und andere (<i>'et alteres'</i>)

F

FACS	Durchflusszytometer (<i>'fluorescence activated cell sorter'</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>'foetale calf serum'</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G

g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GBSS	<i>'Gey's Balanced Salt Solution'</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>'green fluorescent protein'</i>)

I

IFN	Interferon
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

K

kb	Kilobase
kD	Kilodalton

L

LAT	<i>„linker for activation of T cells“</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	sinusoidale Endothelzelle der Leber (<i>„liver sinusoidal endothelial cell'</i>)

M

M	Molar
mA	Milli-Ampere
mF	Milli-Farad
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>'magnetic activated cell sorter'</i>)
MHC	Haupthistkompatibilitätskomplex (<i>'major histocompatibility complex'</i>)
Min	Minute
mRNA	Boten – RNA (<i>'messenger RNA'</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>'molecular weight'</i>)

N

n	Nano-
NK	Natürlicher Killer-

O

ODN	Oligodesoxynukleotid
OVA	Ovalbumin

P

p	Piko-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>'phosphate buffered saline'</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	<i>'potentia hydrogenii'</i>

R

RAG	<i>'Recombination – Activating Gene'</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>'ribonucleic acid'</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>'rotations per minute'</i>)
RT	Raumtemperatur

S

Sek.	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>'standard deviation'</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>'standard error of the mean'</i>)
Std	Stunde

T

Tab.	Tabelle
TZR	T- Zellrezeptor (<i>'T cell receptor'</i>)
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha

U

U	<i>unit</i> ; internationale Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht

V

V	Volt
vs.	versus
v/v	Volumenprozent

W

w/v Gewichtsprozent

Z

z.B. zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abb. 1.1: Signaltransduktionsweg des TZR.....	5
Abb. 1.2: Gefäßarchitektur der Leber (Plastinat).....	17
Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lebersinusoids.....	18
Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Sinusoids	19
Abb. 1.5: Phänotyp der LSEC: Oberflächenmoleküle	21

4 Ergebnisse

Abb. 4.1: Aufnahme und Kreuzpräsentation von Ovalbumin.	58
Abb. 4.2: Adoptiver Transfer in RAG2 ^{-/-}	60
Abb. 4.3: Beeinflussung einer Immunantwort durch orale Gabe eines Antigens	62
Abb. 4.4: Abschaltung aktivierter OT-I T- Zellen.....	63
Abb. 4.5: NK-/ NKT- Zellabhängige Elimination von LB27.4.....	66
Abb. 4.6: Einfluss einer erfolgreichen Antitumorantwort auf eine nachfolgende.....	67
Abb. 4.7: Test der Beladung von LB27.4 mit löslichem OVA	68
Abb. 4.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von LSEC <i>in vitro</i>	69
Abb. 4.9: Durchflusszytometrische Analyse von LSEC	70
Abb. 4.10: Kokultur LSEC mit LAL und lebenden Tumorzellen	71
Abb. 4.11: Aufnahme apoptotischer Tumorzellen <i>in vivo</i>	72
Abb. 4.12: Kreuzpräsentation von Tumor- assoziiertem Antigen	73
Abb. 4.13: Proliferationsprofil von OT-I T- Zellen an Tag 5 <i>in vitro</i>	74
Abb. 4.14: Zytotoxizitätstest und IFN γ Produktion von OT-I T- Zellen <i>in vitro</i>	75
Abb. 4.15: Proliferation von OT-I CD8 ⁺ T- Zellen <i>in vivo</i>	76
Abb. 4.16: <i>In vivo</i> Zytotoxizität und Zytokinproduktion in RAG2 ^{-/-}	77
Abb. 4.17: <i>In vivo</i> Zytotoxizität und Zytokinproduktion in C57BL/6 Mäuse.....	78
Abb. 4.18: CD8 ⁺ T- Zellen an Tag 5 einer Kokultur mit LSEC oder DC.....	80
Abb. 4.19: Proliferationsprofil	81
Abb. 4.20: Quantifizierung der Anzahl an CD8 ⁺ T- Zellen pro Proliferationsschritt.....	82

Abb. 4.21: CD25 und CD69 Expression	83
Abb. 4.22: IL-2 gemessen im Überstand einer Kokultur.	84
Abb. 4.23: Kokultur naiver CD8+ T- Zellen und LSEC mit und ohne Zugabe von IL-2.....	86
Abb. 4.24: Zugabe von IL-2 zu verschiedenen Zeitpunkten..	87
Abb. 4.25: Einfluss aktivierter CD4+ T- Zellen	89
Abb. 4.26: Kinetik einer Kokultur	91
Abb. 4.27: Kokultur naiver T- Zellen mit unterschiedlichen APC.....	92
Abb. 4.28: Phänotyp tolerogener Knochenmark DC (BM-DC)	93
Abb. 4.29: Kokultur tolerogener BM-DC mit CD8+ T- Zellen.....	94
Abb. 4.30: Proliferation.....	95
Abb. 4.31: Einfluss von IL-2	96
Abb. 4.32: CD25 Expression.....	97

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Begriff Immunsystem beschreibt ein äußerst komplexes Netzwerk an Organen, Zellen und Molekülen, die miteinander interagieren. Die Hauptaufgabe dieses Netzwerkes ist der Schutz des Organismus vor eindringen Pathogenen, sowie die Erkennung und Kontrolle entarteter körpereigener Zellen (Krebszellen). Das Immunsystem lässt sich in einen sogenannten angeborenen (innate Immunabwehr) und einen erworbenen (adaptive Immunabwehr) Teil unterscheiden. In beiden Systemen sorgen unterschiedliche Zellen zeitlich aufeinander abgestimmt dafür, Gefahren zu erkennen und zu eliminieren.

1.1.1 Die angeborene Immunabwehr

Die innate Immunabwehr ist der phylogenetisch ältere Teil des Immunsystems. Einige seiner Bestandteile finden sich schon in Pflanzen oder wirbellosen Tieren (Hoffmann et al., 1999). Das angeborene Immunsystem beruht im Wesentlichen auf der schnellen Aktion von Zellen wie den Granulozyten, den Makrophagen, den Dendritischen Zellen und den Natürliche Killerzellen, sowie dem nicht-zellulären Komplement System und bakterizider Substanzen.

Immunzellen des innaten Systems exprimieren bestimmte Rezeptoren die hoch konservierte, weit verbreitete mikrobielle oder virale Muster (PAMP's¹) erkennen. Zu diesen Rezeptoren gehören zehn sogenannte „Toll- like“² Rezeptoren (TLR). Sie ermöglichen eine Unterscheidung zwischen selbst und fremd. Die Erkennung pathogener Muster (*danger signals*³) mit Hilfe der TLR Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Zelle. Dendritische Zellen regulieren nach Stimulation durch einen TLR Rezeptor z.B. die Expression Kostimulatorischer Moleküle hoch (Banchereau and Steinman, 1998; Matzinger, 1994). Diese Moleküle werden benötigt, um Zellen des adaptiven Systems zu aktivieren.

Über das innate System wird die Aktivierung des adaptiven Immunsystems induziert. Dieses vermittelt eine gezielte antigen- spezifische Immunantwort, die zur vollständigen Elimination der Infektion nötig ist. (Janeway, 2001).

¹ engl.: PAMP = pathogen- associated molecular patterns

² engl.: TLR = „toll- like receptors“, (sind Homologe zu dem Drosophila Protein *toll*)

³ engl.: Gefahrensignale

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive System ist der evolutionär jüngere Arm des Immunsystems. Es verfügt über eine äußerst große Variabilität, basierend auf der Rekombination und Modifikation spezifischer Gensegmente der unterschiedlichen Antigenrezeptoren. Das adaptive System erkennt spezifisch fremde Antigene und bildet nach einer erfolgreich bekämpften Infektion ein Gedächtnis aus.

Die Zellen des adaptiven Systems sind die T- und B- Zellen. T- Zellen induzieren eine Zellvermittelte, B- Zellen eine humorale Immunantwort. Bei der Population der T- Zellen unterscheidet man die Helferzellen, die den Korezeptor CD4 tragen und die zytotoxischen T- Zellen, die das CD8 Molekül exprimieren.

Der B- Zellrezeptor erkennt das Antigen direkt in einer nicht prozessierten Form. T- Zellen dagegen muss das Antigen prozessiert präsentiert werden. Die B- Zellen können erst spezifische Antikörper produzieren, nachdem sie von einer CD4+ T- Helferzelle oder bestimmten mikrobiellen Antigenen Signale erhalten haben.

1.1.2.1 Antigenpräsentation

Der α/β Rezeptor der T- Zellen ist nicht in der Lage, fremde Antigene direkt zu erkennen. Das Antigen muss diesen Zellen von bestimmten „antigenpräsentierenden Zellen (APC⁴)“ im Kontext mit einem MHC⁵ Molekül gezeigt werden.

MHC Moleküle werden in zwei Klassen eingeteilt. MHC Klasse I Moleküle werden im Endosomalen Retikulum in der Regel mit zytosolischen Peptiden beladen und auf der Zelloberfläche von CD8+ zytotoxischen T- Zellen erkannt. Diese T- Zellen sind nach Erkennung ihres spezifischen Antigens in der Lage, Zellen die dieses Antigen präsentieren zu lysieren. Das MHC Klasse I Molekül wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und ist ein wichtiger Mechanismus, z.B. der Virusabwehr. Die Erkennung von Viren, welche in den Wirtszellen replizieren, erfolgt unter anderem durch Präsentation von Viruspeptiden auf MHC Klasse I Molekülen an spezifische CD8+ T- Zellen.

Antigene, die extrazellulär aufgenommen werden, werden im endosomatischen Abbauweg proteolytisch zu Peptiden zerkleinert und auf MHC Klasse II Moleküle geladen. MHC Klasse II Moleküle werden von CD4+ T- Helferzellen erkannt und ausschließlich von

⁴ APC = *engl.*: antigen presenting cell

⁵ MHC = *engl.*: major histocompatibility complex

professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie Dendritischen Zellen, Makrophagen und B- Zellen konstitutiv exprimiert.

Die Erkennung zytosolischer Antigene, präsentiert auf MHC Klasse I, durch CD8⁺ T- Zellen und die exogener Antigene, präsentiert auf MHC Klasse II, durch CD4⁺ T- Helferzelle, ermöglicht eine getrennte Überwachung beider Kompartimente.

Bestimmte Antigen- präsentierende Zellen, in erster Linie die CD8 α^+ Dendritischen Zellen, (DC⁶) aber auch Makrophagen und B- Zellen, weisen eine weitere besondere Form der Antigenpräsentation auf (Ke and Kapp, 1996; Mitchell et al., 1998; Pooley et al., 2001; Rock et al., 1990). Dabei werden MHC Klasse I Moleküle, die eigentlich nur Peptide zytosolischer Antigene präsentieren, mit Peptiden bestimmter exogener Antigene beladen (Carbone and Bevan, 1990; Kurts et al., 1996). Dies wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Bevan, 1976; Rock et al., 1990; Shen et al., 1997). Das exogen aufgenommene Antigen wird aus dem Phagosom in das Zytosol geschleust und durch das Proteasom, wie zelleigene Proteine, prozessiert. Anschließend wird es in den MHC Klasse I- Präsentationsweg eingeschleust (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995). Die Kreuzpräsentation spielt eine entscheidende Rolle bei der Überwachung des peripheren Gewebes. Naive T- Zellen haben keinen Zugang zum Gewebe und können so nicht direkt eine virale Infektion oder entartete Tumorzellen entdecken. Dies geschieht nur, wenn professionelle Antigen- präsentierende Zellen (in erster Linie DC) Antigene in der Peripherie aufnehmen, in die Lymphorgane migrieren und dort spezifischen T- Zellen präsentieren.

1.1.3 T- Zellaktivierung

Die Aktivierung naiver T- Zellen wird von bestimmten Zellen kontrolliert. Dies sind in erster Linie die Dendritischen Zellen, welche als die wichtigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen des Körpers angesehen werden. Die Aktivierung naiver T- Zellen erfolgt nach dem sogenannten „2- Signal Modell“ (Janeway and Bottomly, 1994). Danach reicht die Erkennung eines spezifischen Peptides, präsentiert auf einem MHC Molekül (Signal 1), allein nicht aus, um eine naive T- Zelle zu aktivieren. T- Zellen benötigen ein zweites Signal, welches in Form von Kostimulation oder Zytokinproduktion seitens der APC geliefert werden muss (Schwartz, 1992). Naive T- Zellen, welche nur Signal 1 erhalten,

⁶ DC= *engl.*: dendritic cell

werden anergisch. Dass heißt, sie sind inaktiv und unempfindlich für weitere Signale (Schwartz, 1996; Schwartz, 1997).

Kostimulatorische Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen, im Wesentlichen den Dendritischen Zellen, bereitgestellt. Diese exprimieren B7.1, B7.2 und ICOS⁷ auf der Zelloberfläche. Diese Moleküle interagieren mit entsprechenden kostimulatorischen Rezeptoren auf der Oberfläche der T- Zellen (z.B. CD28 und ICOS-L) und induzieren eine Signalkaskade, die zur Proliferation und Differenzierung der T- Zelle führt (Shaw and Dustin, 1997; Viola and Lanzavecchia, 1996). Die Kostimulation über CD28 oder ICOS-L induziert in naiven T- Zellen unterschiedliche intrazelluläre Signalwege. CD28 führt zu einer Produktion von IL-2, während eine Kostimulation über ICOS zu IL-10- Produktion führt und bei der Generierung von regulatorischen T- Zellen eine Rolle spielt (van Berkel and Oosterwegel, 2006).

IL-2 wurde in den 70er Jahren in Zellkulturüberständen aktivierter T- Zellen identifiziert und als essentieller Wachstumsfaktor *in vitro* beschrieben (Morgan et al., 1976; Taniguchi et al., 1983). Beobachtungen in IL-2^{-/-} Mäusen zeigten jedoch unerwartet eine massive Lymphozytenproliferation, die zu einer tödlichen Autoimmunität führte (Sadlack et al., 1994). Spätere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Ursache dafür eine Reduktion der Anzahl regulatorischer CD4+CD25+ T- Zellen war (Malek and Bayer, 2004; Malek et al., 2002). *In vitro* spielt IL-2 eine zentrale Rolle, sowohl in der Kontrolle der T- Zellantwort (Proliferation), als auch in der Kontrolle der anschließenden Kontraktion der T- Zellen. *In vivo* ist IL-2 allerdings nicht für die Initiierung einer T- Zellantwort nötig, sondern spielt erst im späteren Verlauf der Expansion eine entscheidende Rolle (D'Souza and Lefrancois, 2003).

Der TZR ist mit dem CD3 Molekül komplexiert, welches die Signaltransduktion ins Zellinnere ermöglicht (Abb. 1.1). Die Signalisierung durch den TZR beginnt mit einer Phosphorylierung bestimmter ITAM⁸ Motive der CD3 ζ-Kette durch die Kinasen der Src-Familie, lck und fyn. Die Phosphorylierung der ζ-Kette ist nötig, um im folgenden Schritt ZAP-70 an den TZR Komplex zu rekrutieren. Dieses phosphoryliert LAT⁹ ein Adaptermolekül, welches entscheidend ist, um die Signale weiter in das Zellinnere zu leiten. Hier wird im Folgenden der Ras/ MAP Kinase Weg und der Ca²⁺/ Calcineurin Weg induziert. Der Ras/ MAP Kinase Weg führt zu einer Signalkaskade, die in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Fos und Jun mündet. Diese binden an AP- 1 in der Promotorregion des

⁷ engl.: ICOS = inducible costimulator

⁸ engl.: ITAM = immune receptor tyrosine- based activation motif

⁹ engl.: LAT = linker for activation

IL-2 Gens und ermöglichen so die Expression von IL-2. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren, wie NF-AT und NK- κ B. Diese induzieren die Expression weiterer Gene die eine Zellaktivierung und -proliferation ermöglichen.

Abb. 1.1:

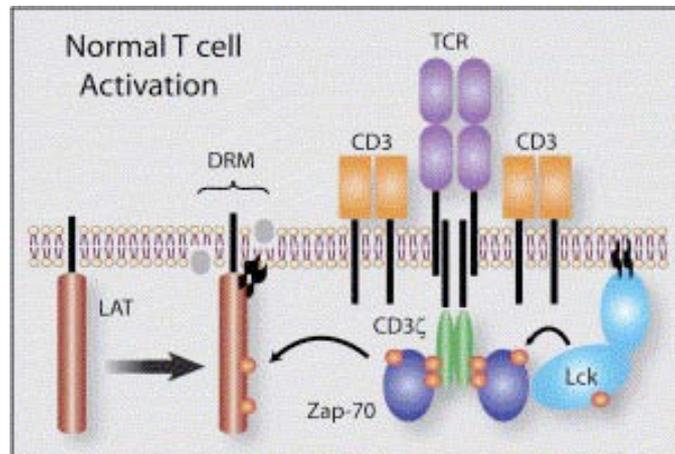


Abb.1.1: Beginn des Signaltransduktionsweg des TZR, aus Linberry, 2006.

Nur reife Dendritische Zellen sind nun in der Lage, naive T- Zellen durch Bereitstellung von Kostimulation und Sekretion bestimmter Zytokine zu aktivieren (Granucci et al., 2001; Granucci et al., 2003b). Sie stellen damit ein Bindeglied zwischen innatem und adaptivem Immunsystem dar. (Pasare and Medzhitov, 2005). Diese Zellen patrouillieren in unreifem Zustand durch den Körper, bzw. bilden als so genannte Langerhans Zellen in der Haut ein residentes Netz immaturer Dendritischer Zellen. Erhalten sie durch einen TLR-L ein *danger signal* beginnen sie zu maturieren (Matzinger, 1994). Dabei ändern sich auch die Migrationseigenschaften der Dendritischen Zellen, welche dann bevorzugt in die Lymphatischen Organe, wie Lymphknoten und Milz, migrieren. In diesen findet durch Interaktion mit naiven T- Zellen die Aktivierung des adaptiven Immunsystems statt (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998).

Eine Aktivierung CD8⁺ zytotoxischer T- Zellen benötigt neben der Erkennung des MHC Klasse I – Peptid Komplexes (Signal 1) und der Kostimulation (Signal 2) noch ein weiteres drittes Signal. Dieses muss in Form von Zytokinen, entweder IL-12, oder Typ I Interferon, bereit gestellt werden (Curtsinger et al., 2003b; Curtsinger et al., 2005), (Valenzuela et al., 2005). IL-12 wird von Dendritischen Zellen nach Stimulation durch einen TLR Signal oder nach Ligation von CD40 produziert.

CD40 auf Dendritischen Zellen interagiert mit CD40L auf z.B. CD4⁺ T- Helferzellen. Ob eine CD4⁺ T- Zellhilfe nötig ist, um eine effektive und langfristige CD8⁺ T- Zellantwort zu

generieren, wird seit längerem diskutiert (Ridge et al., 1998). Die Theorie der CD4⁺- Hilfe besagt, dass die CD4⁺ T- Zelle, welche mit einer antigenpräsentierende APC interagiert, durch Bereitstellung des CD40L Signals diese APC lizenziert. Die APC ist dann erst in der Lage eine naive CD8⁺ T- Zelle langfristig zu aktivieren (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). *In vivo* Experimente zeigten, dass CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen ihr Antigen- Epitop auf der gleichen APC erkennen müssen (Bennett et al., 1997). Bislang gibt es keine eindeutigen Beweise, die auf eine Rolle von parakrin produziertem IL-2 als CD4⁺- T- Zellhilfe hinweisen. IL-2 scheint *in vivo* erst später in der Expansionsphase der CD8⁺ T- Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen (D'Souza and Lefrancois, 2003; D'Souza et al., 2002).

Während die Aktivierung von CD8⁺ T- Zellen gegenüber bestimmter Viren auch ohne CD4⁺ T- Zellhilfe erfolgen kann, scheint die Generierung einer CD8⁺ T- Zellantwort, welche über die Kreuzpräsentation durch APC verläuft auf CD4⁺ Hilfe zu beruhen (Buller et al., 1987; Rahemtulla et al., 1991). Auch die anschließende Generierung und Aufrechterhaltung einer effektiven CD8⁺ Gedächtnisantwort beruht auf einer Hilfe durch CD4⁺- T- Zellen während der Primärstimulation (Sun et al., 2004).

Neben der Rolle, die Zytokine in der Differenzierung naiver T- Zellen spielen, ist die Stärke des T- Zellrezeptor (TZR)- Signals ein entscheidender Parameter. Die Stärke dieses Signals basiert nicht nur auf der Konzentration des Antigens und der Kostimulation, sondern auch auf der Interaktionsdauer zwischen T- Zelle und APC (Iezzi et al., 1998; Lanzavecchia and Sallusto, 2000a; Lanzavecchia and Sallusto, 2000b; Valitutti et al., 1995). Die Interaktionen zwischen Dendritischer Zelle und T- Zelle sind hochdynamisch und können zwischen einigen Sekunden und Stunden dauern (Stoll et al., 2002). Dabei kann eine längere Interaktionszeit eine niedrige Konzentration des Antigens oder der Kostimulation kompensieren und umgekehrt.

1.1.3.1 Das Gedächtnis des adaptiven Immunsystems

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine Gedächtnisfunktion aus. Diese ermöglicht bei wiederholter Infektion mit demselben Pathogen, schneller und effektiver zu reagieren (Sprent and Surh, 2001; Sprent and Surh, 2002).

Die Etablierung eines Gedächtnisses nach erfolgreicher Immunantwort verläuft in zwei Phasen. In der ersten Phase proliferieren und differenzieren naive T- Zellen zu Effektorzellen

nachdem sie ihr Antigen erkannt haben und aktiviert wurden. In der zweiten Phase, im Anschluss an eine erfolgreiche Immunantwort, stirbt der Großteil der T- Zellen durch Apoptose (Kontraktionsphase), um den Pool an T- Zellen wieder zu normalisieren. Einige der überlebenden Effektorzellen differenzieren jedoch zu langlebigen Gedächtniszellen (Kaech and Ahmed, 2001). Diese Gedächtniszellen können an Hand des Expressionsmusters bestimmter Moleküle ($CD69^{\text{hoch}}$, $CD44^{\text{hoch}}$, $CD62L^{\text{niedrig}}$), die auf ihre Aktivierung hinweisen, identifiziert werden. Demnach unterscheidet man zwei Linien der Gedächtniszellen: Die *central memory* (T_{CM}) und die *effektor memory* (T_{EM}) Zellen. Die T_{EM} Zellen finden sich hauptsächlich in nicht- lymphatischen Geweben und sind in der Lage, direkt auf ihr Antigen zu reagieren, um in kürzester Zeit Effektorfunktionen zu übernehmen. Die T_{CM} Zellen befinden sich in den T- Zellarealen der lymphatischen Organe. Sie zeigen keine direkten Effektorfunktionen, sondern proliferieren und differenzieren nach Antigenerkennung (Lanzavecchia and Sallusto, 2000a; Sallusto et al., 1999). Sie stellen damit den Reservepool an antigen- spezifischen Gedächtnis- T- Zellen dar.

Ob eine Effektorzelle sich zu einer T_{CM} oder einer T_{EM} Zelle differenziert, basiert auf der anfänglichen Frequenz der naiven Vorläufer T- Zellen und entscheidet sich bereits während der Primärantwort (Marzo et al., 2005). Dabei ist es zumindest für die $CD8^+$ Gedächtniszellen nicht ausgeschlossen, dass sich Effektorzellen zunächst in T_{EM} Zellen und anschließend in T_{CM} Zellen differenzieren (Wherry et al., 2003).

1.1.4 T- Zell Toleranz

Der T- Zellrezeptor kann hochspezifisch zwischen unterschiedlichen Antigenen unterscheiden, jedoch nicht zwischen selbst und fremd und bedarf einer stringenten Kontrolle. Im Rahmen der sogenannten zentralen Toleranz wird der Großteil potentiell Selbst- reaktiver T- Zellen im Thymus eliminiert. Erkennt ein Thymozyt einen Peptid/ MHC Komplex mit hoher Affinität, wird ein Apoptose Programm induziert (Venzani et al., 2004). Trotz dieses äußerst effektiven Mechanismus konnte die Existenz selbstreaktive T- Zellen in der Peripherie, die der Selektion im Thymus entgangen sind, gezeigt werden (Wucherpfennig et al., 1994). Diese T- Zellen müssen präzise kontrolliert werden, um Autoimmunreaktionen zu verhindern. Diese Regulation wird als periphere Toleranz bezeichnet (Arnold, 2002).

Periphere Toleranz umfasst mehrere Mechanismen: klonale Anergie, adaptive Toleranz (*in vivo* Anergie), periphere Deletion und die Modulation der Immunantwort durch regulatorische T- Zellen (Lechner et al., 2001).

T- Zell Anergie und adaptive Toleranz sind die Folge der Präsentation von Antigenen in einer Umgebung unzureichender Kostimulation oder erhöhter Koinhibition. In beiden Stadien sind die T- Zellen nicht mehr in der Lage, IL-2 zu produzieren und zu proliferieren. Anergie und adaptive Toleranz unterscheiden sich jedoch auf der Ebene der Signaltransduktion.

Anergie, welche bevorzugt in bereits aktivierten T- Zellen induziert wird, beruht auf einer Blockade des Ras/MAP Kinase Weges. Diese Blockade kann durch Zugabe von exogenem IL-2 oder anti- O_x40 Signalen, jedoch nicht durch ausreichende Kostimulation im Kontext erneuter Antigenpräsentation, aufgehoben werden (Appleman and Boussiotis, 2003; Beverly et al., 1992). Adaptive Toleranz wird primär in naiven T- Zellen *in vivo* beobachtet und basiert auf einer frühen Blockade der Tyrosinkinase. Dies führt zu einer Inhibition des Ca²⁺ Signals. Adaptive Toleranz beruht auf der Persistenz des Antigens für die Phase der Inaktivierung der T- Zellen und kann nicht durch die Zugabe von IL-2 aufgehoben werden (Chiodetti et al., 2006; Schwartz, 2003). Nicht nur die Abwesenheit von Kostimulation führt zu T- Zelltoleranz, sondern auch die Anwesenheit negativ signalisierender Koinhibitorischer Moleküle, wie PD-1, B7- H3 oder CTLA-4 (Carter et al., 2002; Probst et al., 2005). Bei unzureichender oder in Abwesenheit einer positiven Kostimulation können negative Signale überwiegen und somit ebenfalls Toleranz in T- Zellen induzieren (Okazaki and Honjo, 2006). Im Falle einer Infektion und damit Signalen durch TLR- L überwiegt dagegen die positive Kostimulation und die T- Zellen werden aktiviert (Nurieva et al., 2006). CTLA-4 wird in erster Linie auf aktivierten T- Zellen exprimiert und ist entscheidend für die T- Zell

Homeostase. Es konnte aber auch auf naiven T- Zellen identifiziert werden und scheint hier an der Toleranzinduktion beteiligt zu sein (Greenwald et al., 2001; Tivol et al., 1995). Eine besondere Form der Anergie konnte für CD8+ T- Zellen beschrieben werden. Trotz optimaler Aktivierung und Kostimulation transgener CD8+ T- Zellen, stellten diese nach 3-4 Tagen die Proliferation und Produktion von IL-2 ein, produzierten aber noch IFN γ und waren zytolytisch aktiv (Tham et al., 2002). Diese Form der Anergie wurde als *activation-induced-unresponsiveness* (AINR) bezeichnet und konnte durch Gabe von IL-2, exogen oder durch CD4+ T- Zellen, aufgehoben werden. Der Zustand der AINR wurde auf eine unzureichende IL-2 Produktion in Verbindung mit unzureichender Proliferation zurückgeführt und unterstrich die Bedeutung der CD4+ T- Zellhilfe im Hinblick auf eine langfristige Proliferation von CD8+ T- Zellen (Schwartz, 2003; Sun et al., 2004).

Periphere Deletion beschreibt einen Prozess *in vivo* bei dem beobachtet wurde, dass die Anzahl spezifischer T- Zellen in Antwort auf ein Antigen zunächst zunahm, dann aber auf Grund der Induktion von Apoptose reduziert wurde (Kawabe and Ochi, 1991). *In vitro* konnte diese Beobachtung reproduziert werden, indem man naive T- Zellen über TZR Ligation in Anwesenheit hoher IL-2 Konzentrationen stimulierte. Eine Restimulation dieser Zellen einige Tage später induzierte einen den sogenannten *activation induced cell death* (AICD) (Lenardo et al., 1999; Lenardo, 1991).

Die Kontrolle autoreaktiver T- Zellen in der Peripherie kann auch durch die aktive Suppression CD4+ regulatorischer T- Zellen erfolgen (Groux et al., 1997; Wakkach et al., 2003). Zwei Populationen regulatorischer T- Zellen (Treg) werden unterschieden: Die natürlichen Treg und die IL-10 produzierenden Treg. Natürliche Treg exprimieren CD4 und konstitutiv CD25, sowie den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Maloy and Powrie, 2001; Sakaguchi, 2000). Sie repräsentieren 5- 10% der CD4+ Zellpopulation und werden teilweise im Thymus generiert. CD4+CD25+ regulatorische T- Zellen werden antigen- spezifisch aktiviert, das heißt, sie müssen in der Peripherie Selbst- Antigene erkennen, um suppressiv aktiv zu werden (Schwartz, 2005). Werden diese Zellen aktiviert, inhibieren sie CD4+ sowie CD8+ T- Zellen Antigen- unspezifisch durch Zell- Zell Interaktion oder Produktion der suppressiven Zytokine von IL-10 und TGF- β (Takahashi and Sakaguchi, 2003).

Die IL-10 produzierenden regulatorischen T- Zellen (Tr1- und Th3- Subtyp) entwickeln sich aus naiven oder ruhenden CD4+ T- Zellen in der Peripherie. Dabei bestimmt der Typ und der Aktivierungsgrad einer Dendritischen Zelle die Differenzierung naiver CD4+ T- Zellen in Effektor- oder Regulatorische T- Zellen. Eine mature DC induziert T_{H1} oder T_{H2} Zellen, eine

immature DC ist dagegen tolerogen und induziert in erster Linie die Differenzierung zu regulatorischen T- Zellen (Jonuleit et al., 2001)

1.2 Orale Toleranz

Das Immunsystem des Darms ist das größte und komplexeste des Körpers. Allein seine Oberfläche, die Schleimhaut des Dünndarms, beträgt beim Menschen 300m² und ist wesentlich permeabler für Antigene, als z.B. die Haut (Faria and Weiner, 2005; Moog, 1981). Umgerechnet werden täglich zwischen 130- 190g Nahrungsproteine im Darm absorbiert und stellen damit für das Immunsystem eine riesige Menge an fremden Antigenen dar (Faria and Weiner, 2005). Das Darmepithelium ist zudem konstitutiv einer Vielzahl an kommensalen Bakterien ausgesetzt, welche eine weitere Antigenquelle darstellen.

Das Immunsystem des Darms muss also ein Gleichgewicht zwischen protektiver Immunantwort gegenüber Pathogenen und Toxinen und der Induktion einer Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien und Nahrungsantigenen finden. Das Immunsystem reagiert auf diese Antigenlast mit der Etablierung einer sogenannten oralen Toleranz (Mowat, 2003). Wie wichtig die Aufrechterhaltung oraler Toleranz ist, zeigen entzündliche Erkrankungen des Darms, wie Morbus Crohn oder Zöliaki, bei denen die Induktion dieser Form der peripheren Toleranz gestört ist (Mowat, 2003).

Das Immunsystem des Darms kann in eine Effektorseite, in welcher die Lymphozyten verteilt über das Epithelium und die Lamina propria der Mukosa sitzen und in organisierte Strukturen, in denen eine Immunantwort induziert wird, unterteilt werden. Zu den organisierten Strukturen gehören die Peyerschen Plaques, die mesenterischen Lymphknoten und die kleinere lymphatische Follikel.

1.2.1 Mechanismen der Induktion oraler Toleranz

Orale Toleranz wird kontinuierlich durch exogene Antigene induziert. Sie ist eine Form der peripheren Toleranz mit dem Ziel, exogene Antigene, welche Zugang in den Organismus erhalten, wie Selbstantigene, zu behandeln (Faria and Weiner, 2005).

Das Antigen kann auf unterschiedliche Weise aufgenommen werden. Aufgenommen von M-Zellen¹⁰ in den Peyerschen Plaques kann es direkt oder transferiert an dortige APC indirekt in die mesenterischen Lymphknoten transportiert werden. Dort wird es den lokalen T- Zellen präsentiert. Eine weitere Route stellt das Blut dar, über welches Antigene in kürzester Zeit zunächst in die Leber und weiter in die peripheren Lymphorgane transportiert werden können (Husby et al., 1985). Das Antigen kann auch lokal im Darm, direkt von Enterozyten oder professionellen antigenpräsentierenden Zellen (DC) in der Lamina propria aufgenommen und präsentiert werden (Mowat, 2003; Worbs et al., 2006). Beschrieben ist zudem die Ausbildung von Zellausläufern (Dendriten) durch Dendritische Zellen, mit welchen sie durch das Epithelium im Darmlumen Antigene aufsammeln können (Rescigno et al., 2001).

Bei der oralen Toleranz handelt es sich um einen aktiven Prozess, der durch verschiedene Mechanismen gesteuert wird. Diese hängen wesentlich von der Dosis des Antigens ab (Weiner, 2000). Eine niedrige Antigendosis favorisiert die Entstehung regulatorischer Zellen, hohe Antigendosen führen in der Regel zu Anergie oder Deletion der antigen- spezifischen T-Zellen (Chen et al., 1995; Chen et al., 1994; Friedman and Weiner, 1994; Whitacre et al., 1991). Untersuchungen zeigen jedoch, dass es sich nicht um „entweder-/ oder-“ Mechanismen handelt, sondern dass beide Mechanismen Aspekte eines komplexen, tolerogenen Prozesses darstellen.

Untersuchungen der Dendritischen Zellpopulation in den Peyerschen Plaques identifizierten verschiedene Subpopulationen, darunter auch CD8 α -/ CD11b-¹¹ doppelt negative Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Subpopulation bevorzugt IL-4 und IL-10 sekretorische T-Zellen induziert (Iwasaki and Kelsall, 1999; Iwasaki and Kelsall, 2001). Die tolerogene Funktion dieser regulatorischen T- Zellen liegt in der Produktion suppressiver Zytokine (IL-10 und TGF- β) (Groux et al., 1997; Powrie et al., 1996). TGF- β spielt z.B. eine wichtige Rolle bei der Generierung und Expansion der natürlichen CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (Chen et al., 2003). Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Vermittlung oraler Toleranz alle drei Subtypen regulatorischer T- Zellen involviert sind.

Welches lymphatische Kompartiment für die Entstehung und Aufrechterhaltung oraler Toleranz verantwortlich ist, konnte noch nicht übereinstimmend geklärt werden (Mowat,

¹⁰ M-Zellen = *engl.*: microfold cells, spezialisierte epitheliale Zellen

¹¹ CD8 α -/ CD11b+ = myeloide Dendritische Zellen, CD8 α +/ CD11b- = lymphoide Dendritische Zellen

2003). So konnte auch in Mäusen, welche keine Peyerschen Plaques besitzen die Induktion einer oralen Toleranz beobachtet werden (Fujihashi et al., 2001). Die mesenterischen Lymphknoten spielen dagegen eine essentielle Rolle in der Induktion mukosaler Immunität und Toleranz (Mowat, 2003; Spahn et al., 2002).

Da orale Antigene jedoch nach Aufnahme im Darm sehr schnell mit dem Blut in der Peripherie verteilt werden, stellt sich die Frage, in wie weit die Induktion oraler Toleranz auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt sein kann (Gutgemann et al., 1998; Smith et al., 2002; Watanabe et al., 2002). Da die Leber mit Blut aus dem Gastrointestinal Trakt versorgt wird, gelangen auf diesem Wege ständig Antigene, die mit der Nahrung aufgenommen werden in dieses Organ und legen nahe, dass auch die Leber eine Rolle bei der Induktion der oralen Toleranz spielt. Erste Hinweise darauf basieren auf Versuchen, bei denen die intestinale Drainage in die Leber unterbrochen wurde und keine orale Toleranz mehr zu beobachten war (Yang et al., 1994). Verschiedenen hepatischen Zellpopulationen konnte bislang eine Rolle in der Toleranz gegenüber oraler Antigene zugesprochen werden, so z.B. den Leber DC und den NK1.1 positiven Leberlymphozyten (Thomson et al., 2002; Trop et al., 1999).

Dass die orale Gabe eines Antigens eine systemische Toleranz induziert, wurde teilweise erfolgreich als Behandlungsmethode autoimmuner Krankheiten (z.B. Arthritis im Mausmodell) eingesetzt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Entstehung oraler Toleranz über eine Phase der Aktivierung antigen- spezifischer T- Zellen verläuft (Blanas et al., 1996; Sun et al., 1999). Während eine Gruppe die Proliferation antigen- spezifischer CD4+ T- Zellen als Bestandteil des Toleranzprozesses beschrieb (Sun et al., 1999), konnte von Blanas et al gezeigt werden, dass es durch orale Gabe des Antigens zu autoimmunen Reaktionen kam (Blanas et al., 1996). Die Gabe von Antigenen über die orale Route zu therapeutischen Zweck ist auf Grund dieser Beobachtungen umstritten und bedarf weiterer genauerer Untersuchungen (Mayer and Shao, 2004).

1.3 Tumor Immunologie

Tumore entstehen durch Transformation normaler Zellen. Dabei kommt es zu einer fehlerhaften Regulation des Wachstums. Eine Immunantwort gegen Tumorzellen stellt eine Antwort gegen „selbst“ dar (Pardoll, 2003). Bei der Transformation einer Zelle zu einer

Tumorzelle verändern sich jedoch oftmals die Antigenkomposition (Tumorantigene) und das biologische Verhalten der Zellen, welches dem Immunsystem die Erkennung entarteter Zellen ermöglicht.

Ein Kennzeichen der Karzinogenese ist die genetische Instabilität (Fearon and Vogelstein, 1990). Diese ist eine Konsequenz von Mutationen oder Deletionen der Kontrollelemente des Genoms, wie beispielsweise des Tumor- Suppressor- Gens p53 (Lu and Lane, 1993). Neben dem unkontrollierten Wachstum, zeigen maligne Tumorzellen zudem untypische biologische Verhaltensmuster. Sie sind in der Lage, über natürliche Gewebegrenzen hinweg in angrenzendes Gewebe einzudringen und so zu metastasieren. Trotz intensivster Forschung der letzten 30- 40 Jahre konnte keine wirklich, erfolgreiche Therapieform im Kampf gegen Tumore etabliert werden. Immunologisch kommen heute in erster Linie Vakzinierungsstrategien zum Einsatz. Diese erfolgen Tumorabhängig mit verschiedenen Antigenen: Testis-, Differenzierungs-, *heat- shock*¹² –Protein-/ Peptidkomplexe oder Idiotypen von B- Zellymphoma, welche auf unterschiedliche Weise appliziert werden (Dendritische Zellen, RNA, usw) (Srivastava, 2006). Eine weitere Vakzinierungsstrategie ist der adoptive Transfer von T- Zellen oder Dendritischen Zellen, um eine Immunantwort gegen den Tumor zu unterstützen. Und schließlich sind Modulierungen der Antitumorantwort im Hinblick auf Kostimulation, Toleranz, Regulation der T- Zell- und Antikörperantwort weitere therapeutische Strategien (Srivastava, 2006).

1.3.1 Die *immune surveillance*¹³ und *immune editing* Hypothese

1909 beschrieb Paul Ehrlich erstmals, dass das Immunsystem an der Kontrolle von Karzinomen beteiligt ist, die andernfalls mit wesentlich häufigerer Wahrscheinlichkeit auftreten würden (Ehrlich, 1909).

Die eigentliche *immune surveillance* Hypothese wurde 50 Jahre später, 1959 von Thomas und später von Burnet beschrieben (Burnet, 1970; Thomas, 1959). Sie besagte, dass Tumore mit ähnlicher Frequenz wie Infektionen durch Pathogene auftreten. Das Immunsystem erkennt und eliminiert diese kontinuierlich auf Grund unterschiedlicher Tumor- assoziierter Antigene (TAA). Diese Hypothese basierte auf Befunden die zeigten, dass bei Patienten mit erblich bedingter oder erworbener Immundefizienz eine höhere Tumorfrequenz auftritt, als bei Menschen mit einem normalen Immunstatus (Gatti and Good, 1971; McClain, 1997; Smyth et al., 2001b). Genauere Studien 1970- 1980 zeigten jedoch eine erhöhte Inzidenz nur bei

¹² engl.: *heat- shock proteins*= Hitzeschock Proteine

¹³ engl.: *immune surveillance* = Überwachung durch das Immunsystem

bestimmten Tumoren. Es stellte sich heraus, dass in immundefizienten Patienten nur Virus-induzierten Tumore wirklich signifikant häufiger auftraten (Gaidano and Dalla-Favera, 1992; List et al., 1987). Diese Studien grenzten die zuvor aufgestellte *immune surveillance* Hypothese dahingehend ein, dass das Immunsystem zur Erkennung viraler Erreger beiträgt und so die Entstehung viraler Tumore beeinflussen kann.

Untersuchungen in knock-out Tieren ($RAG^{-/-}$, $IFN\gamma^{-/-}$) zeigten später jedoch, dass das Fehlen bestimmter Zellen (T- und B-Zellen) oder Mediatoren ($IFN\gamma$) ebenso zu einer Erhöhten Inzidenz von Tumoren führten (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). Diese Tumore zeigten einen regressiven Phänotyp, das heißt nach Transfer in Immunkompetente Tiere wurden diese Tumore abgestoßen. Daraus schloss man, dass die Entstehung dieser Tumore in knock-out Tieren auf einen Fehler in der *immune surveillance* zurück zu führen war (Pardoll, 2003).

Eine weitere Hypothese wurde basierend auf Beobachtungen, dass es trotz einer erfolgreichen *immune surveillance* zu einem progressiven Tumorwachstum kommen kann, (Shankaran et al., 2001) aufgestellt und als *immuno editing* bezeichnet (Dunn et al., 2002). Dieses Konzept umfasst drei Phasen: 1) (*elimination*) in einer frühen Phase findet eine Elimination auf Grund der Expression von Tumorantigenen statt, 2) (*equilibrium*) ist diese Elimination nicht vollständig kann es zur Selektion schwach immunogener Tumorvarianten kommen. 3) Diese können (*tumor escape*) im Folgenden einer Überwachung durch das Immunsystem entgehen (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004). Die *immuno editing* Hypothese beschreibt demnach einen Prozess, in dem das Immunsystem zur Selektion schwach immunogener Tumore beiträgt und so einen *immune escape* ermöglicht.

1.3.2 Tumorimmunität

Eine erste Tumorabwehr erfolgt durch die Zellen des innate Immunsystems. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass NK- und NKT- Zellen in der Lage sind, in das Gewebe an die Stelle eines Tumors zu migrieren, um dort MHC Klasse I- defiziente Tumorzellen zu eliminieren (Whiteside and Herberman, 1995). Die Aktivität dieser Zellen wird durch die Expression inhibitorischer und stimulierender Rezeptoren reguliert. Inhibitorische Rezeptoren (KIR¹⁴ Rezeptoren) erkennen eigene MHC Klasse I Moleküle und signalisieren der NK Zelle ein inhibitorisches Signal. Trifft die NK Zelle auf eine Tumorzelle die MHC Klasse I herunter reguliert hat, werden keine inhibitorischen Signale in die NK- Zelle geleitet und sie ist in der

¹⁴ engl.: KIR = *killer cell immunoglobulin- like receptors*

Lage diese Zelle zu lysieren (Smyth and Godfrey, 2000; Smyth et al., 2001b). Unterstützung erhalten NK- und NKT- Zellen dabei von Dendritischen Zellen (Fernandez et al., 1999; Takahashi et al., 2000). Dendritische Zellen verknüpfen die innate mit der adaptiven Tumorantwort. Bei der Untersuchung regressiver Melanomtumore konnte gezeigt werden, dass Langerhans Zellen Tumorantigene in der Haut aufnehmen, in den peripheren Lymphknoten migrieren und dort eine CD4+ und CD8+ T- Zellantwort induzieren konnten (Rivoltini et al., 2002). Eine Aktivierung der Dendritischen Zellen könnte dabei durch Signale, wie *heat shock* Proteine oder Zytokine, freigegeben von nekrotischen Zellen, erfolgt sein (Smyth et al., 2001b; Tamura et al., 1997).

1.3.3 Tumor Toleranz

Gemäß der *immune surveillance* Hypothese verfügt das Immunsystem über eine Reihe von Effektorfunktionen, um einem Tumorwachstum entgegen zu wirken. Trotzdem scheinen progressive Tumore in der Lage zu sein, eine tolerogene Umgebung zu induzieren, um so einer Erkennung oder Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Im Fall der *immune editing* Hypothese trägt das Immunsystem sogar dazu bei, schwach immunogene Tumore zu selektionieren (Dunn, 2002 und 2004).

Zu den Mechanismen, die eine solche tolerogene Umgebung induzieren, gehört die Regulation von MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche. Um die Präsentation potentieller Tumorantigene zu minimieren oder die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie z.B. TGF- β and IL-10 (Elgert et al., 1998; Ferrone and Marincola, 1995). Umstritten ist die Hypothese, dass Tumore attackierende Lymphozyten direkt durch Expression Apoptose-induzierender Faktoren wie CD95L eliminieren können (Rivoltini et al., 2002; Walker et al., 1998). Dagegen konnte gezeigt werden, dass Tumore inhibitorische Moleküle (PD-L1 und CTLA-4) exprimieren und so in der Lage, sind aktivierte T- Zellen zu inhibieren (Dong et al., 2002).

Ein wichtiger Aspekt ist auch die anatomische Lage des Tumors. Eingebettet in Stroma gelangen solide Tumore, so lange sie nicht metastasieren, nicht in die peripheren Lymphorgane (Lymphknoten), um dort durch Präsentation der Tumorantigene eine Immunantwort auszulösen (Ochsenbein et al., 2001). Dies geschieht erst wenn Dendritische Zellen aus der Tumorumgebung Tumorantigene aufnehmen, in die Lymphknoten wandern und diese dort Kreuzpräsentieren. Dies kann zu zwei Antworten führen: 1) in Kombination

mit pro- inflammatorischen Signalen, die zu einer Maturierung der Dendritischen Zelle führen, wird eine protektive Immunantwort induziert, 2) fehlen jedoch solche Signale, führt die Präsentation der Tumorantigene ohne ausreichende Kostimulation zu einer T- Zelltoleranz (Belz et al., 2002; Robinson et al., 1999).

Eine Reihe regulatorischer oder suppressiver T- Zellen, deren Aufgabe darin besteht, eine Selbst- Toleranz aufrecht zu erhalten, stellen eine weitere Barriere einer erfolgreichen Tumorantwort dar. Zu diesen Zellen gehören in erster Linie die regulatorischen CD4+ CD25+ T- Zellen, aber auch NKT- Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass NKT- Zellen eine erfolgreiche Tumorantwort verhindern indem sie, IL-13 abhängig, CD8+ T- Zellen inhibieren (Terabe et al., 2000). Dies steht im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen, dass NKT- Zellen maßgeblich an einer initialen Anti- Tumorantwort beteiligt sind. So könnten unterschiedliche Tumorantworten von der Art der Signale einer NKT- Zelle abhängen (Smyth and Godfrey, 2000).

CD4+CD25+ regulatorische T- Zellen inhibieren *in vivo* die Entstehung und Aktivierung Tumor- spezifischer CD8+ T- und NKT- Zellen. Die Depletion dieser regulatorischen T- Zellen induzierte eine Immunreaktion gegen einen syngeneten Tumor, der in unbehandelten Tieren nicht erkannt wurde (Shimizu et al., 1999).

Tumore in einem klinisch detektierbaren Stadium haben sich auf zwei Wegen der Kontrolle durch das Immunsystem entzogen: entweder haben sie eine Immuntoleranz induziert, oder sie haben Wege gefunden, der Erkennung durch das Immunsystems (*immune editing*) zu entgehen.

1.4 Die Kontrolle der Immunantwort in der Leber

Eine immunologische Funktion der Leber wurde anfangs nicht erkannt. Man nahm an, dass alle wesentlichen immunologischen Interaktionen nur in den lymphatischen Organen stattfanden. Diese teilt man in zwei Kategorien ein: in die primäre und sekundäre lymphatische Organe. In den primären Organen (Thymus und Knochenmark) findet die primäre Differenzierung der Immunzellen (T- und B- Zellen) statt, in den sekundären Organen (Milz, Lymphknoten, Peyersche' Plaque) die Aktivierung und Expansion.

Die anatomische Lage der Leber legt jedoch nahe, dass sie in der Immunantwort eine wesentliche Rolle spielt. Die Leber wird über die Portalvene mit venösem, Nährstoffreichen Blut aus dem Gastrointestinal Trakt und über die Leberarterie mit arteriellem Blut aus der

systemischen Blutzirkulation versorgt. Dadurch gelangen ständig im Darm aufgenommene Nährstoffe, Toxine und vor allem Antigene in die Leber. Hier erfolgt die Metabolisierung der Nährstoffe sowie die Neutralisierung der Toxine durch die Hepatozyten. Dass die Leber aus immunologischer Sicht ein wichtiges Organ ist, stellte man zunächst bei Transplantationen fest. Eine allogene transplantierte Leber wurde auch über die MHC- Barriere hinweg gut akzeptiert (Calne et al., 1969). In Experimenten, bei denen das Antigen direkt über die Pfortader (intraportal) injiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Leber in der Lage ist, antigen- spezifisch Toleranz zu induzieren. Eine weitere wichtige Funktion der Leber ist die Elimination aktivierter T- Zellen (Huang et al., 1994). Insbesondere aktivierte CD8+ T- Zellen bleiben nach erfolgreicher Expansion und Immunantwort in der Leber hängen und werden hier durch Apoptose eliminiert (Crispe et al., 2000).

1.4.1 Die Mikroarchitektur der Leber - der Sinusoid

Die Architektur der Leber zeigt ein stark verzweigtes Netz aus Gefäßen, den Sinusoiden (**Abb. 1.2**) (Knolle and Limmer, 2003). Diese sind charakterisiert durch einen geringen Durchmesser (10µm) und einen verlangsamten Blutfluss.

Abb. 1.2:



Abb. 1.2: Gefäßarchitektur der Leber (Plastinat)

Die Sinusoide werden von den sinusoidalen Endothelzellen (LSEC¹⁵) ausgekleidet (Abb. 1.3). Diese bilden eine Barriere zwischen Blut und Hepatozyten und vermitteln den Stoffaustausch unter anderem durch aktiv regulierte Poren (Fenestrae Ø 150nm) (Knolle and Gerken, 2000;

¹⁵ engl.: LSEC = *liver sinusoidal endothelial cells*

Wisse, 1970). Moleküle einer Größe von 100- 150nm können passiv durch die Poren der LSEC in den Disse- Raum diffundieren. Größere Makromoleküle werden von LSEC aufgenommen und durch die Zelle transzytiert (Knolle and Limmer, 2003).

Abb. 1.3:

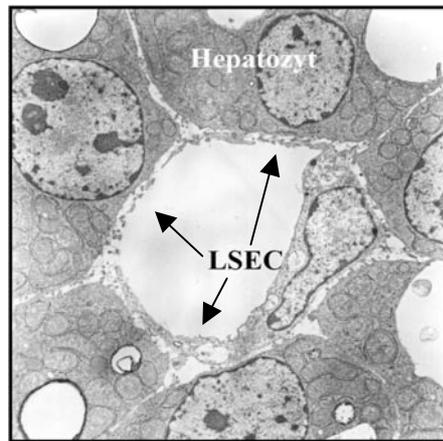


Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lebersinusoids

Entgegen den Endothelzellen anderer Organe findet sich in der Leber, analog zu Knochenmark und Milz, keine Basalmembran. Die Trennung der Hepatozyten von der Blutzirkulation durch die LSEC schützt diese vor Pathogenen und verhindert die direkte Interaktion mit Lymphozyten (Limmer et al., 1998). Neuere Studien zeigen jedoch, dass Lymphozyten durch die Poren der LSEC direkt mit Hepatozyten interagieren können (Warren et al., 2006).

Durch die große Fläche kommt es in den Sinusoiden, im Vergleich zu den peripheren Blutgefäßen (300µm/Sek.), zu einer stark verlangsamten Fließgeschwindigkeit des Blutes (25-250µm/Sek.) (MacPhee et al., 1992; MacPhee et al., 1995). Rechnerisch durchfließt das gesamte Blutvolumen täglich 300mal die Leber. Darin enthalten sind auch periphere Lymphozyten die auf Antigen- präsentierende Zellen in der Leber treffen und mit diesen in den Sinusoiden interagieren (Abb. 1.4). Die Antigen- spezifische Aktivierung von T- Zellen wird jedoch von dem Milieu der Leber beeinflusst. Dieses ist charakterisiert durch die konstitutive Anwesenheit bakterieller Bestandteile (LPS), die mit dem Blut aus dem Gastrointestinal Trakt in die Leber gelangen und einer konstitutiven Produktion suppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF-β (Knolle and Gerken, 2000).

1.4.2 Die Zellen der hepatischen Sinusoide

Zu den Zellpopulationen im Sinusoid gehören die Kupffer Zellen, Dendritischen Zellen, hepatische Lymphozyten, LSEC, Sternzellen und Hepatozyten (Abb. 1.4) (Bertolino et al., 2002).

Abb. 1.4:

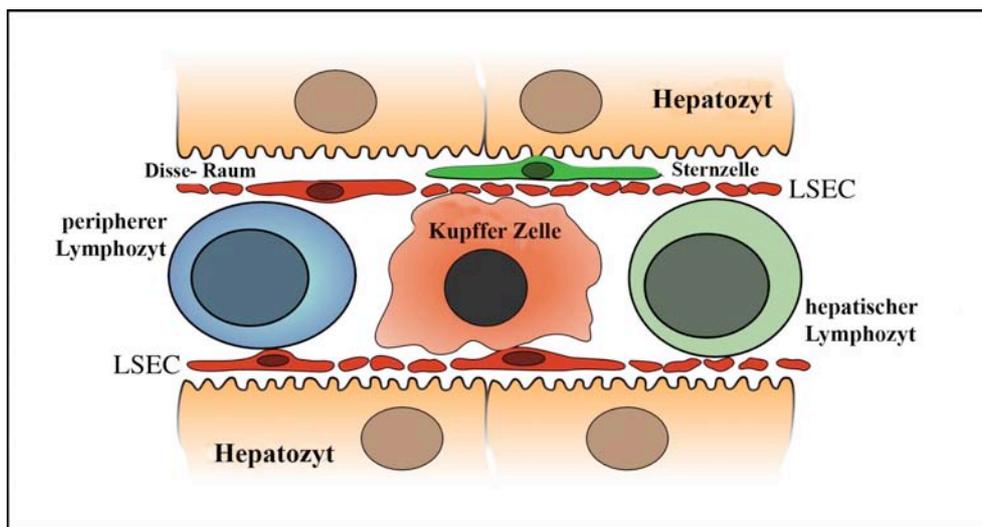


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Sinusoids

Die Hepatozyten (Parenchymzellen) stellen mit 60% die größte Zellpopulation der Leber. Sie sind entscheidend für den Metabolismus von Nährstoffen, den Lipid- und Cholesterolfstoffwechsel und die Neutralisierung von Toxinen zuständig. Im Falle einer Entzündungsreaktion reagieren Hepatozyten mit der Produktion von Akute-Phase-Proteinen, welche sowohl lokal, als auch systemisch wirken (Fey et al., 1989).

Kupffer Zellen sind die gewebeständigen Makrophagen der Leber. Sie repräsentieren 10-15% der Leberzellen, stellen aber 80% aller Gewebs-Makrophagen des Körpers (Knolle and Limmer, 2003). Sie patrouillieren aktiv (2µm/Min.) hauptsächlich in den periportal Arealen der Leber und spielen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Partikeln, Endotoxinen, Immunkomplexen und apoptotischen oder entarteten Zellen aus dem Blut (Bertolino et al., 2002). Nach Aktivierung sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6, TNF-α und IFNγ. Kupffer Zellen exprimieren MHC Klasse II Moleküle und niedrige Level der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Lohse et al., 1996).

Die hepatischen Dendritischen Zellen sind hauptsächlich in den Sinusoiden rund um die Zentralvenen zu finden. Von dort sind sie in der Lage, in die hepatischen Lymphknoten zu migrieren (Knolle and Limmer, 2003; Kudo et al., 1997). Die in der Leber konstitutiv sezernierten Entzündungshemmenden Zytokine IL-10 und TGF- β tragen zu einem tolerogenen Phänotyp der hepatischen DC Population bei (Banchereau et al., 2000; Steinbrink et al., 1997).

Die hepatischen Lymphozyten repräsentieren eine ungewöhnliche Subpopulation. In einer gewöhnlichen Mausleber exprimieren 50% dieser Zellen den $\alpha\beta$ - T- Zellrezeptor und den NK- Zell Marker NK1.1. Die meisten dieser CD4+ NK T- Zellen sind CD1- restringiert.

Das Verhältnis von CD4 zu CD8 T- Zellen in der Leber ist umgekehrt proportional zu den lymphatischen Organen, in welchen die CD4+ T- Zellen überwiegen (in der Milz CD4+: CD8+ = 1,8: 1, in der Leber CD4+: CD8+ = 1: 3,5) (Mehal et al., 2001).

1.4.3 Die Sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) - eine sessile Antigen-präsentierende Zellpopulation

Neben ihrer Aufgabe als physiologische Barriere zwischen Blut und Hepatozyten zu fungieren, tragen LSEC wesentlich zum Metabolismus der Leber bei. Sie exprimieren zahlreiche Rezeptoren, welche die Aufnahme von Stoffen ermöglichen. Diese werden entweder durch Transzytose, oder nach Prozessierung sekretorisch an die Hepatozyten weiter geleitet (Rieder et al., 1992). Zu diesen Rezeptoren gehören: L- SIGN, *Scavenger*, Mannose und Fc- Reziporen (Bashirova et al., 2001; Bogers et al., 1991; Knolle and Limmer, 2003). Durch schnelles Recycling dieser Rezeptoren wird die Effizienz der Antigen- Aufnahme erhöht und macht LSEC teils effizienter als phagozytierende Kupffer Zellen (Knolle and Gerken, 2000).

Verglichen mit Endothelzellen anderer Organe besitzen LSEC ein ungewöhnliches Expressionsmuster unterschiedlicher Oberflächenmolekülen (Abb. 1.5). Sie verfügen über einen immunologischen Phänotyp, das heißt sie exprimieren konstitutiv MHC Klasse I und II, sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, ICOS-L und PDL-1. In Kombination mit der Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD54, CD106 und L- SIGN verfügen sie über alle wichtigen Moleküle zur Interaktion mit peripheren Lymphozyten (Bashirova et al., 2001; Knolle and Limmer, 2003) (**Abb. 1.5**).

Abb. 1.5:

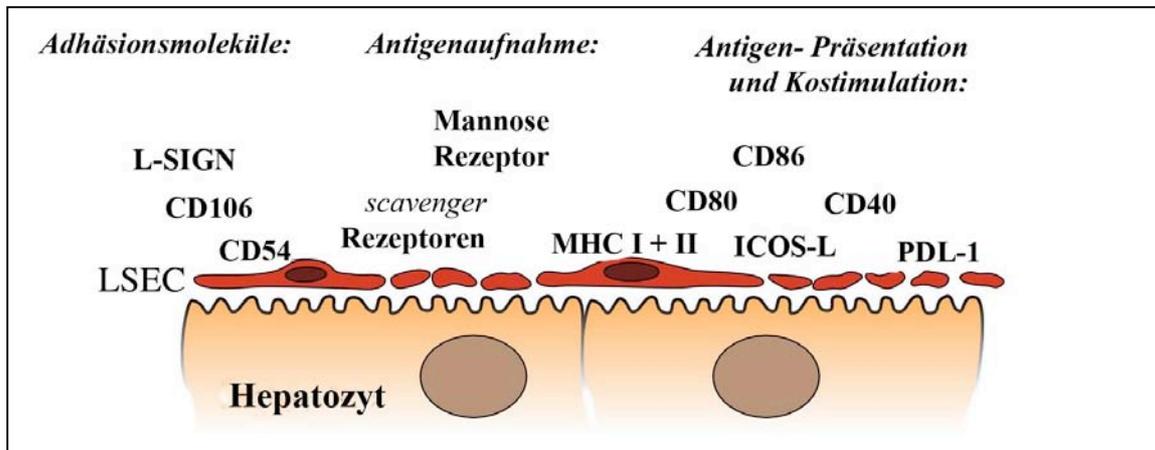


Abb. 1.5: Phänotyp der LSEC: Oberflächenmoleküle exprimiert auf LSEC

Es ist ungewöhnlich, dass LSEC über MHC Klasse II Antigene an CD4⁺ T- Zellen präsentieren können. Diese Fähigkeit wurde ursprünglich nur professionelle antigenpräsentierenden Zellen, wie Dendritische Zellen, B- Zellen und Makrophagen zugesprochen (Lohse et al., 1996).

Im Gegensatz zu Dendritischen Zellen, die im Zuge einer Immunantwort zunächst Maturieren und in die Lymphatischen Organe migrieren, handelt es sich bei den LSEC um eine sessile Population Antigen- präsentierender Zellen die, keiner Maturierung bedürfen (Cella et al., 1997). Dabei induziert die Interaktion einer naiven CD4⁺ T- Zellen mit einer antigenpräsentierenden LSEC jedoch keinen T_{H1} oder T_{H2} Subtypen, sondern einen regulatorischen Phänotypen, der sich durch Produktion von IL-4 und IL-10 auszeichnet (Knolle et al., 1999).

Eine weitere Besonderheit dieser Zellpopulation ist die Fähigkeit, exogene Antigene auf MHC Klasse I an CD8⁺ T- Zellen zu präsentieren. Ein Prozess, der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird und zunächst nur für myeloide Antigen- präsentierende Zelle beschrieben wurde (Bevan, 1975; Bevan, 1976; Limmer et al., 2000). LSEC sind dabei äußerst effizient. Minimale Antigenkonzentrationen sind ausreichend und werden in kürzester Zeit auf MHC Klasse I an CD8⁺ T- Zellen kreuzpräsentiert. Nach Interaktion naiver T- Zellen mit antigenpräsentierenden LSEC beginnen diese zunächst zu expandieren, sind jedoch nach einigen Tagen nicht mehr in der Lage, Effektorfunktionen (Zytotoxizität oder Zytokinproduktion) zu übernehmen. LSEC sind somit in der Lage, eine systemische antigenspezifische Immuntoleranz in T- Zellen zu induzieren, welche sich in dem Verlust der Effektorfunktionen (IFN γ und IL-2) und der zytotoxischen Aktivität äußert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.2 Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaagen	‘U4100 – OD2.2’ und ‘MC BA 100’ (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Belimed
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Bechergläser, Glas-	5ml, 10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1l (Schott, Mainz)
Bechergläser, Plastik	5ml, 10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 150ml, 250ml, 500ml, 1L, 2L (neoLab, Heidelberg)
Brutschränke	‘T 6030’ (Heraeus Instruments, Hanau) ‘CO2 Inkubator MCO – 17AI’ (Sanyo, Japan)
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Canto, LSRII (Becton Dickinson, Heidelberg)
Einfriergerät, Kryo-	Qualifreeze (Nunc, Wiesbaden)
Eismaschinen	Scotsman® ‘MF-40’ und ‘B-550’ (Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien)
Elektrophoresekammern	Mini-Protean® II Cell (BioRad, München)
ELISA – Lesegerät	Spectra MAX 250 (Molecular Devices, MWG BIOTECH, Ebersberg)
Erlenmeyerkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml (Schott, Mainz)
Gewindeflaschen	25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1L, 2L (Schott, Mainz)
Heizblöcke	Ori-Block DB-1 und DB-3 (Techne, Cambridge, UK)
Kamera	SC35/12 (Olympus, Hamburg)
Kühlschränke (+4°C)	Vario – cooler (Bosch, Stuttgart)
Kühlschränke (-20°C)	2021 Maxicoldlab (LKB Bromma, Cambridge, UK), economic, economic – froster, Froster – 720 und GS 52 A (Bosch, Stuttgart)

Kühlschränke (-70°C)	Modell Nr. TC 213-1 (Tritec, Hannover) Advantage (Nunc, Wiesbaden) ULT Freezers Model 917 (Forma Scientific via ThermoLife Science, Egelsbach)
Magnetrührer	IKAMAG RET-GS und RCT (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.)
Messkolben	10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1L (Schott, Mainz)
Messzylinder	Rotilabo 50ml, 100ml, 500ml, 1L (Roth, Karlsruhe)
Mikroskope	DM RD + DM RXE (Leica Instruments, Nussloch)
Küvette, Quarzglas	10mm Suprasil (Hellma, Müllheim)
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Nunc-Immuno TM Wash12; Nunc Brand Products (Nalge Nunc International, via neoLab, Heidelberg)
Mikrowellenofen	HMT 8620 (Bosch, Stuttgart) ST 504 (Gibco BRL, Karlsruhe)
pH – Meter	pH 523 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim)
Pipetten	0,2-2µl, 0,5-10µl, 2-20µl, 20-100µl, 30-200µl, 200-1000µl (Gilson via neoLab, Heidelberg, Eppendorf, Hamburg) Multipette® plus (Eppendorf, Hamburg) 12-Kanal-Pipetten: 25-200 µl (Abimed, München) und 10-200µl (Dunn Labortechnik)
Pipettierhilfen	Pipetboy acu (Integra Bioscience, Fernwald) Pipetus – akku (Hirschmann Labortechnik, Eberstadt)
Pumpen	Type MZ 2C (vacubrand, Wertheim) Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company via Novodirect, Kehl/Rhein) MS-4 Reglo (Ismatec, Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld)
Reinstwasseranlage	‘Milli – Q’, Reagent Grade Water System (Millipore via membraPure, Membrantechnik, Reinstwasser, Bodenheim)
Rotoren	‘JE-6B’ (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof)

Schüttelinkubator	‘RC-2-U Pilot Shaker’ (Adolf Kühner AG, Apparatebau, Basel, Schweiz über Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)
Schüttler, horizontal	‘Rollordrum’, Modell TC-7 (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, New Jersey, USA)
Schüttler, Roll-	ZMBH, Abt. Feinmechanik
Siebe, Metall-	ZMBH, Abt. Feinmechanik, Uni Bonn Abt. Feinmechanik
Sonifikator	Transsonic T300 (Elma, Singen, Htw.)
Sonifikator, Stab-	Ultrasonic Homogenizer, Model 300 (BioLogics, Gainesville, VI, USA)
Spektralphotometer	Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia, Freiburg)
	Ultraspec II Model 4050 (LKB Biochrom, Cambridge, UK)
Stickstofftank	MVE XLC 810HE und EN1251 (Chart Industries, Canton, Georgia, USA)
Tischschüttelgerät	MS-1 Minishaker und VF2 (IKA – Labortechnik, Staufen i.Br.)
	Reax2000 (Heidolph, Kehlheim)
UV-Beleuchtungstisch	Spectroline, Model TL-312A, Transilluminator, 312nm (Fisher Scientific, Nidderau)
Wasserbäder	minitherm 1 (Dinkelberg – Labortechnik, Neu-Ulm)
	Type 1012 (Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel)
Wasserbad, Schüttel	1092 (Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel)
Werkbank, steril	Lamin- Air (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer ‘improved’ (la fontaine über Labotec, Labor – Technik, Göttingen)
Zentrifugen	Elutriator Avanti J-25 I (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof)
	Cryofuge 6-4, Variofuge 3.0R, Biofuge A Typ 1230 und Omnifuge 2.0 RS (Heraeus Instruments, Hanau)

Alle weiteren Labormaterialien wurden über die Firmen neoLab (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21x 26mm (Menzel – Gläser über neoLab, Heidelberg)
Dispensertips	1,25ml, 2,5ml und 5ml (Labotec, Labor – Technik, Göttingen)
Einmalröhrchen	Polypropylen- 12/75mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen) Falcon 2053 (Becton Dickinson, Heidelberg) Polystyren- 6,0/38mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen, #101101) Polystyrol- 18/95mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Filterpapier	Whatmann, 3 MM (Labotec, Labor – Technik, Göttingen) 597 1/2 folded filters Ø240mm (Schleicher & Schuell, Dassel)
Gewebekulturschalen	94/16mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Glaskanülen, heparinisiert	Mikro-HK- Kapillaren (Heiland, Hamburg)
Handschuhe, Einmal-	S, M, L (SafeMed, Willishalten und Hakle-Kimberly, Koblenz)
Kanülen	0,3x 13mm 30G, 0,4x 19mm 27G, 0,45x 25mm 26G, 0,9x40mm 20G0, 9x70mm 20G (B.Braun, Melsungen)
Konzentrationssäulen	‘centriplus YM30’, Ausschlussgröße 30kD (Amicon über Millipore, Eschborn)
Kryoröhrchen	1ml (Nunc, Wiesbaden)
Messpipetten	2ml, 5ml, 10ml, 25ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	6-, 12-, 24-, 48-, 96- Loch (Nunc, Wiesbaden und Greiner Labortechnik, (Nürtingen)
Nitrocellulose	Millipore,
Parafilm	Parafilm „M“® (American National Can TM, Greenwich, CT, USA via neoLab, Heidelberg)
Pasteurpipetten	150mm, 230mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischale	10 cm Ø (Sahrsted, Nümbrecht)
pH – Indikatorstäbchen	pH 6,5-10,0 und pH 0-6 (Merck, Darmstadt)
Pipettenspitzen	Standartips 10µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Hamburg und Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
Präparationsbesteck	Labotec, Labor – Technik, Göttingen

Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2,0ml (Eppendorf, Hamburg)
	1,5ml mit Schraubverschluss (Sarstedt, Nümbrecht, # 72.692)
Siebe, Nylon-	‘Cell Strainer’, 30µm, 70µm und 100µm
	(Becton Dickonson, Heidelberg)
Skalpelle	Präzisa (Dahlhausen Medizin – Technik, Köln)
Sterilfilter	0.2µm (Schleicher & Schuell, Einbeck)
Sterilfilter, Flaschen-	‘Tissue Culture Filter Units’ 150ml, 500ml, 1000ml
	(Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturflaschen	25cm ² , 80cm ² , 175cm ² , 500cm ² (Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturplatten	6-, 12, 24, 96- Loch (Nunc, Wiesbaden, Corning, Bodenheim)
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
	200ml (Nunc, Wiesbaden), 250ml (Corning, Bodenheim)

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien wurden über die Firmen Roth (Karlsruhe), neoLab (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2.2.2 Chemikalien, Reagenzien und Reaktionskits

AA/Bis (Acrylamid – Bisacrylamid – Fertiglösung, 30%)	Sigma, Deisenhofen
ABTS	Roth, Karlsruhe
Accutase	PAA, Cölbe
Actinomycin D (C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆ , MW = 1255)	Sigma, Deisenhofen
Acetyliertes LDL (- alexa 488, - FITC)	Molecular Probes, Leiden Niederlande
Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe
L-Alanin (C ₃ H ₇ NO ₂ , MW = 89,09)	Sigma, Deisenhofen
Albumin, Rinderserum- (BSA)	Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl, MW = 53,49)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , MW = 228,2)	BioRad, München
Ampicillin (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ Sna, MW = 371,4)	Sigma, Deisenhofen
L-Asparagin (C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ , MW = 132,1)	Merck, Darmstadt
BCIP	Perbio Science, Bonn
BM Blue soluble	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe

BSA- Texas Red	Molecular Probes, Leiden Niederlande
Bradford – Reagenz	BioRad, München
BrdU (C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₅ , MW = 307,1)	Sigma, Deisenhofen
Brefeldin A (C ₁₆ H ₂₄ O ₄ , MW = 280,4)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S, MW = 670,0)	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl ₂ • 2H ₂ O, MW = 147)	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol (C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅ , MW = 323,1)	Sigma, Deisenhofen
CFSE / CFDA-SE (C ₂₉ H ₁₉ NO ₁₁ , MW = 557,47)	Molecular Probes, Leiden, Niederlanden
Coomassie Brilliant Blue R-250 (MW = 826,0)	BioRad, München
DDAO-SE	Molecular Probes, Leiden
Diethylpyrocarbonate (DEPC) (C ₆ H ₁₀ O ₅ , MW = 162,1)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO) ((CH ₃) ₂ OS, MW = 78,13)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ , MW = 142,0)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ , MW = 154,2)	Sigma, Deisenhofen
DMEM – Medium	Seromed, Berlin Gibco, BRL, Karlsruhe
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂ , MW=60,05)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut (C ₂ H ₅ OH, MW = 46,07)	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromidlösung, 1% (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br, MW = 394,3)	Fluka über Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ • 2H ₂ O, MW = 372,2)	Gerbu, Gaiberg
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Fötale Kälberserum (low LPS, low IgG) (FCS ^{-LPS})	PAN Biotech, Aidenbach
Formalin; Formaldehyd (HCHO, MW = 30,03)	Merck, Darmstadt
Far Red, siehe DDAO- SE	
D ⁽⁺⁾ -Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ , MW = 180,2)	Sigma, Deisenhofen
L ⁻ -Glutamin (200mM) (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ , MW = 146,1)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂ , MW = 75,07)	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin (C ₃ H ₈ O ₃ , MW = 92,09)	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Heparin	Apotheke, Uniklinik Bonn

HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S, MW = 238,3)	Gerbu, Gaiberg/ Sigma, Deisenhofen
Isopropanol ((CH ₃) ₂ CHOH, MW = 60,1)	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat (KC ₂ H ₃ O ₂ , MW = 98,14)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl, MW = 74,55)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃ , MW = 100,12)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄ , MW = 174,2)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ , MW = 136,09)	Gerbu, Gaiberg
Kalziumchlorid (CaCl ₂ , MW = 147,0)	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin A (C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ • H ₂ SO ₄ , MW = 582,6)	Sigma, Deisenhofen
Kollagen R	Serva, Heidelberg
Lymphoprep	Nycomed, Pharma, Unterschleissheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ • 6H ₂ O, MW = 203,3)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulphat (MgSO ₄ , MW = 120,4)	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol (HS(CH ₂) ₂ OH, MW = 78,13)	Sigma, Deisenhofen
Methanol (CH ₃ OH, MW = 32,04)	Riedel de Haen, Seelze
Natriumacetat (C ₂ H ₃ O ₂ Na, MW = 82,03)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃ , MW = 65,01)	Sigma, Deisenhofen
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃ , MW = 84,01)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl, MW = 58,44)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ • 2H ₂ O, MW = 294,1)	Roth, Karlsruhe
Natrium - deoxycholate (C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na • H ₂ O, MW = 432,6)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ , MW = 120,0)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ , MW = 142)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulphat (SDS) (CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ SO ₃ Na, MW = 288,38)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH, MW = 40,0)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ O ₃ Na, MW = 110,0)	Sigma, Deisenhofen
NBT	Perbio Science, Bonn
Nicht - essentielle Aminosäuren (100x)	Seromed, Berlin
Nycodenz	Nycomed, Norwegen
ODN 1668 (5' - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3')	TIB Molbiol, Berlin
Ovalbumin, Grad V, VI, VII	Sigma, Deisenhofen

OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid, 80% HPLC rein	Pineda, Berlin
OVA ₃₂₃₋₃₃₉ Peptid, 80% HPLC rein	Pineda, Berlin
Paraformaldehyd (PFA) (H(-OCH ₂) _n -OH)	Erva, Heidelberg
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000U/ml) /Streptomycin (10.000µg/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Percoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
Phorbol 12 -myristat 13-acetat (PMA) (C ₃₆ H ₅₆ O ₈ , MW = 616,8)	Sigma, Deisenhofen
Plasmidpräparationskit	‘Nucleobond AX500’ (Machery-Nagel, Düren)
Polyoxysorbitanmonolaurat	siehe Tween 20
Ponceaurot	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 – Medium	Seromed, Berlin
	Gibco BRL, Karlsruhe
Salzsäure (HCl, MW = 36,4 6)	Sigma, Deisenhofen
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , MW = 98,08)	Universität Heidelberg
SDS	s. Natriumdodecylsulphat
SIINFEKL, siehe OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid	
Streptomycin (10.000µg/ml)/Penicillin (10.000U/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde, Wiesbaden
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , MW = 342,3)	Sigma, Deisenhofen
TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂ , MW = 116,2)	BioRad, München
Tris (Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan)	Riedel de Haen, Seelze
Tris – Base ((CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ , MW = 121,1)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau, 0,4% (C ₃₄ H ₂₄ N ₆ O ₁₄ S ₄ Na ₄ , MW = 960,8)	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
Türkislösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Urea (NH ₂ CONH ₂ , MW = 60,06)	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (30%) (H ₂ O ₂ , MW = 34)	Merck, Darmstadt

2.2.3 Allgemeine Lösungen

- **PBS** (*Phosphate buffered saline*): ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Fa. Biochrom)

- **GBSS** (*Gey's balanced salt solution*): 137mM NaCl,
5mM KCl,
1,6mM CaCl_2 ,
0,9mM MgCl_2 ,
0,3mM MgSO_4 ,
0,2mM KH_2PO_4 ,
1,7mM Na_2HPO_4 pH 7,4,
2,7mM NaHCO_3 ,
5,5mM D(+)-Glucose,
50mM HEPES,
pH 7,4 eingestellt mit NaOH

- **FACS- Puffer:** PBS
1% FCS
0,05% Natriumazid

- **Saponinpuffer** 0,5% Saponin in FACS Puffer

- **MACS- Puffer:** PBS
1% FCS
2mM EDTA

- **TE- Puffer** (Tris- EDTA Puffer) 1M Tris-HCl pH 8,0
0,5M EDTA pH 8,0,

- **ELISA:**
 - *Coating buffer:* 0,1M NaHCO_3 , pH 8,2
 - **Blockierungspuffer:** 0,5% BSA in PBS
 - **ABTS Puffer** : 0,1M Zitronensäure, pH 4,35

Western Blot:

- **RIPA- Lysepuffer:**

Tris/HCl pH 8	25 mM
NaCl	150 mM
Natriumdeoxycholat	0,5 %
Nonidet P-40	1 %
Glycerol	10 %
EDTA	2 mM
10% SDS	0,1 %

- **SDS- Laufpuffer:**

Tris- Base	25mM
Glycin	250mM
10% SDS	0,1%

- **Probenpuffer:**

1M Tris/ HCl (pH 6,8)	100mM
10% SDS	4%
Bromphenolblau	0,1%
86% Glycerin	20%
1 MDTT	200mM

- **Blotpuffer:**

Glycin	192mM
Tris/Base	25mM
Methanol	20%

- **TBST Puffer:**

1M Tris/ Hcl (pH 7,5)	50mM
3M NaCl	140mM
Tween 20	0,05%

TE-SDS (*Tail buffer*):
1M Tris-HCl, pH 8,0
0,5M EDTA, pH 8,0
10% SDS 5%

- **ACK- Lysepuffer:**

NH ₄ Cl	150mM
NHCO ₃	10mM
Na ₂ EDTA	0,1mM
pH 7,2- 7,4	

2.2.4 Herstellung von OVA Futter

Die Induktion oraler Toleranz erfolgte durch Fütterung des Antigens (Ovalbumin) in Pelletform.

Methode: 50g OVA Grade II
5g OVA Grade V
5g Zucker
20g Futter in Pulverform

wurden mit Wasser angerührt und anschließend bei 190°C gebacken. Das OVA- Futter wurde den Tieren im Austausch zu normalem Futter über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht.

2.2.5 Verwendete Marker, Enzyme und Zytokine

Molekulargewichtsmarker:

- Rainbow™ **Molekulargewichtsmarker** RPN 756 für **Proteine**
enthält je ca. 1mg/ml der folgenden Proteine (durch kovalente Modifikation mit Farbstoffen eingefärbt):
Myosin (MW= 220kD, Blau), Phosphorylase b (MW= 97.4kD, Braun / evtl. in zwei Banden), BSA (MW= 66kD, Rot), Ovalbumin (MW= 46kD, Gelb), Carbonanhydrase (MW= 30kD, Orange), Trypsininhibitor (MW= 21.5kD, Blau) und Lysozym (MW= 14.3kD, Magenta) (Amersham Pharmacia, Freiburg)
- **DNA Marker**, Fa. Fermentas
GeneRuler, 1kb DNA- Ladder

- **Rekombinante Maus- Zytokine:**

IL- 2 (5x10 ⁶ IU/mg)	Immunotools, BD
IFN γ	BD
IL-10	BD
rek. GM- CSF (5x10 ⁶ IU/mg)	Immunotools

Enzyme und Enzyminhibitoren:

- DNase Grade I oder II (Boehringer, Mannheim und Roche, Mannheim)
- Kollagenase A (Clostridium histolyticum) (Boehringer, Mannheim)
- Accutase (PAA, Cölbe)
- Trypsin/ EDTA (Gibco BRL, Karlsruhe)
- Taq- Polymerase (Invitrogen)
- Proteinase K (Roche, Mannheim)
- Proteinaseinhibitoren: Aprotinin, Leupeptin

2.2.6 Verwendete Antikörper, Streptavidin- und Fluorochromkonjgate

Antikörper gegen Oberflächenmarker und intrazelluläre Epitope:

Sofern nicht anders angegeben wurden monoklonale Antikörper gegen murine Epitope verwendet, die mit Biotin, einem Fluorochrom (FITC, PE, PerCP-Cy5.5 oder APC) oder unkonjugiert waren.

Antigen	Isotyp	Klon	Bemerkung	Quelle
CD3 ϵ	IgG, Hamster	145-2C11	auch unkonjugiert eingesetzt	BD + Hb
CD3 ϵ	IgG2b κ , Ratte	17A2	auch unkonjugiert eingesetzt	BD
CD3 ζ	IgG1, Maus	6B10.2		Santa Cruz
CD4	IgG2b κ , Ratte	GK1.5		BD

CD8 α	IgG2a κ , Ratte	53-6.7	= Ly-2	BD
CD11a	IgG2a κ , Ratte	2D7	= Integrin α L, LFA-1 α -Kette	BD
CD11b	IgG2b κ , Ratte	M1/70	= Integrin α M, Mac-1 Kette	BD
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	= Integrin α X Kette	BD
CD16/32	IgG2b κ , Ratte	2.4G2	= Anti-FC γ R III + II / unkonjugiert eingesetzt	BD
CD19	IgG2a κ , Ratte	1D3	= Teil des BZR - Korezeptors	BD
CD25	IgG2b κ , Ratte	3C7	= IL-2-Rezeptor-alpha Kette	BD
CD40	IgG2a κ , Ratte	3/23		BD
CD44	IgG2b κ , Ratte	IM7	= Pgp-1, Ly-24	BD
CD45R	IgG2a κ , Ratte	RA3-6B2	= B220	BD
CD49b	IgM κ , Ratte	DX5	= Pan-NK-Marker DX5 = Integrin α 2	BD
CD54	IgG1 κ , Hamster	3E2	= ICAM-1	BD
CD62L	IgG2a κ , Ratte	MEL-14	= L-selectin, LECAM-1, Ly-22	BD
CD69	IgG1, Hamster	H1.2F3		BD
CD80	IgG2, Hamster	16-10A1	= B7.1	BD
CD86	IgG2a κ , Ratte	GL1	= B7.2	BD
CD106	IgG2a κ , Ratte	429	= VCAM-1	BD
CD122	IgG2b κ , Ratte	TM- β 1	= IL-2 and IL-15 Rezeptor β -Kette	BD
CD137	IgG1 κ , Ratte	1AH2	= 4-1BB, Ly-63	BD
CD152	IgG1 κ , Hamster	UC10-4F10- 11	= CTLA-4	BD
CD154	IgG3 κ , Hamster	MR1	= CD40 Ligand	BD
DesTCR	IgG, Ratte	Desire		GH

F4/80	IgG2b, Ratte	F4/80		Hb
ICOS-Ig	IgG, Ratte	-/-	= ICOS - Ligand - Ig Konstrukt	RK
ICOS	IgG2a, Ratte	MIC-280		RK
IL-2	IgG2b, Ratte	JES6-5H4	neutralisierender Antikörper	BD
IL-4	IgG2b, Ratte	BVD4- 1D11		BD
IL-10	IgG2b, Ratte	JES5-16E3		BD
IL-12	IgG1, Ratte	C15.6	(p40/p70)	BD
MHC I	IgG2a κ , Ratte	34-2-12	α -H-2D ^d	BD
MHC I	IgG2a κ , Ratte	AF6-88.5	α -H-2K ^b	BD
MHC II	IgG2a κ , Ratte	2G9	I-A ^d / I-E ^d / bindet auch H-2 ^b	BD
MHC II	IgG2a κ , Maus	KH74	I-A ^b / bindet auch I-A ^{f, r, s, +v}	BD
ME9F1	IgG2a, Ratte	ME9F1		Hb
NK1.1	IgG2a κ , Maus	PK136	auch unkonjugiert zur Depletion <i>in vivo</i> eingesetzt	BD + Hb
$\gamma\delta$ TCR	IgG, Hamster	GL3		BD
TCR β	IgG, Hamster	H57-597		BD
TNF- α	IgG1, Ratte	MP6-XT22		BD
V α 2 TCR	IgG2a λ , Ratte	B20.1		BD
V β 5 TCR	IgG1 κ , Maus	MR9-4		BD
α -LAT	IgG2a, Maus			BD
α -Cbl-b	polyklonaler Kanichen-Ak	H-454	unkonjugiert, für WB Analysen	Santa Cruz
CCR 7		4B12		Biolegend
S8L-Tet			H2K ^b -SIINFEKL Tetramere	ProImmune

Quellenabkürzungen: BD = PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg); GH= Günter Hämmerling, DKFZ, Heidelberg; Hb= eigene Aufreinigung aus Hybridomkulturen; Santa Cruz = Santa Cruz (La Jolla, CA, USA).

- **ELISA - Zytokinantikörper, Sekundär- und Isotyp - Kontrollantikörper:**

Sofern nicht anderes angegeben, wurden alle verwendeten ELISA - Zytokin-, Sekundär- und Isotyp - Kontrollantikörper von PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) und eBioscience (via NatuTec, Frankfurt) bezogen. Bei den für ELISA verwendeten Antikörperpaaren, war der erste Antikörper unkonjugiert, der zweite mit Biotin markiert.

- IFN γ : Klon AN-18 (IgG1 κ , Ratte) und Klon R4-6A2 (IgG1, Ratte)
- IL-2: Klon JES6-1A12 (IgG2a, Ratte) und Klon JES6-5H4 (IgG2b, Ratte)
- IL-10: Klon JES5-2A5 (IgG1, Ratte) und Klon SXC-1 (IgM, Ratte)

- **Isotypantikörper:**

- α - Ratte Ig κ (Klon MAR 18.5) (aus Hybridomüberstand aufgereinigt)
- α - murine IgG2a/2b (Klon R2-40)
- Hamster IgG1 (Klon G235-2356)
- Hamster IgG2 (Klon Ha4/8)
- Maus IgG1 κ (Klon MOPC-21)
- Maus IgG2a κ (Klon G155-178)
- Maus IgG2b κ (Klon MPC-11)
- Ratte IgG1 κ (Klon R3-34)
- Ratte IgG2a κ (Klon R35-95)
- Ratte IgG2b κ (Klon A95-1)

Streptavidinkonjugate und sonstige Fluorochromkonjugate:

Streptavidin, konjugiert mit:

- FITC PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg);
- PE PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) und Molecular Probes (Leiden, Niederlanden)
- PE-Cy5 CyChrome: PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg)
- APC PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) und

Molecular Probes (Leiden, Niederlande)

Sonstige Fluorochromkonjugate:

- 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) ($C_{62}H_{87}N_{13}O_{16}$, MW = 1270,45)
(Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- ToPro-3 Iodide (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- Annexin V - PE (PharMingen, Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg)
- CFSE (CFDA-SE), Molecular Probes, Leiden
- DDAO (DDAO-SE), Molecular Probes, Leiden

2.2.7 Magnetische Kügelchen ('MicroBeads'):

- murine α -CD4-, CD8-, CD11c-, CD11b-, CD19, LSEC- sowie α -Biotin- und α -Phycoerythrin- MicroBeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach)

2.2.8 Verwendete Zelllinien

- **B3Z** (Kattunen, 1991): CD8+ T- Zellhybridoma generiert aus einem CD8+ T- Zellklon, dessen T- Zellrezeptor (TZR) spezifisch das OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid, präsentiert auf H2K^b, erkennt. Die Messung einer TZR vermittelten Aktivierung erfolgt über ein *lacZ*- (bakterielle β - Galactosidasegen) Reportergen. Dieses steht unter der Kontrolle des NF-AT Element des IL-2 *Enhancer*. Die Zellen produzieren bei Aktivierung IL-2 und β - Galactosidase.
- **BO17.10**: CD4+ T- Zellhybridoma erkennt das OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid, präsentiert auf I-A^b. T- Zellaktivierung wird an Hand der IL-2 Produktion gemessen.
- **LB27.4** (Kappler et al., 1982): B- Zellhybridom. Exprimiert H2K^{b+d} auf der Zelloberfläche und wurde als TRAIL- sensitiv beschrieben (Smyth et al., 2001a).
- **P815** (Ralph et al., 1976): Mast Zell Hybridoma (H2K^b)

- **CT26:** Kolonkarzinomlinie (H2K^d)
- **RMA** (Gays et al., 2000): NK Zellhybridoma (H2K^b)
 - **RMA-mOVA:** RMA Zellen transfiziert mit OVA

2.2.9 Verwendete Mauslinien

- **Wildtyp:**

C57BL/6N und J: Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotypen H2K^b (von Janvier (Frankreich)), Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn

Balb/c : Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotypen H2K^d (von Janvier (Frankreich)), Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn

CBA: Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotypen H2K^k, Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn

- **Transgene Linien:**

OT I- Rag^{-/-} -C57BL/6 (H2K^b) : CD8+ T- Zelltransgene Mauslinie. CD8+ T- Zellen exprimieren den $\alpha 2 / \nu \beta 5$ - TZR und erkennen das OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid präsentiert auf H2K^b, Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn (Hoquist, 1994)

DesTCR (H2K^k): CD8+ T- Zelltransgene Mauslinie. CD8+ T- Zellen erkennen 3 endogene, auf H2K^b präsentierte, Peptide, Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn

RAG2^{-/-} (H2K^b): RAG2- Gen (*recombinase activating 2*) defiziente Tiere, denen auf Grund der fehlenden Rekombination alle TZR- und BZR- tragenden Zellen fehlen. Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn.

DO11.10 (H2K^d): CD4+ T- Zelltransgene Mauslinie. CD4+ T- Zellen erkennen

auf I-A^d präsentierte OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid, Versuchstierhaltung
IMMEI und HET, Bonn

OT II (H2K^b): CD4⁺ T- Zelltransgene Mauslinie. CD4⁺ T- Zellen erkennen
auf I-A^b präsentierte OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid, Versuchstierhaltung
IMMEI und HET, Bonn

RIP-OVA10 (H2K^b): Expressieren OVA spezifisch im Pankreas unter dem
RIP- Promotor (*rat insuline promotor*), Versuchstierhaltung
IMMEI und HET, Bonn

PKB (H2K^b): Überexpressieren konstitutiv das Signaltransduktionsmolekül
Akt in T- Zellen, Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn

2.2.10 Verwendete rekombinante Viren

Die verwendeten Adenoviren wurden freundlicherweise von A. Untergasser und U. Protzer, Universität Köln, zur Verfügung gestellt.

- AdOVA: rekombinanter Adenovirus, der das Antigen Ovalbumin (OVA) unter dem CMV Promotor exprimiert

2.3 Methode

Applikation *in vivo*

Um Zusammenhänge und Abläufe des Immunsystems zu verstehen, wurden Versuche *in vivo* in Wildtyp oder Transgenen Mäusen durchgeführt. Dabei erfolgte die Applikation von Viren (Adenovirus) intravenös in einer Konzentration von 1×10^7 pfu ("plaque-forming units"). Der adoptive Transfer von Zellen oder die Gabe von löslichem Antigen (Ovalbumin) erfolgte ebenfalls durch intravenöse Applikation. Die Verabreichung von Antikörpern zur Depletion spezifischer Zellpopulationen *in vivo* erfolgte intraperitoneal. Im Rahmen der Versuche zur Untersuchung der oralen Toleranz wurde das Antigen (Ovalbumin) in Futterform gegeben

2.3.1 Isolierung primärer Zellen aus der Leber

Zur Entnahme aller Organe wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, mit 70% Ethanol abgesprüht und die Leibeshöhle bzw. der Brustkorb unter semisterilen Bedingungen eröffnet.

2.3.1.1 Perfusion der Leber

Eine effiziente Isolierung primärer Zellen aus der Leber setzte die Perfusion des gesamten Organs mit einem Kollagenase A- haltigen Puffer voraus.

Material: 0,45x 25mm, 26G Kanüle (braun)

Lösungen: Perfusionslösung: GBBS (Ca²⁺ reduziert), 0,05% (w/v) Kollagenase A,
4% (w/v) PFA Lösung

Methode: Nach Eröffnung des Peritonealraums wurde die Kanüle in die Pfortader (Vena porta) eingeführt, die untere Hohlvene (Vena cava inferior) durchtrennt und die Leber mit der Perfusionslösung 3-10 Sek. perfundiert. Anschließend wurde die Leber heraus präpariert und in ein Gefäß mit GBSS überführt.

Diente die Organentnahme der Herstellung von Schnittpräparaten, so wurde mit ca. 5ml 4% PFA- Lösung perfundiert und die Leber mittels eines Skalpells zerkleinert. Die Anfertigung von 50- 100µm Schnitte erfolgte an einem Vibratom.

2.3.1.2 Isolierung von LSEC via Elutriation

Die Elutriation (Gegenstromzentrifugation) ermöglicht eine Trennung hinsichtlich der Größe und Dichte der Zellen. Die Trennung erfolgt in einer Zentrifuge, welche über ein Schlauchsystem an eine peristaltischen Pumpe angeschlossen ist. Die Flussrate bedingt die Trennung der Zellen. Mit steigender Flussrate werden zunehmend größere Zellen, mit höherer Dichte isoliert. Diese werden aus der Zentrifugationskammer gespült und außerhalb der Zentrifuge gesammelt.

Material: Metallsieb (70µm), Zentrifuge: J2-MC mit Rotor 'JE-6B'

Lösungen: GBSS, Blockierungspuffer: PBS, 1% (w/v) BSA
LSEC – Medium (DMEM Medium high Glucose (4500mg/l)), 10% (v/v) FCS (-LPS), 10⁵U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin)

Methode: Die mit Kollagenase- A perfundierten Lebern wurden mit Hilfe einer gekrümmten Schere in einer Petrischale ausgestrichen, in ein Röhrchen überführt und weitere 20- 30Min. bei 37°C mit Kollagenase- A inkubiert. Die Suspension wurde mit Hilfe eines

Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, mit GBSS resuspendiert und zentrifugiert (10 Min., 350xg, 20°C). Das Pellet wurde mit 30% (w/v) Nycodenz im Verhältnis 1:1,23 resuspendiert (entspricht einer Dichte von 1,089g/cm³), in ein 15ml Röhrchen überführt und der Gradient bei 1400xg, 20Min., 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Bei diesem Gradienten werden die Parenchymzellen (Hepatozyten) von den anderen Leber- assoziierten Zellen getrennt. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, mit GBSS resuspendiert und zentrifugiert (10Min., 350xg, 20°C).

Der Rotor wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt und an das Pumpensystem angeschlossen. Das komplette Schlauchsystem wurde mit 70% Ethanol desinfiziert, mit PBS gespült und für ca. 30 Minuten mit Blockierungspuffer gefüllt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss daran wurde der Blockierungspuffer und etwaige Luftblasen mit GBSS ausgespült, die Pumpe auf eine Flussrate von 16ml/ Min eingestellt und die Zentrifuge gestartet (2500rpm, 24°C). Über einen Bypass wurden die Zellen in einem Volumen von 8ml in das System injiziert und durch öffnen des Bypasses in den Rotor gespült. Jeweils 100ml jeder Flussrate wurden gesammelt und dabei die Flussrate sukzessive von 16ml/ Min. (Erythrozyten) auf 22, 28 (portale und periportale LSEC), 32 (Mischfraktion aus LSEC und Kupferzellen) und 56ml/ Min. (Kupferzellen) erhöht. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend zentrifugiert (10Min., 350xg, 20°C) und die Zellen in LSEC Medium resuspendiert. Die Kultivierung der LSEC erfolgte in einer Kollagen beschichteten, oder einer speziellen („Corniche-„) 24- (0,8x10⁶ Zellen/ml) oder 96-Loch Zellkulturplatte (0,1x10⁶ Zellen/ml).

2.3.1.3 Isolierung Leber- assoziierter Lymphozyten

Material: Metallsieb (70µm)

Lösungen: Perfusionspuffer, PBS, Percoll/ PBS 40% (v/v) und 80% (v/v)

Methode: Nach Perfusion der Leber mit Kollagenase A., wie unter 2.2.1.1.beschrieben, wurden die Organe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, mit PBS resuspendiert und zentrifugiert (10Min. 350xg, 20°C). Die Zellen wurden in 4ml 40% Percolllösung resuspendiert und mit 3ml 80% Percolllösung unterschichtet. Der Gradient wurde bei 1400xg, 20Min. 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Der obere Hepatozytenring wurde abgenommen und verworfen. Die Interphase (Lymphozyten) wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 50ml PBS versetzt und zentrifugiert (10Min. 350xg, 20°C).

2.3.1.4 Isolierung spezifischer Zellen durch magnetische Zellseparation (MACS)

Isolierung von LSEC mit Hilfe der MACS Technologie

Mit Hilfe der MACS Technologie ist es möglich, einzelne Zellpopulationen von einander zu trennen. Magnetische Kügelchen („microbeads“, \varnothing ca. 50nm) beschichtet mit Antikörpern, spezifisch gegen bestimmte membranständige Oberflächenmoleküle, werden zu der Gesamtzellsuspension gegeben. Die Antikörper binden nur an die Zellen, die über das spezifische Epitop verfügen. Die Zellen werden auf eine Säule gegeben, welche mit Eisenwolle gefüllt ist und an der ein starkes Magnetfeld angelegt wird. Durch die magnetische Kraft bleiben nur die Zellen, die magnetische Kügelchen an ihrer Oberflächen tragen in der Säule hängen. Eluiert wird diese Zellpopulation nach entfernen des magnetischen Feldes.

Die Separation wurde automatisiert, nach Herstellerangaben, am AutoMACS der Firma Miltenyi unter Verwendung des Programms „Possel“ durchgeführt.

Die Isolierung von LSEC via dem MACS System erfolgte mit Hilfe von anti- LSEC Microbeads der Firma Miltenyi. Diese magnetischen Kügelchen sind mit dem Antikörper ME9F1 beschichtet, der spezifisch an sinusoidale Endothelzellen der Leber, glatte Muskelzellen und Basalmembran bindet.

Material: AutoMACS (Fa. Miltenyi)

Lösungen: MACS-Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA), anti-LSEC Microbeads

Methode: Die Isolierung der LSEC erfolgte gemäß dem Protokoll 2.3.1.2 bis zur Elutriation. Die Zellen wurden nach dem Nycodenz Gradienten in MACS- Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Entsprechend der Zellzahl wurden 1×10^7 Zellen in 90 μ l MACS- Puffer resuspendiert und 12 μ l anti-LSEC Microbeads zugegeben. Die Zellen wurden 15Min. bei 4°C inkubiert, anschließend 10ml MACS-Puffer zugegeben und zentrifugiert (10Min., 350xg, 20°C). Die Trennung der mit Microbeads markierten LSEC erfolgte im AutoMACS mit dem Programm „Possel“.

2.3.2 Isolierung primärer Zellen aus der Milz

2.3.2.1 Isolierung von CD8⁺ oder CD4⁺ T Lymphozyten

Material: Metallsieb (70 μ m)

Lösungen: PBS, MACS- Puffer

Methode: Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde die Milz von Fettgewebe und Blutgefäßen abgetrennt und in ein mit PBS gefülltes Röhrchen überführt. Mit Hilfe eines Spritzenstempels wurde die Milz durch ein Sieb gedrückt, mit PBS gespült und zentrifugiert

(10Min. 350xg, 20°C). Die Zellen wurden in 0,5ml MACS- Puffer resuspendiert, 20µl α-CD8 oder α-CD4 Microbeads zugegeben und bei 4°C 15Min. inkubiert. Nach Zugabe von 15ml MACS- Puffer wurden die Zellen zentrifugiert (10Min. 350xg, 20°C). Die Trennung der markierten Zellen erfolgte mit Hilfe des AutoMACS (Programm „Possel“).

2.3.2.2 Isolierung von CD11c⁺ dendritischen Zellen

Material: Metallsieb (70µm)

Lösungen: Perfusionspuffer (0,5% Kollagenase- A), PBS, MACS- Puffer

Methode: In die entnommene Milz wurde in einer Petrischale mit einer Kanüle Kollagenase A- haltiger Perfusionspuffer injiziert, das Organ grob mit einer Schere zerkleinert und 20Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Metallsiebes vereinzelt, in 50ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (10Min. 350xg, 20°C). Die Zellen wurden in 0,5ml MACS- Puffer resuspendiert und 20µl α-CD11c Microbeads zugegeben. Die Inkubation erfolgte 15Min. bei 4°C. Nach Zugabe von 15ml MACS- Puffer wurden die Zellen zentrifugiert (10Min. 350xg, 20°C). Die Trennung der markierten Zellen erfolgte mit Hilfe des AutoMACS (Programm „Possel“).

2.3.3 Isolierung primärer Zellen aus dem Knochenmark

Material: Metallsieb (70µm), 30G Kanüle

Lösungen: PBS

Methode: Die Ober- und Unterschenkelknochen wurden heraus präpariert und von Sehnen und Muskeln befreit. Die Knochen wurden jeweils kurz unterhalb der Gelenke mit einer Schere durchtrennt. Mit einer Kanüle wurde das Knochenmark mit PBS herausgespült und anschließend bis zur Einzelzellsuspension resuspendiert. Die Zellsuspension wurde filtriert und die Zellzahl bestimmt.

2.3.3.1 Generierung CD11c⁺ dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarkes

Material: Petrischalen

Lösungen: RPMI -Medium (10% (v/v) FCS (LPS frei), 10⁵U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin),

I-MDM - Medium(10% (v/v) FCS (LPS frei), 10⁵U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin)
rekombinantes Maus GM-CSF oder
Zellkulturüberstand der GM-CSF produzierenden Zelllinie Ag 8653

Methode: Die Knochenmarkzellen wurden in einer Dichte von 5x10⁶ Zellen/ 10ml Medium in Petrischalen überführt. Die Generierung CD11c⁺ Dendritischer Zellen erfolgte entweder durch Zugabe von 30% Ag8653- Überstand oder durch Zugabe von 2,5U rekombinantes Maus- GM-CSF zur Generierung tolerogener DC. Das Medium wurde alle 2 Tage abgesaugt und durch frisches ersetzt. Die Kultur erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen.

2.3.4 Isolierung von T- Lymphozyten und Dendritischen Zellen aus peripheren Lymphknoten

Material: Metallsieb (70µm), 30G Kanüle

Lösungen: PBS, MACS-Puffer

Methode: Je nach Fragestellung, wurden die Zellen aus den inguinalen und axillären oder aus den mesenterischen Lymphknoten isoliert. Dazu wurden die Lymphknoten vorsichtig frei präpariert und in ein Röhrchen mit PBS gegeben. Mit Hilfe von 2 Kanülen wurde die Kapsel der Lymphknoten in einem 70µm Sieb auseinander gezogen und die Zellen anschließend durch ein Sieb vereinzelt. CD11c⁺ dendritische Zellen und CD8⁺ T Zellen wurden, wie in 2.3.2 beschrieben, aufgereinigt. Antigen- spezifische regulatorische CD4⁺ T- Zellen wurden aus den mesenterischen Lymphknoten von Tieren isoliert, welche 10 Tage mit OVA gefüttert wurden. Die Isolierung erfolgte über eine Anreicherung der CD4⁺ T- Zellen, indem CD11c⁺, CD8⁺ und CD19⁺ Zellen mit Hilfe der MACS Technologie depletiert wurden.

2.3.5 Zellkulturmethoden

2.3.5.1 Ermittlung der Zellkonzentration

Material: Zählkammer Neubauer

Lösungen: Trypanblau- Lösung: 1:10 (v/v) Verdünnung der 0,4% Stammlösung in PBS

Methode: Die Zellsuspension wurde 1:10 – 1:100 mit der Trypanblau- Lösung verdünnt und 10µl auf die Neubauer Zählkammer aufgebracht. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte

durch Auszählen von 16 kleinen Außenquadraten, wonach sich die Zellzahl wie folgt berechnen ließ:

Anzahl der gezählten Zellen x Verdünnungsfaktor x 10.000 (Kammerfaktor) = Zellzahl/ml

Bei der Zählung wurden nur vitale Zellen berücksichtigt, die in der Lage sind, den Farbstoff Trypanblau aktiv aus dem Zytoplasma hinaus zu transportieren. Tote Zellen sind dazu nicht in der Lage und erscheinen im Mikroskop dunkelblau.

2.3.5.2 Kultivierung primärer Zellen *in vitro*

Material: Zellkulturplatten (24 oder 96-well)

Lösungen: T- Zell oder DC Medium: RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 10^5 U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol
LSEC – Medium : D-MEM (4000 Glucose), 10% (v/v) FCS, 10^5 U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin

Methode: T- Lymphozyten wurden in T- Zell Medium in einer Zellzahl von $0,8- 1 \times 10^6$ Zellen/ well in einer 24-Loch Platte, bzw. in einer Konzentration von $0,1- 0,2 \times 10^6$ Zellen/well in einer 96-Loch Platte kultiviert.

LSEC wurden in speziellen „Corniche“ Platten, oder in, mit Kollagen beschichteten Platten, in einer Konzentration von $0,8 \times 10^6$ Zellen/ well in einer 24-well Platte oder in einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen in einer 96-well Platte in LSEC- Medium kultiviert.

2.3.5.3 Zelllinien und ihre Propagation

Material: 75- 500ml Flaschen

Lösungen: Medien: RPMI 1640, 5% (v/v) FCS (Hitzeinaktiviert), 10^5 U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin,
DMEM, 5% (v/v) FCS (Hitzeinaktiviert), 10^5 U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin
Trypsin- EDTA, PBS

Methode: Die Kultivierung der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen. Suspensions- un adhärenente Zellen wurden je nach Wachstumseigenschaften 1:2 bis 1:10 gesplittet. Adhärenente Linien wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin- EDTA abgelöst.

2.3.5.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Material: 1ml Kryoröhrchen, Einfrierbehälter „Kryo“

Lösungen: Einfriermedium: 10% (v/v) DMSO in FCS

Methode: Die Zellen (Zelllinie oder primäre Zellen) wurden in einer Konzentration von $10\text{-}20 \times 10^6$ Zellen zunächst zentrifugiert und das Zellsediment in 0,5- 1ml Einfriermedium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1ml Kryoröhrchen überführt und in einem Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren. Der Einfrierbehälter enthält Isopropanol, welches gewährleistet, dass die Zellen mit einer Geschwindigkeit von $-1^\circ\text{C}/\text{Min}$ auf -80°C abgekühlt werden. Nach 12h bei -80°C können die Zellen zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.3.6 Immunfluorometrische Methoden

2.3.6.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht die Untersuchung einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Immunfluoreszenzmarkierung. Dabei werden die Zellen durch eine Kapillare in einer Hüllflüssigkeit (*sheat fluid*) einzeln an monochromatischen Lasern vorbei geführt (Argonlaser $\lambda = 488\text{nm}$ bzw. Helium-Neon Laser $\lambda = 635\text{nm}$). Das dabei gestreute Licht wird von hochsensiblen Photozellen (*Photomultiplier*) detektiert und in elektronische Signale umgewandelt. Dabei gibt das Licht, welches in einem Winkel von $2\text{-}10^\circ$ von der Zelle aus detektiert wird, (*forward scatter*) Informationen über die Größe der Zelle. Licht, welches in einem Winkel von 90° detektiert wird, erlaubt eine Aussage über die Granulierung der Zelle (*sideward scatter*). Bei der Verwendung von Fluorochromen, welche an Antikörper konjugiert bestimmte Zellpopulationen identifizieren können, kommt es bei Passieren des Laserstrahles zu einem kurzfristig angeregten Zustand der Elektronen, die im Folgenden wieder auf ihr Energieniveau zurückfallen und dabei charakteristisches Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses wird durch Einsatz spezieller Filter vor den Sensoren detektiert. Die Analyse der Zellgröße, -granularität und bestimmter Fluorochrommarkierter Moleküle erlaubt eine Charakterisierung einzelner Zellen in einer komplexen Zellsuspension.

2.3.6.2 Markierung von Oberflächenantigenen und Fixierung

Zur Immunfluoreszenzmarkierung wurden entweder direkt einem Fluorochrom gekoppelte Antikörper, biotinierte oder unmarkierte Antikörper verwendet. Bei biotinierten Antikörpern folgte ein weiterer Färbeschritt mit einem Fluorochrom- Streptavidin Konjugat, bei unmarkierten erfolgte die Markierung mit einem Spezies- spezifischen Fluorochrom Konjugat.

Material: Durchflusszytometer (FACS- Calibur, LSR II, Canto)
96-Loch Mikrotiterplatten mit spitzem bzw. rundem Boden
Einmalröhrchen, Polystyren- 6,0/38mm
Einmalröhrchen, Polypropylen- 12/75mm

Lösungen: FACS - Puffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid
BACS - Puffer: PBS, 2% (v/v) BSA, 0,1% (w/v) Natriumazid

Methode: Die Zellen wurden in einer Konzentration von $5-10 \times 10^6$ Zellen/ ml in FACS-Puffer resuspendiert und jeweils 100µl zur Färbung in 96-Loch Platten oder in Einmalröhrchen überführt. Die Antikörper wurden in zuvor titrierter Konzentration zugegeben. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen, z.B. durch Fc- Rezeptoren auf der Oberfläche bestimmter Zellen, wurde dem Antikörpermischung stets 10µl/ml α -CD16/32 (2.4G2) Antikörper zugegeben. Die Färbung von Oberflächenantigenen erfolgte für 20Min. auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit FACS- Puffer gewaschen (2 Min., 350g, 4°C). Eine Fixierung im Anschluss an eine Oberflächenfärbung oder vor einer intrazellulären Färbung, erfolgte mit 2% Paraformaldehyd für 15 Min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das PFA mit FACS- Puffer gewaschen (2 Min., 350g, 4°C).

2.3.6.3 Färbung intrazellulärer Antigene

Material: Durchflusszytometer (FACS- Calibur, LSR II, Canto)
96-Loch Mikrotiterplatten mit spitzem bzw. rundem Boden

Lösungen: FACS - Puffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid
Saponinpuffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid,
0,5% (w/v) Saponin

Methode: Einer intrazellulären Färbung ging stets eine Oberflächenantigenmarkierung und anschließende Fixierung mit PFA voraus. Die Zellen wurden mit Saponinpuffer zunächst 20 Min. bei RT permeabilisiert. Darauf folgte eine 30 Min. Inkubation mit dem spezifischen

Antikörper in Saponinpuffer. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit Saponinpuffer und einmal mit FACS- Puffer gewaschen (2 Min., 350g, 4°C).

2.3.6.4 Färbung CD8+ T- Zellen mit H2K^b- Tetrameren

Die Detektion OVA- spezifischer CD8+ T- Zellen *ex vivo* erfolgte mit Hilfe von H2K^b- Tetrameren, die mit dem Peptid SIINFEKL (S8L-Tet) beladen waren. Die verwendeten Tetramere waren direkt mit dem Fluochrom Alexa647 konjugiert.

Material: Durchflusszytometer (FACS- Calibur, LSR II, Canto)

Lösungen: BACS Puffer: PBS + 10% BSA

Methode: Die Färbung Tetramer- positiver Zellen erfolgte immer zusammen mit einer Färbung von CD8 α und CD11a. Die Zellen wurden zunächst in 30 μ l BACS- Puffer aufgenommen, 6 μ l der Tetramere zugegeben und 20Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Färbung mit α -CD8 und α -CD11a Antikörpern, welche in einem Volumen von 20 μ l zugegeben wurden. Die Färbung erfolgte für weitere 20Min. bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen mit BACS- Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Die Detektion S8L-Tet. positiver T-Zellen erfolgte am Durchflusszytometer.

2.3.6.5 Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen

Die Markierung intakter Zellen erfolgte mit den Farbstoffen CFSE (488nm) oder DDAQ-SE (647nm). Beide Farbstoffe können die intakte Zellmembran passieren und werden intrazellulär von Esterasen gespalten. Die dabei entstehenden reaktiven Gruppen binden kovalent an bestimmte Aminosäuren intrazellulärer Proteine. Die Fluoreszenzmarkierung von Zellen wurde zu Proliferationsstudien, Zytotoxizitätstests (*in vivo* oder *in vitro*) und zur Analyse bestimmter Zellpopulation *in vivo* eingesetzt.

Lösungen: PBS

Methode: Die zu markierenden Zellen wurden in einer Konzentration von 1- 10x10⁶ /ml in PBS resuspendiert und 1- 10 μ M CFSE oder max. 5 μ M DDAO-SE zugegeben. Die Färbung erfolgte 15 Min. bei 37°C. Anschließend wurde freier Farbstoff durch Zugabe von 1ml FCS gebunden und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (10 min., 300g, 20°C).

2.3.6.6 Durchflusszytometrische Analyse der Zellproliferation

Um die Teilung von Zellen *in vitro* oder *in vivo* zu untersuchen wurden diese mit 1- 2,5µM CFSE markiert. Bei jedem vollständigen Zellzyklus halbiert sich die Intensität des intrazellulär gebundenen Farbstoffes. Dies kann durchflusszytometrisch analysiert werden und gibt z.B. Aufschluss über die Anzahl der Teilungen. Die am Durchflusszytometer gemessenen Daten wurden mit dem Programm FloJow ausgewertet. Dabei wurde auch das Proliferationstool verwendet.

2.3.6.7 nicht-radioaktiver Zytotoxizitätstest

Bei dieser Methode wurden die Zielzellen nicht radioaktiv markiert sondern ebenfalls mit CFSE gefärbt.

Lösungen: PBS, Peptid

Methode: Bei dem *in vivo* Zytotoxizitätstest wurde eine Suspension Milzzellen in zwei Ansätze geteilt. Die eine Population der Zielzellen (T = *targets*) wurde mit dem spezifischen Antigen (z.B. 1µM SIINFEKL- Peptid) beladen und mit einer hohen Konzentration CFSE (2,5µM) markiert. Die andere Population diente als interne Kontrolle (C = *control*), wurde nicht mit Antigen beladen und mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,25µM) markiert. Nach dreimaligen waschen der Zellen mit PBS, um freies Antigen zu entfernen, wurden beide Population in einem Verhältnis 1:1 gemischt und 1×10^7 Zellen/ Maus intravenös injiziert. Je nach Versuch wurden die Mäuse nach 4 Stunden oder 18 Stunden getötet und Organe, wie Milz, Leber und Lymphknoten im Durchflusszytometer analysiert.

Zur Berechnung der spezifischen Zytotoxizität wurde mit Hilfe des Programm "FloJow" das Verhältnis (Ratio = R) der Zellzahl der Targetzellen (RT) zu der Ratio der Kontrollzellen (RC) ermittelt. Dieses Verhältnis RT : RC wurde in den Kontrolltieren (KT) gemittelt. Die spezifische Zytotoxizität in den Versuchstieren (VT) wurde mit folgender Gleichung in Excel (Microsoft) berechnet:

$$\text{spezifische Zytotoxizität \%} = 100 - ((RT: RC)VT * 100) / (RT: RC)KT$$

Bei dem *in vitro* Zytotoxizitätstest wurden Zellen einer Tumorzelllinie (RMA) als Targetzellen verwendet, die wie beschrieben behandelt wurde.

2.3.7 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren um z.B. Proteine in einer Probe bis in den Pikogrammbereich zu quantifizieren. Der Sandwich- ELISA verwendet dabei zwei für

das Protein spezifische Antikörper. Der erste Antikörper bindet das in der Probe befindliche spezifische Protein und immobilisiert es auf der ELISA- Platte. Der zweite Antikörper dient der Detektion und bindet an ein nicht- kompetitives zweites Epitop des Proteins. Dieser Antikörper ist in der Regel biotiniert und erlaubt so die Bindung des mit Streptavidin-konjugierten Enzyms Peroxidase. Dieses Enzym setzt ein Substrat in ein farbiges Produkt um. Die Intensität des Farbumschlages ist äquivalent zur Menge des gebunden Enzyms und damit zur Menge des immobilisierten Proteins.

2.3.7.1 Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen

Material: "MaxiSorp"96-Loch Mikrotiterplatten mit flachem Boden
Mirkotiterplatten- Waschgerät
ELISA- Reader

Lösungen: Coating-Puffer: 0,1M Na₂ HPO₄ , pH 8,5
Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20
Blockierungspuffer: PBS, 1% BSA
ABTS Puffer: 0,1M Na₂ HPO₄, pH 4,2 (eingestellt mit 1M Zitronensäure)
Detektionslösung: ABTS-Puffer, 1mg/ml ABTS, 2ml/ml 30% H₂O₂

Methode: Die 96- Loch Mikrotiterplatten wurden zunächst mindestens 4 Stunden mit dem ersten unkonjugierten Antikörper in einem Volumen von 100µl/ Loch beschichtet. Die Konzentration der Antikörper wurde zuvor ausgetestet. Die Inkubation erfolgte bei 4°C. Der Antikörper wurde im Folgenden verworfen und die Platten extensiv gewaschen. Zum absättigen noch freier Bindungsstellen auf der ELISA- Platte wurde der Blockierungspuffer zugegeben und mindestens 30 Min. inkubiert. Nach wiederholtem waschen der Platte wurden die Zellkulturüberstände in einem Volumen von 100µl/ Loch aufgetragen, dabei wurden stets Triplikate angesetzt. Die Quantifizierung eines bestimmten Zytokins erfolgte durch eine definierte Verdünnungsreihe des entsprechenden rekombinaten Zytokins. Die Überstände wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag verworfen und die Platte erneut extensiv gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Zugabe des zweiten, Biotin- markierten, Antikörpers. Dieser wurde mindestens 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Enzym Peroxidase (1:1000 Verdünnung) zugegeben und 30 Min. inkubiert. Weiteren Waschschriften schloss sich die Zugabe des, zuvor frisch angesetzten, ABTS Substrates an. Der Farbumschlag des Substrates wurde am ELISA- Reader registriert und die Platten mehrmals gemessen. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit Excel. Die Quantifizierung von Zytokinen erfolgte in der Regel nach Restimulation von 0,5- 2x10⁵

Zellen in einem Volumen von 100- 200µl über Nacht. T- Lymphozyten wurden dabei entweder antigenspezifisch oder unspezifisch mit α -CD3 Antikörpern in 96- Loch Mikrotiterplatten restimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und entweder direkt auf die ELISA Platten gebracht oder bei -20°C eingefroren.

2.3.8 Molekularbiologische Methoden

2.3.8.1 DNA Präparation aus Gewebe

Die Präparation von DNA erfolgte zur Typisierung von Mauslinien aus Gewebe der Schwanzspitze.

Material: Schere, Eppendorf- Reaktionsgefäße 1,5ml

Lösungen: TE- SDS Puffer (1M Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M EDTA, pH 8,0, 10% SDS),
Proteinase K (20mg/ml), Isopropanol, Ethanol

Methode: Die Schwanzspitze wurde mit Hilfe einer Schere abgetrennt und in ein 1,5ml Eppendorf- Gefäß überführt. Im Folgenden wurden 500µl TE- SDS Puffer und 50µl Proteinase K zugesetzt und das Gewebe über Nacht bei 56°C im Heizblock inkubiert. Durch starkes schütteln und vortexen wurde die DNA aus den Zellen freigesetzt und alle zellulären Bestandteile durch Zentrifugation (10 Min., 13000xg, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde in neue Gefäße überführt und die enthaltene DNA mit 400µl Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (10 Min., 13000xg, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die DNA mit 300µl Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Ethanol verworfen und die DNA 5- 10 Min. getrocknet. Zur weiteren Analyse wurde die DNA in 100µl sterilem H_2O versetzt und 10 Min. bei 65°C gelöst.

2.3.8.2 PCR Reaktion

Die Typisierung der Mauslinie PKB erfolgten durch PCR Reaktion. Bei der Typisierung der PKB Mäuse wurden folgende Primer verwendet:

beta-actin for GTC GTA CCA CAG GCA TTG TGA TGG

beta- actin rev GCA ATG CCT GGG TAC ATG GTG G

Produktgröße 491bp

OVA for ATG GGC TCC ATC GGC GCA GC

OVA rev GAT GAG CTC TCT GGC TTG ATC TGC

Produktgröße ca. 400bp

VA for AGA TTT CCT GTC CCC TCT CAG G

VA rev TGT TGG ACC CAG CTT TGC AG

Produktgröße 361bp

Material: PCR - Gefäße, PCR Maschine

Lösungen: Primer, dNTP (10mM), MgCl₂ (25mM), 5x PCR- Puffer (Invitrogen), Taq-Polymerase (5U/ µl)

TE- Puffer (1M Tris-HCl pH 8,0, 0,5M EDTA pH 8,0), 5x Probenpuffer

Methode: Für die PCR Reaktion wurde zunächst ein Mastermix angesetzt:
einfach:

1µl Primer (10µM)

0,1µl dNTP (10mM)

2µl MgCl₂ (25mM)

4µl 5x Puffer

10,5µl H₂ O

0,1µl Taq- Polymerase

1- 2µl DNA wurden am Ende zugegeben. Der Mastermix wurde bei 4°C angesetzt.

Die PCR zur Typisierung der PKB Mäuse wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

1 Zyklus 95°C 5 Min.

31 Zyklen 94 °C 1 Min.

56°C 1 Min.

72°C 1 Min.

1 Zyklus 72°C 5 Min.

4°C

2.3.8.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte mit einer Agarosegelelektrophorese. Mit Hilfe eines Größenmarkers wurde die Produktgröße bestimmt.

Material: Gelkammer, Gelkämme, Elektrophoreseapparatur, Power- Supply, UV- Lampe

Lösungen: Agarose, TE- Puffer (1M Tris-HCl pH 8,0, 0,5M EDTA pH 8,0), Ethidiumbromid

Methode: 3g Agarose wurden mit 150ml TE- Puffer versetzt und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Dem Gel wurde 15µl Ethidiumbromid zugesetzt, das flüssige Agarosegel in die Kammer gegossen und die Probenkämme eingesetzt. Nach dem Erkalten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TE - Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit 7µl 5x Probenpuffer gemischt und 15- 20µl in die Taschen gefüllt. Die PCR Produkte wurden anschließend 30- 40 Min. bei 120V und 400mA aufgetrennt. Mit Hilfe einer UV- Lampe wurden die aufgetrennten PCR Produkte detektiert und auf ihre Größe analysiert.

2.3.9 Proteinchemische Methoden

Analyse der Expression intrazellulärer Proteine mit Hilfe des Western Blot

Verfahrens

Bei einem Western Blot werden Proteine die zuvor in einer Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Trägermembran transferiert. Die Immobilisierung auf einer Membran ermöglicht den weiteren immunologischen Nachweis eines bestimmten Proteins mit Hilfe spezifischer Antikörper.

2.3.9.1 Zellyse

Material: Eppendorf- Gefäße 1,5ml

Lösungen: Lysepuffer RIPA (25mM Tris/HCl pH8, 150mM NaCl, 0,5% Natriumdeoxycholat, 1% Nonidet P-40, 10% Glycerin, 2mM EDTA, 0,1% SDS); Proteinase- Inhibitoren (10µg/ml Leupeptin, 10µg/ml Aprotinin, PMSF (gesättigte Lösung 1:1000 verd.))

Methode: Dem Lysepuffer wurden die Proteinase- Inhibitoren zugeben, die Zellen damit resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen zentrifugiert (13000xg, 5 Min., 4°C) und der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

2.3.9.2 SDS- PAGE aus Zell-Lysaten

Material: SDS- Gelkammer, SDS- Laufkammer, Power Supply

Lösungen: 5x Probenpuffer (1M Tris/ HCl pH 6,8, 10% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 1M DTT),
Laufpuffer (25mM Tris-Base, 250mM Glycin, 0,1% SDS)

Methode: Die Zell-Lysate wurden mit 5x Probenpuffer versetzt, 5 Min. bei 98°C aufgeköcht und ausgefallene Bestandteile durch Zentrifugation (13000xg, 5 Min., 4°C) abgetrennt. Es wurde ein vorbereitetes Polyacrylamid- Gel bestehend aus einem 10%igen Trenngel (Proteingröße von 15- 100kDA) und ein 5%iges Sammelgel zur Auftrennung der Proteine verwendet. Jeweils 20µl wurden pro Tasche eingefüllt und ein entsprechender Größen- Marker auf jedes Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte ca. 15 Min. bei 60V (sammeln der Proteine im Sammelgel) und anschließend 2 Stunden bei 90V.

2.3.9.3 Western Blot, („semidry“)

Material: Nitrocellulose, Blotkammer, Filterpapier

Lösungen: Blotpuffer (192mM Glycin, 25mM Tris/Base, 20% Methanol),
TBST (50mM Tris/HCl pH 7,5, 140mM NaCl, 0,05% Tween 20),
Blockierungspuffer: 5% Milchpulver in TBST,
Entwicklungsreagenz: NBT und BCIP (Promega)

Methode: Die verwendete Nitrocellulosemembran wurde zunächst aktiviert. Dazu wurde sie 15 Sek. in Methanol und anschließend 2 Min. in H₂O bidest. getaucht. Im Anschluss daran wurde sie mind. 5 Min. in Blotpuffer äquilibriert. Das Gel und die verwendeten Filter wurden zuvor ebenfalls in Blotpuffer äquilibriert. Der Blot wurde anschließend wie folgt zusammengesetzt:

Anode

3 Filterpapiere

Membran

Gel

3 Filterpapiere

Kathode.

Vor dem Zusammensetzen der Blotkammer wurde überschüssiger Puffer auf der Anode entfernt. Der Blot erfolgte mit 3mA/ cm² Gel für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran herausgenommen und zunächst mit einer "Ponceaurot Färbung" die Qualität des

Blotvorgangs sichtbar gemacht. "Ponceaurot" färbt dabei reversibel die Proteine die während des Blotvorgangs von dem Gel auf die Membran transferiert wurden. Der Farbstoff wurde mit H₂O bidest. entfernt.

Die Detektion eines bestimmten Proteins auf der Nitrocellulosemembran erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Dazu wurden freie Bindungsstellen auf der Membran zunächst mit 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Membran wurde anschließend 3- 4mal jeweils 10 Min. mit TBST Puffer gewaschen und der erste Antigen-spezifische Antikörper in einer zuvor titrierten Konzentration zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT unter langsamen Schwenken für 1 Stunde. Nach extensivem waschen der Membran wurde der Detektionsantikörper, welcher spezifisch für die Spezies des Erstantikörpers ist, zugegeben. Dieser Antikörper ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert, welche bei der Entwicklung ein Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei RT ebenfalls unter leichtem Schwenken. Nach 4 gründlichen Waschschritten mit TBST -Puffer wurde das Substrat bestehend aus NBT und BCIP zu gegeben. Die alkalische Phosphatase setzt dabei das Substrat in ein farbiges Produkt um, welches sich genau an den Stellen auf der Membran niederschlägt an denen der Detektionsantikörper an den primären Antikörper gebunden hat. Die Intensität der entstehenden Banden ist äquivalent zur Menge des Enzyms und damit zur Menge des ersten Antikörpers und des gesuchten Proteins auf der Membran.

2.3.10 Statistische Analyse

Fehlerabweichungen sind, soweit nicht anders angegeben, als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Excel, dazu wurde zunächst aus Einzelwerten die Standardabweichung berechnet und daraus der Standardfehler des Mittelwertes ermittelt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige t- Test verwendet. Die Berechnung der Signifikanz eines subcutanen Tumorwachstums erfolgte mit Hilfe des *logrank*- Tests.

3 Zielsetzung

Die Induktion peripherer Toleranz ist ein Schutzmechanismus, um Reaktionen des Immunsystems gegen sich selbst zu kontrollieren. Ein Verlust dieser Toleranz kann zu gravierenden und oft unheilbaren Autoimmunkrankheiten führen. Die Leber spielt bei der Induktion und Aufrechterhaltung von Immuntoleranz eine wesentliche Rolle. Als ein zentrales Filterorgan des Organismus gelangen Antigene mit dem Blut in die Leber. Eine sessile antigen- präsentierende Population von Zellen, die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC), sind in der Lage, sehr effektiv Antigene aufzunehmen. Die LSEC verfügen über alle Moleküle, die für die Interaktion mit naiven T- Zellen nötig sind (wie z.B. MHC Klasse I und II Moleküle, Kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86)). Eine weitere Besonderheit dieser residenten Zellpopulation ist, dass sie in der Lage sind, aufgenommene Antigene zu prozessieren und Peptide auf MHC Klasse I Molekülen zu kreuzpräsentieren. Die Interaktion von naiven CD8+ T Zellen mit antigenpräsentierenden LSEC führt jedoch nicht zu einer Aktivierung der T- Zelle, sondern zu einer antigen- spezifischen Toleranz (Limmer et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte einerseits untersucht werden, ob LSEC an der Induktion oraler und Tumorantigen- spezifischer Toleranz beteiligt sind. Des Weiteren sollten die Mechanismen der LSEC- vermittelten Toleranzinduktion auf zellulärer Ebene näher charakterisiert werden, um somit zum Verständnis einer Leber- vermittelten peripheren Immuntoleranz beizutragen.

Daraus ergaben sich die folgenden Fragestellungen:

- Tragen LSEC zu der Entstehung oraler Toleranz bei?
Nehmen LSEC Antigene, die aus dem Gastrointestinaltrakt über den Blutstrom in die Leber gelangen auf und sind sie in der Lage diese naiven CD8+ T- Zellen gegenüber zu kreuzpräsentieren? Resultiert diese Kreuzpräsentation in einer systemischen T- Zelltoleranz?
- Welche Rolle spielen die LSEC bei Induktion einer Tumorantigen- spezifischen Toleranz?

Wie entsteht, trotz einer primären Immunantwort gegenüber metastasierender Tumorzellen in der Leber, langfristig eine Tumorantigen- spezifische Immuntoleranz?

- Wie verläuft die Toleranzinduktion naiver CD8+ T- Zellen im Zuge der Interaktion mit antigenpräsentierenden LSEC? Können exogene Faktoren die Toleranz beeinflussen?

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle der LSEC bei der Präsentation oraler Antigene und Induktion oraler Toleranz

Orale Antigene, die im Darm resorbiert werden, gelangen über das Blut schnell in den ganzen Organismus. Die Leber ist über die Portalvene direkt, durch die Blutzirkulation, dem Gastrointestinaltrakt angeschlossen. Erste Hinweise, dass die Leber bei der Entstehung oraler Toleranz eine wesentliche Rolle spielt, demonstrierten Versuche bei denen die Blutdrainage vom Darm zur Leber abgezweigt wurde (Callery, 1989, Yang 1994). Dies hatte einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung oraler Toleranz.

4.1.1 Aufnahme und Kreuzpräsentation oraler Antigene durch LSEC

Nährstoffe aus dem Gastrointestinaltrakt gelangen über die Portalvene in die Leber. Die LSEC haben hier u.a. die Funktion, Moleküle aus dem Blut zu eliminieren bzw. an die Hepatozyten zur Metabolisierung weiterzuleiten. Um zu untersuchen, ob LSEC in der Lage sind, orale Antigene aufzunehmen und zu präsentieren, wurde C57BL/6 Mäusen das Modellantigen Ovalbumin (OVA) in fester Form gefüttert und nach 24 Stunden die LSEC aus der Leber isoliert. Um festzustellen, ob LSEC oral aufgenommenes Antigen kreuzpräsentieren, wurden sie *in vitro* mit der OVA- Peptid (SIINFEKL) spezifischen T-Zelllinie (B3Z) kokultiviert. B3Z sind in der Lage auf H2K^b präsentierte SIINFEKL Peptid zu erkennen und daraufhin Interleukin-2 (IL-2) in den Überstand zu sekretieren (Abb. 4.1).

Abb. 4.1:

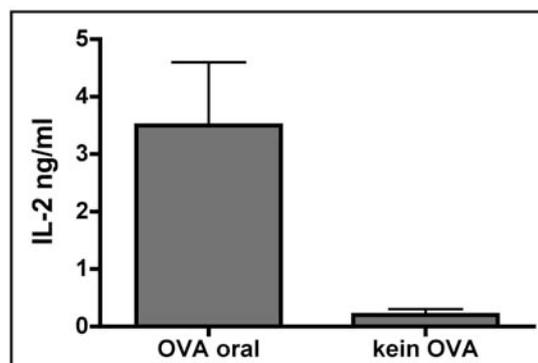


Abb. 4.1: Aufnahme und Kreuzpräsentation von Ovalbumin, nach Fütterung, durch LSEC.

C57BL/6 Mäuse wurden 24 Stunden mit Ovalbumin gefüttert oder erhielten normales Futter (kein OVA.). Die LSEC wurden isoliert und 18 Stunden mit der SIINFEKL- spezifischen T- Zelllinie B3Z kokultiviert. Die Menge an sekretiertem IL-2 wurde mit Hilfe des Sandwich- ELISA Verfahren quantifiziert.

Abb. 4.1 zeigte, dass LSEC, isoliert aus Mäusen die 24 Stunden mit OVA gefüttert wurden, in der Lage waren, OVA effizient aus dem Blut aufzunehmen und auf MHC Klasse I an OVA-spezifische CD8+ T- Zellen zu kreuzpräsentieren.

4.1.2 Kreuzpräsentation oraler Antigene durch LSEC induzierte eine spezifische Toleranz in naiven CD8+ T- Zellen *in vivo*

LSEC exprimieren, wie professionelle Antigen- präsentierende Zellen (APC), MHC Klasse I und II, sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Sie sind in der Lage, mit naiven CD8+ T- Zellen antigen- spezifisch zu interagieren. Diese Interaktion führt allerdings zu einer antigen- spezifischen Tolerisierung naiver CD8+ T- Zellen, die sich in einem Verlust der Zytotoxizität und fehlender Produktion pro- inflammatorischer Zytokine (z.B.: IFN γ und IL-2) äußert (Limmer et al., 2000).

T- Zellen, die nach Restimulation keine zytotoxische Aktivität oder IFN γ - Produktion mehr aufweisen, werden in der vorliegenden Arbeit als tolerant bezeichnet.

Wie in Abb. 4.1 gezeigt, waren LSEC in der Lage oral applizierte Antigene aufzunehmen und an CD8+ T- Zellen zu kreuzpräsentieren. Daraus ergab sich die Frage, ob LSEC durch ihre Eigenschaft als tolerisierende APC Population der Leber dazu beitragen, orale Toleranz zu etablieren. Um dies zu klären, wurden *in vivo* Transferexperimente in RAG2- defiziente Mäuse durchgeführt. Diese Tiere verfügen nicht über ein eigenes T- oder B- Zell Repertoire, da ihnen das Gen zur Rekombination des T- oder B- Zellrezeptors fehlt.

RAG2^{-/-} Mäuse wurden zunächst mit 5×10^6 naiven OVA- spezifischen, transgenen CD8+ T- Zellen (OT-I) rekonstituiert. 18 Stunden später wurden adoptiv 10×10^6 LSEC oder 5×10^6 Milz DC bzw. keine APC transferiert. LSEC und Milz DC wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert, welche zuvor über einen Zeitraum von 10 Tagen mit OVA gefüttert wurden. In ähnlichen Transferexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass transferierte LSEC in der Lage sind, orthotrop in die Leber zu implantieren (Limmer et al., 2000). Der Transfer von Milz DC diente als Positivkontrolle.

Nach einem Zeitraum von 10 Tagen wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt (Abb. 4.2a). Zudem wurden die T- Zellen aus der Milz isoliert und *in vitro* mit SIINFEKL-präsentierenden RMA Zellen restimuliert, um die Menge an IFN- γ im Überstand zu quantifizieren (Abb. 4.2b).

Abb. 4.2:

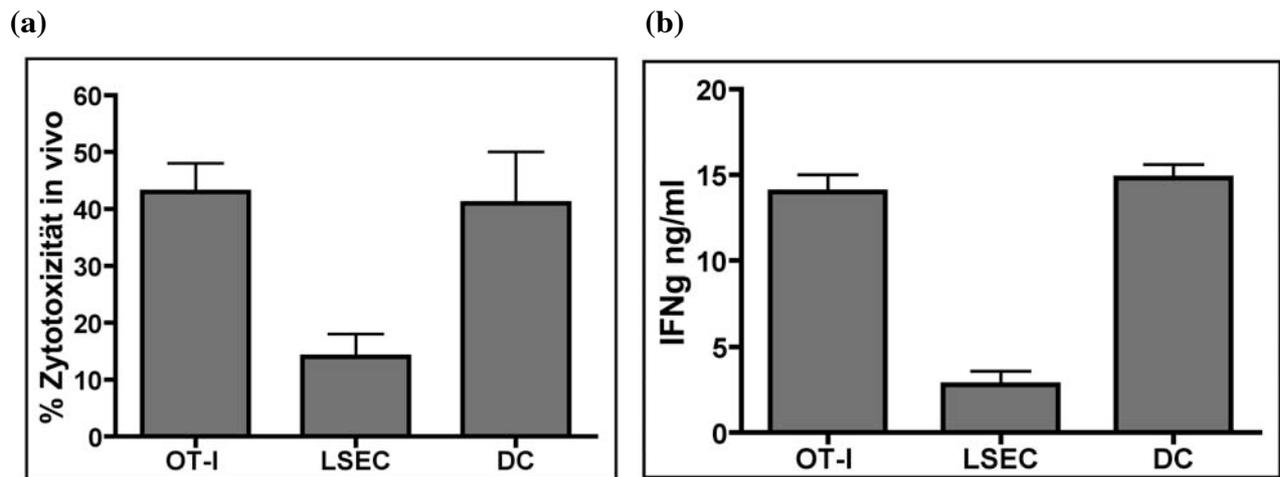


Abb. 4.2: LSEC oder DC von OVA- gefütterten C57BL/6 Mäusen wurden adoptiv in RAG2^{-/-} Mäuse transferiert, welche 24 Stunden zuvor mit naiven OT-I T- Zellen rekonstituiert wurden. (a) *In vivo* Zytotoxizitätstest, (b) nach Restimulation *in vitro* mit SIINFEKL- präsentierenden RMA Zellen, gemessene Menge an produziertem IFN γ im Überstand. Zur Quantifizierung von Zytokinen im ELISA, wurde stets die gleiche Anzahl an T- Zellen/ Versuchgruppe restimuliert (hier. $0,2 \times 10^6$ Zellen/ well) (5 Mäuse pro Gruppe)

Abb. 4.2 zeigt, dass nach Transfer von LSEC, isoliert aus OVA- gefütterten C57BL/6 Tieren, OT- I Zellen eine deutlich reduzierte zytotoxische Aktivität aufwiesen (Abb. 4.2a). Die OT-I T- Zellen produzierten nach Restimulation *in vitro* ebenfalls deutlich weniger IFN γ im Vergleich zu den Kontrollgruppen (PBS und DC) (Abb. 4.2b). Dies bedeutet, dass der Transfer von antigenpräsentierenden LSEC eine systemische Toleranz gegenüber einem oral applizierten Antigen induzierte. OT- I Zellen aus Mäusen, denen PBS oder Milz DC injiziert wurde, zeigten hingegen zytotoxische Aktivität und produzierten nach Restimulation IFN γ .

4.1.3 Abschalten aktivierter T- Zellen durch Induktion einer oralen Toleranz

In Abb. 4.2 konnte gezeigt werden, dass LSEC eine antigen- spezifische Toleranz in naiven T- Zellen induzierten und somit eine systemische Immunantwort verhindert wurde.

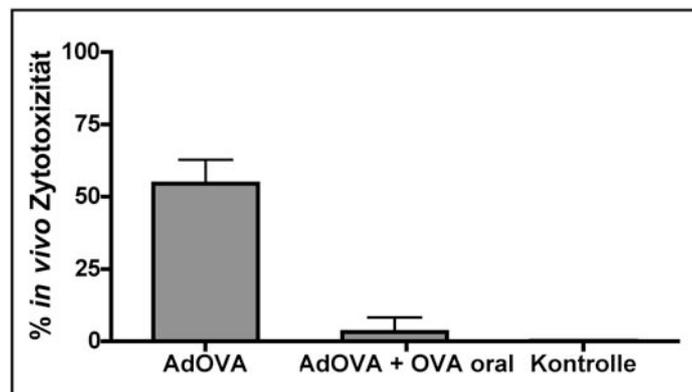
Im Folgenden stellte sich die Frage, ob durch die orale Gabe eines Antigens auch eine bereits bestehende Immunantwort beeinflusst werden könnte. Sind auch in dieser Situation LSEC in

der Lage Effektorzellen durch Toleranzinduktion zu kontrollieren und tragen sie somit zu einer systemischen Toleranz bei?

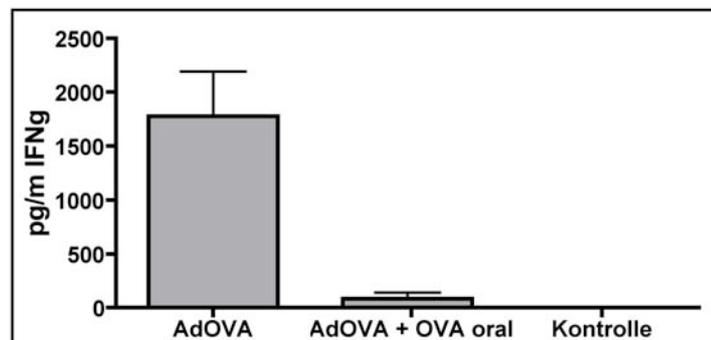
Ob die orale Gabe eines Antigens eine bereits etablierte Immunantwort beeinflussen kann, wurde zunächst *in vivo* untersucht. C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 mit einem rekombinanten Adenovirus (AdOVA) infiziert. AdOVA induziert in normalen C57BL/6 Mäusen eine äußerst starke Immunantwort. Diese führt zu einer starken Expansion OVA-Peptid (SIINFEKL) spezifischer CD8+ T- Zellen und ermöglicht eine Analyse dieser Zellen auch in nicht- transgenen Tieren. Ab Tag 7 wurde einer Gruppe OVA in Pellet- Form gefüttert. Die Analyse der Immunantwort erfolgte 10 Tage später an hand eines *in vivo* Zytotoxizitätstest, der Produktion von IFN γ nach Restimulation *in vitro* und der quantitativen Bestimmung SIINFEKL -spezifischer CD8+ T- Zellen in der Milz (Abb. 4.3).

Abb. 4.3:

(a)



(b)



(c)

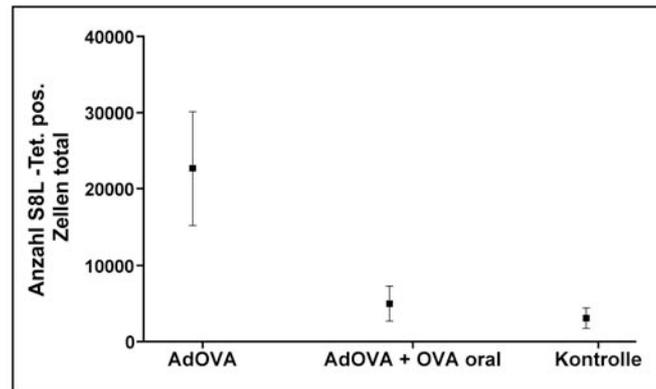


Abb. 4.3: Orale Gabe eines Antigens beeinflusste eine bereits bestehende Immunantwort *in vivo*. C57BL/6 Mäusen wurde an Tag 0 mit einem rekombinanten Adenovirus (AdOVA) infiziert. Ab Tag 7 wurde eine Gruppe mit OVA- Pellets gefüttert (AdOVA + OVA oral). Die Analyse wurde an Tag 10 durchgeführt. (a) *In vivo* Zytotoxizitätstest über 4 Stunden (Milz), (b) IFN γ Produktion nach Restimulation gleicher Anzahl Zellen mit α -CD3 *in vitro*. (c) Mit Beads quantifizierte Anzahl SIINFEKL- Tetramer positiver CD8⁺ T- Zellen in der Milz. (3 Tiere / Gruppe)

Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit einem rekombinanten Adenovirus (AdOVA) induzierte eine starke zytotoxische Immunantwort in der Milz (Abb. 4.3a und b), bei der es zu einer Generierung und Proliferation SIINFEKL- spezifischer CD8⁺ T- Zellen kam (Abb. 4.3c). Durch die orale Gabe des Antigens, beginnend an Tag 7 der Immunantwort, wurde eine OVA- spezifische Toleranz induziert (Abb. 4.3a und b). Diese konnte auf eine Deletion der SIINFEKL- spezifischen CD8⁺ T- Zellen zurückgeführt werden (Abb. 4.3c).

Eine bereits bestehende und äußerst starke CD8⁺ T- Zellantwort konnte durch orale Gabe des spezifischen Antigens abgeschaltet werden. Ob LSEC auch an dieser Form der oralen Toleranz beteiligt sind, sollte im nächsten Experiment untersucht werden. In einem weiteren Transferexperiment wurde untersucht, ob LSEC in der Lage sind, bereits aktivierte, also Effektor- T- Zellen, antigen- spezifisch zu tolerisieren. Dazu wurde transgenen OT- I Mäusen 6 Tage vor der Isolierung der CD8⁺ T- Zellen 0,5mg OVA i.v. injiziert. Die Präsentation des spezifischen Antigens in diesen transgenen Tieren führte zu einer Aktivierung der OVA- spezifischen CD8⁺ T- Zellen. Diese *in vivo* aktivierten CD8⁺ T- Zellen wurden 7 Tage später adoptiv in RAG2^{-/-} Mäuse transferiert.

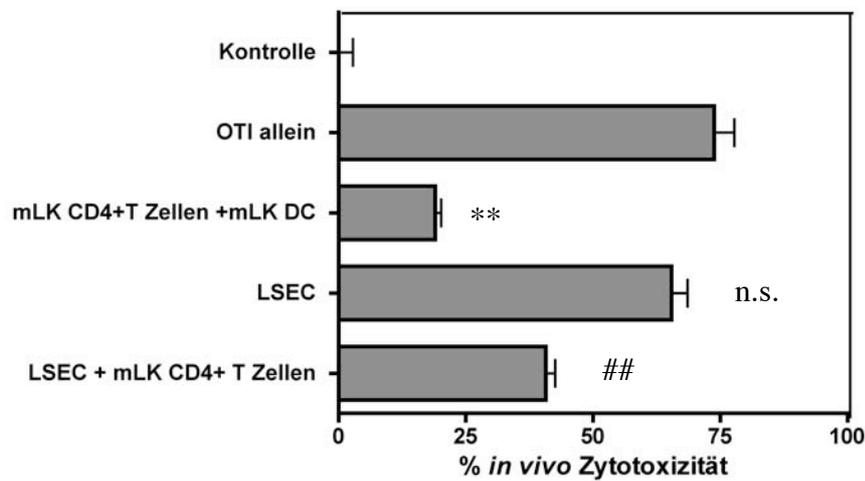
Eine weitere Zellpopulation, die an der Induktion oraler Toleranz beteiligt ist, sind die regulatorischen CD4⁺ T- Zellen. Um herauszufinden, ob regulatorische T- Zellen bei der

Tolerisierung aktivierter T- Zellen involviert sind, wurde im folgenden Experiment auch deren Einfluss auf die Immunantwort untersucht.

C57BL/6 Mäuse wurden zunächst 10 Tage mit OVA gefüttert. Von diesen Tieren wurden die LSEC aus der Leber, sowie die CD4+ T- Zellen und die DC aus den mesenterischen Lymphknoten isoliert und adoptiv in die mit aktivierten OT- I rekonstituierten RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. 10 Tage nach dem Transfer wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt und der prozentuale Anteil der SIINFEKL- spezifischen OT- I T- Zellen in der Milz bestimmt (Abb. 4.4).

Abb 4.4:

(a)



(b)

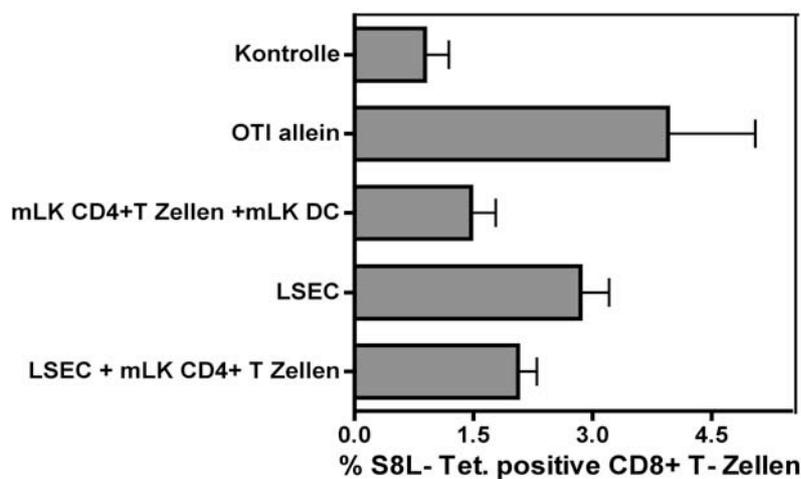


Abb. 4.4: Abschaltung aktivierter OT-I T- Zellen. RAG2^{-/-} Mäuse wurden mit aktivierten CD8+ OT-I T- Zellen rekonstituiert. Aus C57BL/6 Mäusen, welche mit OVA gefüttert wurden, wurden LSEC, sowie CD4+ T- Zellen und DC aus dem mesenterischen Lymphknoten (mLK) isoliert und adoptiv transferiert. 10 Tage nach dem Transfer wurde (a) ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt (Signifikanz im Vergleich zu OT I allein:

p**= 0,004, p^{##}= 0,009, n.s.= nicht signifikant) und (b) der Anteil S8L- Tetramer pos. CD8+ T- Zellen in der Milz bestimmt. (5 Tiere pro Gruppe)

LSEC waren nicht in der Lage, bereits aktivierte CD8+ T- Zellen durch Präsentation eines oral aufgenommenen Antigens direkt zu tolerisieren (Abb. 4.4a), obwohl es zu einer leichten Reduktion der SIINFEKL- spezifischen T- Zellen in der Milz kam (Abb. 4.4b). Nach Transfer von CD4+ T- Zellen im Kontext antigenpräsentierender DC, die aus den mesenterischen Lymphknoten isoliert wurden, konnte dagegen eine signifikante Verringerung der Zytotoxizität beobachtet werden (Abb. 4.4a). Diese war ebenfalls auf eine Reduktion spezifischer CD8+ T- Zellen zurückzuführen (Abb. 4.4b). Auch nach Transfer von CD4+ T- Zellen zusammen mit LSEC konnte eine signifikante Reduktion der Zytotoxizität beobachtet werden, (Abb. 4.4a). Dies korrelierte mit der Menge S8L- Tetramer positiver T- Zellen (Abb. 4.4b)

Die Aufnahme von Antigenen im Gastrointestinaltrakt und der Transport dieser Moleküle mit dem Blutfluss in die Leber führte dazu, dass LSEC orale Antigene aufnahmen. Sie waren in der Lage, diese zu prozessieren und auf MHC Klasse I Molekülen naiven CD8+ T- Zellen zu kreuzpräsentieren (Abb. 4.1). Die Interaktion einer antigenpräsentierenden LSEC mit einer spezifischen, naiven CD8+ T- Zelle *in vivo* resultierte in einer antigen- spezifischen Toleranz (Abb. 4.2).

LSEC trugen somit wesentlich zur Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz naiver CD8+ T- Zellen gegenüber oral aufgenommenen Antigenen bei, indem sie eine Aktivierung naiver antigen- spezifischer T- Zellen verhindern.

Die orale Gabe eines Antigens induzierte auch bei einer bereits bestehenden Immunantwort ebenfalls eine Toleranzsituation (Abb. 4.3). Der Verlust der Zytotoxizität *in vivo* korrelierte mit einer Depletion der spezifischen T- Zellen (Abb. 4.3). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD4+ T- Zellen, welche aus den mesenterischen Lymphknoten OVA gefütterter Mäuse isoliert wurden, eine wesentliche Rolle für die Toleranzinduktion in Gegenwart einer bestehenden Immunantwort spielten (Abb. 4.4). LSEC allein schienen in dieser Situation nicht in der Lage zu sein, bereits aktivierte CD8+ T- Zellen zu tolerisieren.

4.2 Tumore nutzen die tolerogene Umgebung der Leber, um einer Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen

Die Leber als ein zentrales Filterorgan des Organismus wird häufig von metastasierenden Tumorzellen befallen, welche sich durch das Blut oder die Lymphe verteilen. Insbesondere gilt dies für Tumore aus dem Gastrointestinaltrakt. Für sie stellt die Leber das anatomisch erste Organ dar, welches durch die Blutzirkulation dem Gastrointestinaltrakt angeschlossen ist. Eine Interaktion zwischen Tumorzellen und den Endothelzellen der Leber, z.B. über Adhäsionsmoleküle (VCAM-1), begünstigt eine Ansiedlung der Tumorzellen (Vidal-Vanaclocha et al., 2000). Die Leber verfügt jedoch über Zellpopulationen, die in der Lage sind, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren, wie z.B. Kupffer Zellen und NK- oder NKT- Zellen (Geissmann et al., 2005; Timmers et al., 2004). Diese besitzen Apoptose-induzierende Mechanismen, wie TNF- α , TRAIL, CD95L oder die Granenzym B-/Perforinausschüttung, um Tumorzellen zu eliminieren.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob apoptotisches Tumormaterial von LSEC aufgenommen und darin enthaltene Tumorantigene kreuzpräsentiert werden. Im speziellen sollte untersucht werden, ob im Zuge einer ersten, erfolgreichen Antitumorantwort, vermittelt durch Kupffer Zellen und NK/ NKT- Zellen, LSEC nach Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial und Präsentation der Tumorantigene, eine spezifische Toleranz induzieren. Tumore würden somit einen Mechanismus ausnutzen, der unter normalen Umständen essentiell ist, um Toleranz aufrecht zu erhalten. Dies würde einen weiteren Mechanismus beschreiben, der es Tumoren ermöglicht, sich der Überwachung durch das Immunsystem zu entziehen.

4.2.1 NK- und NKT- Zellen eliminieren Tumorzellen in der Leber in einer ersten „Antitumorantwort“

Um herauszufinden, ob metastasierende Tumorzellen in der Leber von der dortigen NK- und NKT- Zellpopulation erkannt und eliminiert werden, wurden C57BL/6 Mäusen ein NK-sensitiver Tumor injiziert. Bei der verwendeten LB27.4 Tumorzelllinie handelt es sich um einen B- Zelltumor (H2-K^{bxd}), der sensitiv gegenüber TRAIL- vermittelter Apoptose ist

(Smyth et al., 2001a). NK- Zellen der Leber exprimieren TRAIL und tragen somit erheblich zur Elimination metastasierender Tumorzellen bei.

Um eine Antitumorantwort auf die Funktion von NK-/ NKT- Zellen beziehen zu können, wurden in einer Gruppe C57BL/6 Mäusen zunächst die NK1.1 positiven Zellen depletiert. Anschließend wurde diesen, sowie unbehandelten Tieren, CFSE- markierte LB27.4 Zellen zusammen mit DDOA- markierten RMA Zellen intravenös injiziert. RMA Zellen dienten als syngene Referenzlinie, um die prozentuale spezifische Lyse ermitteln zu können. Vier Stunden nach Gabe der Tumorzellen wurde die NK/NKT- Zellabhängige spezifische Zytotoxizität *in vivo* ermittelt. (Abb. 4.5).

Abb. 4.5:

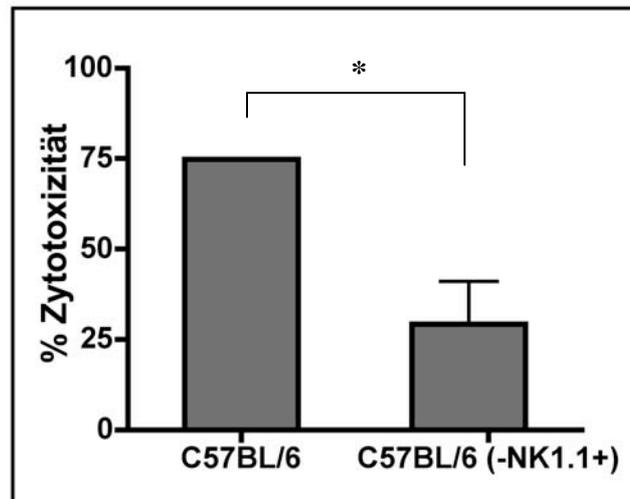


Abb. 4.5: NK-/ NKT- Zellabhängige Elimination von LB27.4 Tumorzellen in der Leber. Durch Gabe eines α -NK1.1 Antikörper wurden NK/NKT- Zellen depletiert. 3 Tage später wurde diesen und unbehandelten C57BL/6 Mäusen LB27.4 (CFSE) und RMA (DDAO) intravenös injiziert und nach 4 Stunden das Verhältnis beider Tumorzellpopulationen in der Leber durchflusszytometrisch analysiert ($p^*=0,014$). 5 Tiere pro Gruppe,

NK1.1- depletierte Tiere zeigten eine signifikant reduzierte zytotoxische Aktivität in der Leber, im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Abb. 4.5). Demnach waren NK1.1 positive Zellen in der Leber in der Lage, in unbehandelten Tieren metastasierende Tumorzellen zu kontrollieren.

4.2.2 Einfluss einer ersten Antitumorantwort auf eine spätere Immunantwort

Auf Grund der Beobachtung, dass Tumorzellen sehr schnell und effektiv in der Leber eliminiert wurden (Abb. 4.5), stellte sich die Frage, ob diese initiale Antitumorantwort einen Einfluss auf eine spätere Immunantwort haben könnte.

Um dies zu beantworten, wurde einer Gruppe TCR- transgener OT- I Mäusen Ovalbumin beladene LB27.4(OVA) Tumorzellen und einer anderen Gruppe PBS intravenös injiziert. 14 Tage später wurde beiden Gruppen stabil transfizierte RMA.OVA Zellen subcutan appliziert und das Tumorwachstum über die folgenden 14 Tage beobachtet (Abb. 4.6).

Abb. 4.6:

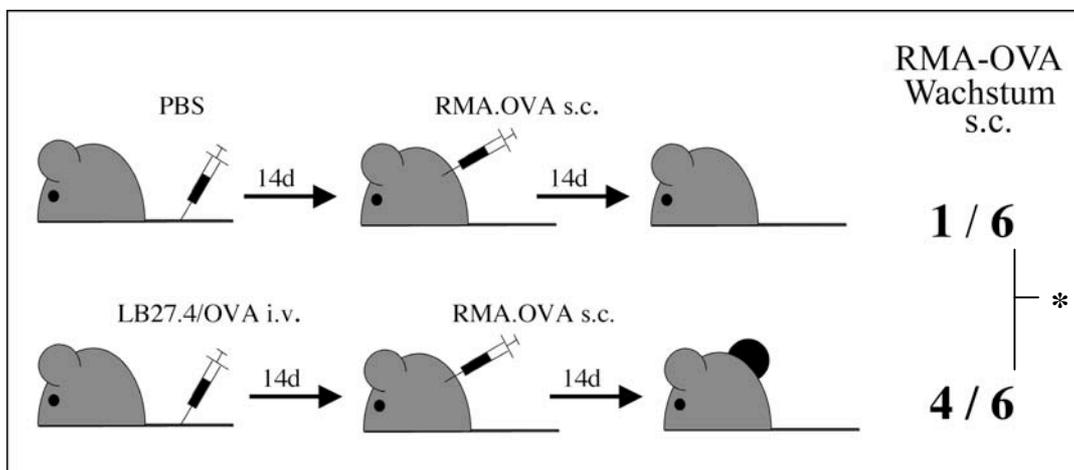


Abb. 4.6: Einfluss einer erfolgreichen Antitumorantwort auf eine nachfolgende Immunantwort. Transgenen OT- I Mäusen wurden OVA- beladene LB27.4 Zellen (5×10^6) oder PBS i.v. injiziert. 14 Tage später wurden die Tiere mit einem OVA- exprimierenden RMA.OVA Tumor (5×10^5) subcutan behandelt. Das Tumorwachstum wurde über einen Zeitraum von weiteren 14 Tagen beobachtet ($p^* = 0,0271$, logrank Test). (6 Mäuse pro Gruppe)

In der mit PBS injizierten Kontrollgruppe wurde nur bei einem von sechs Tieren ein subcutaner Tumor registriert. Demnach wird der RMA.OVA Tumor auf Grund der Expression des OVA Antigens in C57BL/6 Mäusen erkannt. Im Gegensatz dazu, wurde in der mit LB27.4/OVA vorbehandelten Gruppe in vier von sechs Tieren ein Tumorwachstum festgestellt. Die Elimination des ersten Tumors (LB27.4/OVA) hatte anscheinend einen Einfluss auf die Immunreaktion gegen den zweiten Tumor (RMA.OVA) (Abb. 4.6).

Um auszuschließen, dass die in Abb. 4.6 beobachtete Tumorantigen- spezifische Toleranz durch die LB27.4 selbst hervorgerufen wurde und um die effektive Beladung der Tumorzellen

mit OVA zu prüfen, wurden OVA- beladene LB27.4 Zellen *in vitro* mit OVA- spezifischen CD8+ (B3Z) und CD4+ (BO17.10) T- Zellen kokultiviert (Abb. 4.7).

Abb. 4.7:

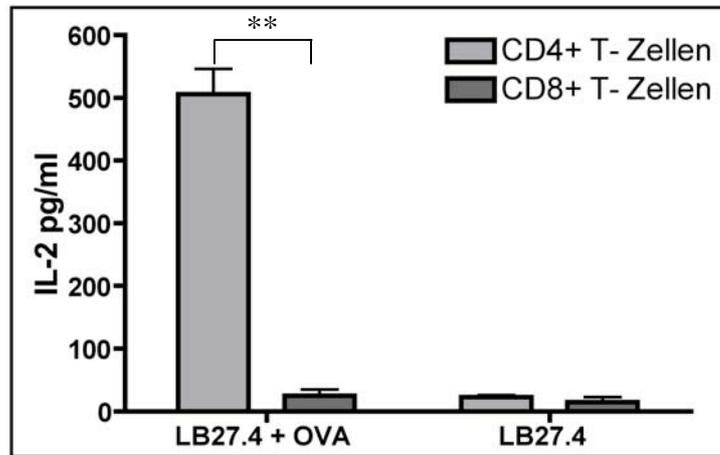


Abb. 4.7: Test der Beladung von LB27.4 mit löslichem OVA und Untersuchung einer möglichen Kreuzpräsentation. Mit OVA beladene und unbeladene LB27.4 wurden *in vitro* mit OVA- spezifischen CD8+ (B3Z) oder CD4+ (BO17.10) T- Zellen kokultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden die Überstände mit Hilfe eines Sandwich- ELISA auf die Menge an produziertem IL-2 untersucht ($p^{**} = 0,002$).

OVA- beladene LB27.4 Zellen waren *in vitro* nicht in der Lage, das Antigen CD8+ T- Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren, obwohl sie effizient OVA aufnahmen und es auf MHC Klasse II CD4+ T- Zellen präsentierten (Abb. 4.7). Dies schloss die Möglichkeit einer Kreuzpräsentation des aufgenommenen Antigens durch die Tumorzellen selbst aus. Gleichzeitig bestätigte es die erfolgreiche Beladung der Zellen mit OVA.

Das, in Abb. 4.6 beobachtete Wachstum eines subcutanen RMA.OVA Tumors, konnte nicht auf die injizierten LB27.4.OVA Zellen selbst zurückgeführt werden. Vielmehr weist das Experiment daraufhin, dass eliminierte Tumorzellen von APC aufgenommen und das Tumorantigene CD8+ T- Zellen kreuzpräsentiert wurden. Die Interaktion der CD8+ T- Zellen mit einer Tumor- antigenpräsentierenden APC führte zur Modulation der späteren Antitumorantwort. Einen möglichen Einfluss CD4+ T- Zellen konnte an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. LB27.4 waren zwar nicht zur Kreuzpräsentation in der Lage, konnten jedoch Peptide auf MHC Klasse II CD4+ T- Zellen präsentieren.

4.2.3 Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial durch LSEC *in vitro*

LSEC als residente Antigen- präsentierende Zellpopulation in der Leber sind in der Lage, lösliche oder orale Antigene schnell und effektiv aufzunehmen. Dini et al konnte zeigen, dass LSEC auch sehr effektiv apoptotisches Zellmaterial aufnehmen (Dini and Carla, 1998). Damit könnte den LSEC, in Zusammenhang mit ihrer tolerogenen Eigenschaft, eine mögliche Rolle in der Entstehung einer Tumorantigen- spezifischen Immuntoleranz zugesprochen werden. Um dies näher zu untersuchen, wurden LSEC zunächst *in vitro* mit CFSE- markierten, UV- bestrahlten, Tumorzellen inkubiert. Die Markierung der LSEC erfolgte durch Zugabe von OVA- TexRed, welches die Zellen innerhalb weniger Minuten endozytieren.

Abb. 4.8:

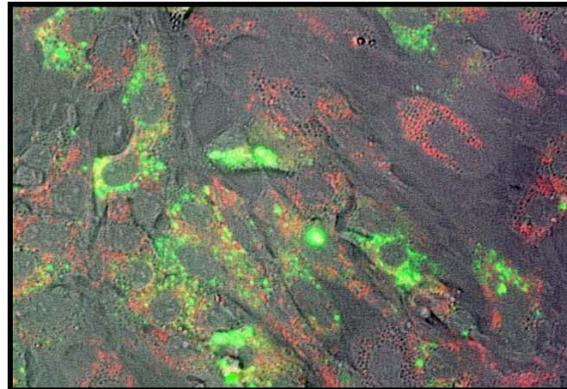


Abb. 4.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von LSEC *in vitro*, nach Aufnahme von CFSE (grün)- markierten, apoptotischen Tumorzellen (CT26) und OVATexRed (rot), 40fach. (Overlay)

LSEC waren in der Lage, CFSE- markiertes, apoptotisches Zellmaterial aufzunehmen. Abb. 4.8 zeigt, dass das apoptotische Zellmaterial und OVA teils kolokalisiert, d.h. es gelangte in dieselben endozytotischen Kompartimente.

Die Aufnahme von apoptotischen Tumorzellen wurde auch durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden LSEC entweder mit lebenden CFSE- markierten, oder mit UV- bestrahlten CT26 Tumorzellen für 18 Stunden inkubiert (Abb. 4.9).

Abb. 4.9:

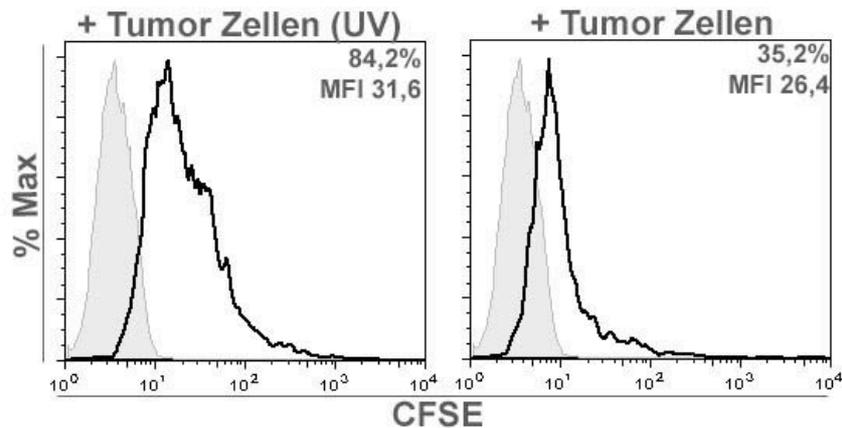


Abb. 4.9: Durchflusszytometrische Analyse von LSEC nach Inkubation mit UV bestrahlten oder lebenden CFSE- markierten CT26 Tumorzellen. LSEC wurden über Nacht mit CFSE- markierten lebenden oder UV bestrahlten CT26 Tumorzellen kokultiviert, extensiv gewaschen und mit Accutase abgelöst. Die LSEC wurden mit α - ME9F1alexa647 markiert und die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Zellmaterial im FACS analysiert. (Gezeigt für ME9F1 pos. Zellen, grau/ gefüllt: LSEC allein)

Die Durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass LSEC sehr effizient apoptotisches Zellmaterial *in vitro* aufnehmen. Auch ohne UV- Bestrahlung starben CT26 Tumorzellen spontan in Kultur und wurden von LSEC endozytiert.

Ob ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Elimination von Tumorzellen durch NK- oder NKT- Zellen *in vivo* (Abb. 4.5) und einer Aufnahme des apoptotischen Zellmaterials in LSEC (Abb. 4.8 und 9) besteht, wurde im Folgenden untersucht. LSEC wurden zusammen mit CFSE- markierten lebenden Tumorzellen (CT26) und Lymphozyten (LAL), welche aus der Leber unbehandelter oder NK1.1- depletierter C57BL/6 Mäuse isoliert wurden, über Nacht kokultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden die LSEC durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.10).

Abb. 4.10:

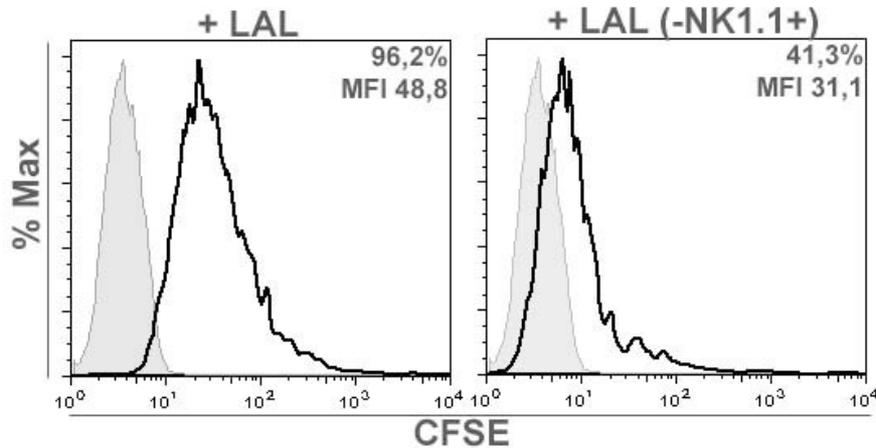


Abb. 4.10: Kokultur mit LSEC, CFSE- markierten CT26 Tumorzellen und Leber- Lymphozyten, isoliert aus unbehandelten oder aus NK1.1 depletierten C57BL/6. (Gezeigt für ME9F1 positive Zellen, grau/ gefüllt: LSEC allein)

In Anwesenheit von LAL nahmen bis zu 96% der LSEC CFSE- markiertes Zellmaterial auf. Wurden die NK1.1 positiven Zellen zuvor jedoch aus der LAL Population depletiert, war die Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial deutlich reduziert (Abb. 4.10).

Diesen Daten nach schienen NK1.1 positive Zellen Tumorzellen erkannt und elimiert zu haben, LSEC nahmen daraufhin das apoptotische Zellmaterial auf.

4.2.4 Aufnahme apoptotischer Tumorzellen durch LSEC *in vivo*

In vitro konnte gezeigt werden, dass LSEC sehr effektiv apoptotisches Zellmaterial aufnahmen (Abb. 4.8, 4.9 und 4.10). Um zu untersuchen wie effektiv dies auch *in vivo* geschieht, wurden C57BL/6 Mäusen apoptotische mit DDAO- markierte LB27.4 Zellen intravenös injiziert. 18 Stunden später wurden Leber und Milz isoliert und die Aufnahme DDAO- markierter Zellpartikel in LSEC oder DC durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.11).

Abb. 4.11:

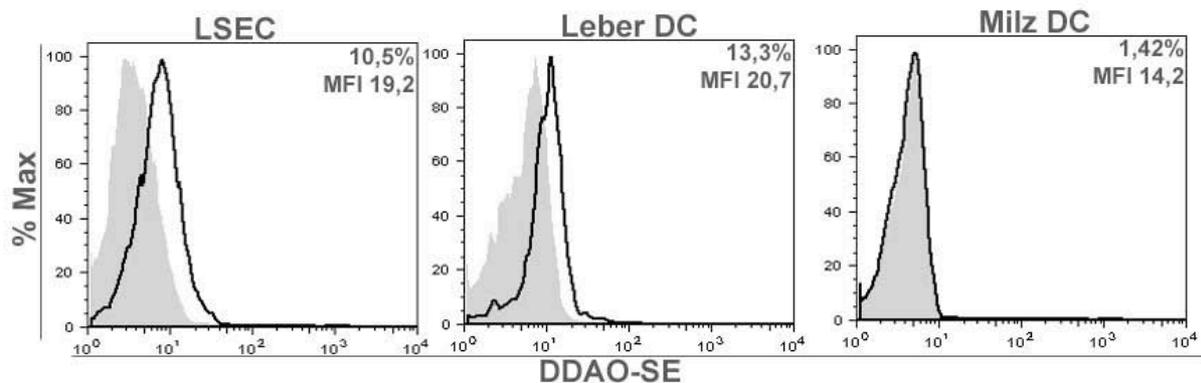


Abb. 4.11: Aufnahme apoptotischer Tumorzellen *in vivo*. C57BL/6 Mäusen wurden $1,5 \times 10^7$ DDAO-markierte, apoptotische LB27.4 Zellen intravenös injiziert. 18 Stunden später wurden Leber und Milz entnommen und Einzelsuspensionen hergestellt. Die DC der Leber und Milz wurden mit einem α -CD11c, die LSEC mit einem α -ME9F1 Antikörper markiert. Die Aufnahme von DDAO-markiertem Zellmaterial wurde durchflusszytometrisch untersucht. (grau/ gefüllt: Hintergrundfluoreszenz von LSEC oder DC isoliert aus unbehandelten Tieren)

Eine Aufnahme von apoptotischem Tumormaterial konnte in diesen Experimenten im Wesentlichen durch die LSEC und die hepatischen DC beobachtet werden. In Milz DC hingegen wurde nur ein sehr geringes DDAO Signal detektiert (Abb. 4.11).

4.2.5 Kreuzpräsentation Tumor- assoziierter Antigene durch LSEC

Dass LSEC in der Lage sind, Zellmaterial apoptotischer Tumorzellen aufzunehmen, konnte soweit *in vitro* (Abb. 4.8 und 9) und *in vivo* (Abb. 4.11) gezeigt werden. Welche Konsequenz die Aufnahme von Tumormaterial durch LSEC hat, wurde im Folgenden untersucht.

Um zu prüfen, ob LSEC Tumor- assoziierte Antigene CD8⁺ T- Zellen kreuzpräsentieren können, wurden LSEC und die Fibroblastenzelllinie C57 mit apoptotischen Material einer stabil transfizierten Tumorzellenlinie P815.OVA (H-2^d) oder der Ursprungslinie (P815) beladen. Die Fibroblastenzelllinie C57 diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden am folgenden Tag mit SIINFEKL- spezifische B3Z T- Zellen kokultiviert. B3Z produzieren bei Erkennung von H-2K^b-SIINFEKL dosisabhängig IL-2, wodurch eine quantitative Bestimmung der Kreuzpräsentation möglich war (Abb. 4.12).

Abb. 4.12:

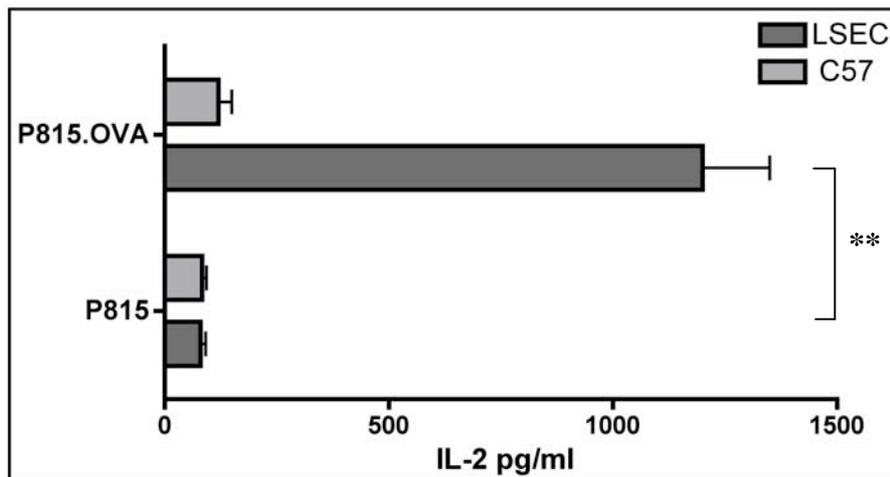


Abb. 4.12: Kreuzpräsentation von Tumor- assoziiertem Antigen. LSEC und die Fibroblastenlinie C57 wurden über Nacht mit UV bestrahlten P815.OVA oder P815 inkubiert. Die Tumorzellen wurden am folgenden Tag gewaschen und die H-2K^b^{SINFEKL} spezifische T- Zelllinie B3Z zugegeben. Die Menge an produziertem IL-2 wurde nach 18 Stunden im Überstand quantifiziert. (p***= 0,0013)

LSEC waren, im Gegensatz zu Fibroblasten, in der Lage, Tumor- assoziierte Antigene in Form von apoptotischem Zellmaterial aufzunehmen und auf MHC Klasse I an CD8+ T- Zellen zu präsentieren. Dies schloss eine exogene Beladung der MHC Klasse I durch freie Peptide aus (Abb. 4.12) und bedeutet, dass aufgenommene Antigene von LSEC intrazellulär prozessiert und aktiv in den MHC Klasse I Weg geschleust wurden.

4.2.6 LSEC die Tumor- assoziierter Antigene kreuzpräsentieren induzieren Toleranz in naiven CD8+ T- Zellen *in vitro*

Wie schon zuvor für orale (4.1.2) und lösliche Antigene gezeigt, induzieren LSEC in naiven CD8+ T- Zellen eine antigen- spezifische Toleranz (Limmer et al., 2000). Ob die Konsequenz einer Kreuzpräsentation von Tumorantigenen durch LSEC ebenfalls eine Toleranzinduktion naiver CD8+ T- Zellen bedeutet, wurde im Folgenden untersucht.

LSEC wurden über Nacht mit apoptotischen, OVA- beladenen LB27.4 Zellen inkubiert und am folgenden Tag naive, CFSE- markierte TCR- transgene OT-I T- Zellen zugeben und über einen Zeitraum von 5 Tagen kokultiviert. Als Kontrolle wurden stets Milz DC, beladen mit löslichen OVA, verwendet.

Die Induktion einer Toleranz in naiven CD8⁺ T- Zellen durch LSEC verläuft zunächst über eine Phase der T- Zellstimulation, d.h. T- Zellen proliferieren zunächst bevor sie nach 5 Tagen einen toleranten Phänotyp aufweisen (Limmer, 2000). Dies deutet daraufhin, dass die Präsentation von Antigenen durch LSEC effizient genug ist, um naive T- Zellen zu stimulieren. Ob auch die Präsentation Tumor- assoziierter Antigene durch LSEC ausreicht naive T- Zellen zu stimulieren, wurde durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.13).

Abb.: 4.13

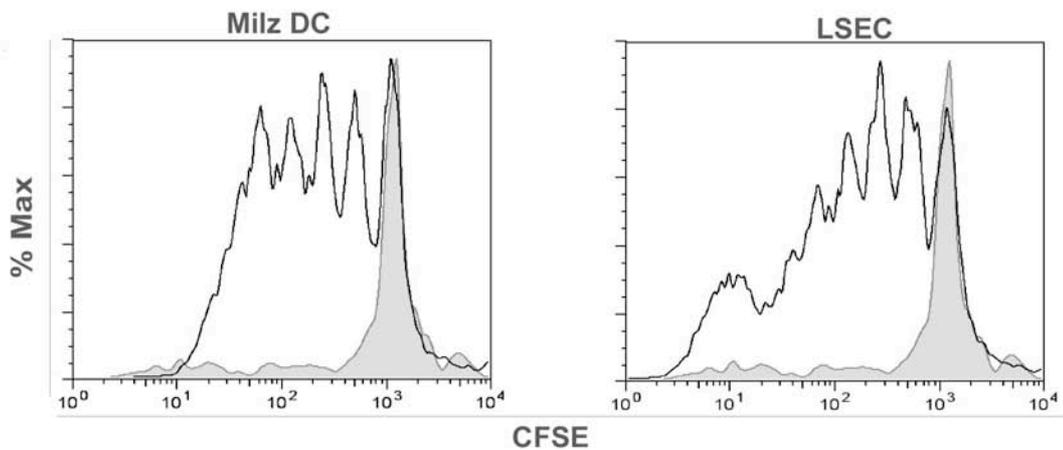


Abb. 4.13: Proliferationsprofil von OT-I T- Zellen an Tag 5 einer Kokultur mit Milz DC, beladenen mit OVA (Kontrolle), und LSEC, beladenen mit apoptotischen LB27.4(OVA) Zellen. LSEC wurden über Nacht mit apoptotischen, OVA- beladenen LB27.4 Zellen inkubiert, diese am nächsten Tag gewaschen und naive, CFSE- markierte, OT-I T- Zellen zugegeben. Parallel wurden Milz DC, mit OVA (10 μ M) beladen, und ebenfalls mit OT-I kultiviert. (grau/ gefüllt= Proliferation Tag 0, gezeigt für CD8⁺ Zellen)

OT- I T- Zellen erkannten auf LSEC präsentierte OVA und proliferierten in vergleichbarer Weise wie OT- I T- Zellen, welche mit Milz DC (beladen mit löslichem OVA) kultiviert wurden (Abb. 4.13). Die Präsentation des Tumor- assoziierten Antigens durch LSEC führte zu einer ausreichenden Stimulation der OT- I T- Zellen.

Im Folgenden wurden die Effektorfunktionen dieser T- Zellen analysiert. Dabei wurde die zytotoxische Aktivität (Abb. 4.14a) und die Fähigkeit zu Produktion von IFN γ , nach Restimulation mit α -CD3, untersucht (Abb. 4.14b).

Abb. 4.14:

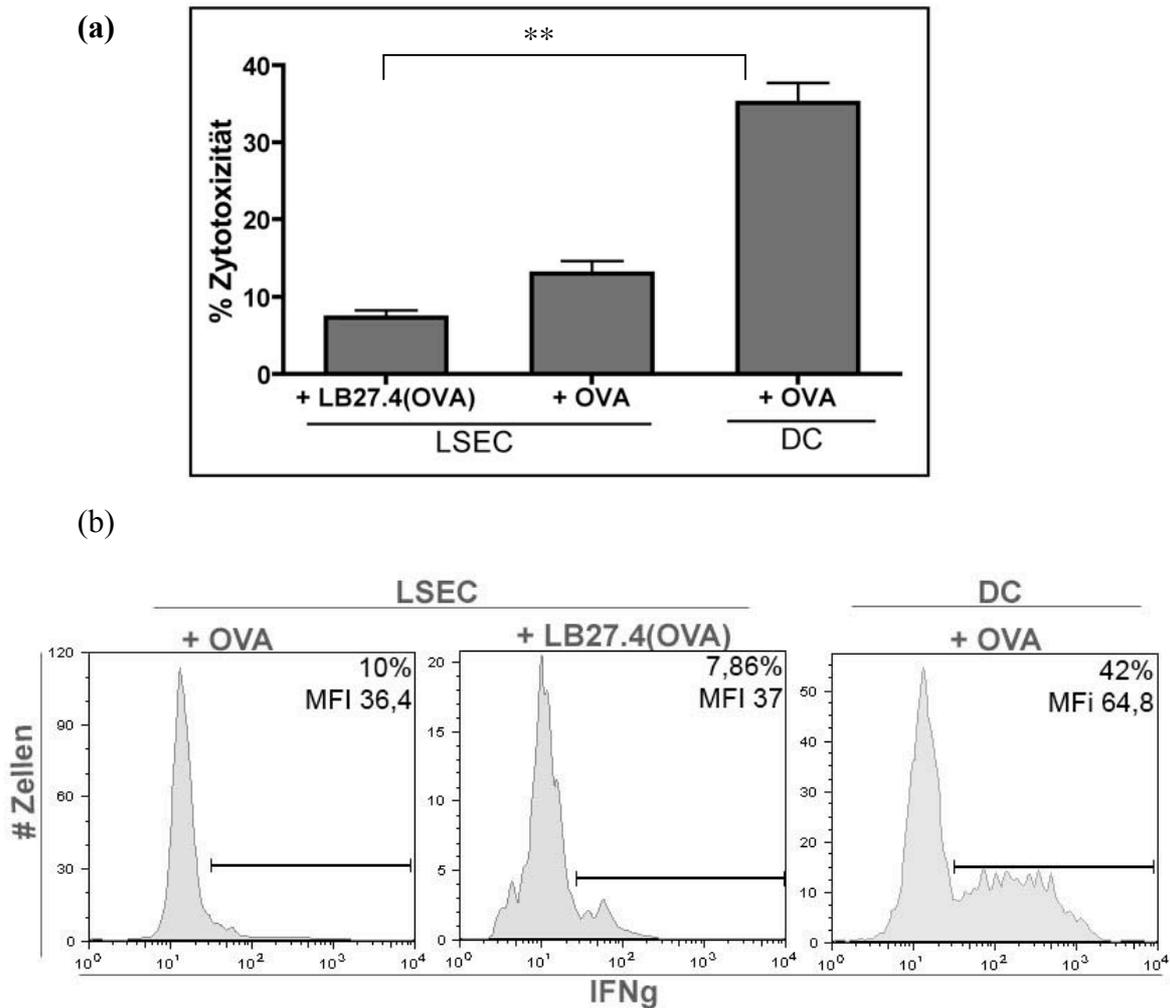


Abb. 4.14: (a) Zytotoxizitätstest und (b) IFN γ Produktion von OT-I T- Zellen, nach 5-tägiger Kokultur mit LSEC (beladen mit apoptotischen LB27.4(OVA) oder 10 μ M löslichem OVA) oder mit Milz DC (beladen mit 10 μ M löslichem OVA). Die OT-I wurden an Tag 5 der Kokultur aus der Kultur genommen und ihre zytotoxische Funktion *in vitro* getestet. (p**= 0,0021) . (b) Nach Restimulation mit α -CD3 wurde intrazellulär akkumuliertes IFN γ durchflusszytometrisch analysiert (gezeigt für CD8+ T- Zellen).

Die zytotoxische Aktivität, wie auch der Anteil IFN γ produzierender OT I T- Zellen, welche mit Tumor- antigenpräsentierenden LSEC kokultiviert wurden, war im Vergleich zu Milz DC (positiv Kontrolle) signifikant reduziert (Abb. 4.14a und b). Somit induzierten LSEC in naiven CD8+ T- Zellen eine spezifische T- Zelltoleranz gegenüber dem Tumor- assoziierten Antigen *in vitro*.

4.2.7 LSEC induzieren CD8 T- Zell Toleranz gegenüber Tumor- assoziierter Antigenen *in vivo*

Um die Frage zu beantworten, ob die bisherigen Beobachtungen *in vitro* auch einen Mechanismus *in vivo* darstellen und wie relevant dieser für eine Antitumorale Immunantwort ist, wurden adoptive Transferexperimente durchgeführt.

Dazu wurden LSEC und Milz DC aus C57BL/6 Mäusen isoliert, denen 18 Stunden zuvor UV- bestrahlte P815.OVA Zellen intravenös injiziert wurden. Die Zellen wurden adoptiv in, mit OT- I Milzzellen rekonstituierte, Rag2^{-/-} Mäuse transferiert. 10 Tage später wurde in einem ersten Experiment zunächst die Proliferation der OT- I Zellen untersucht (Abb. 4.15).

Abb. 4.15:

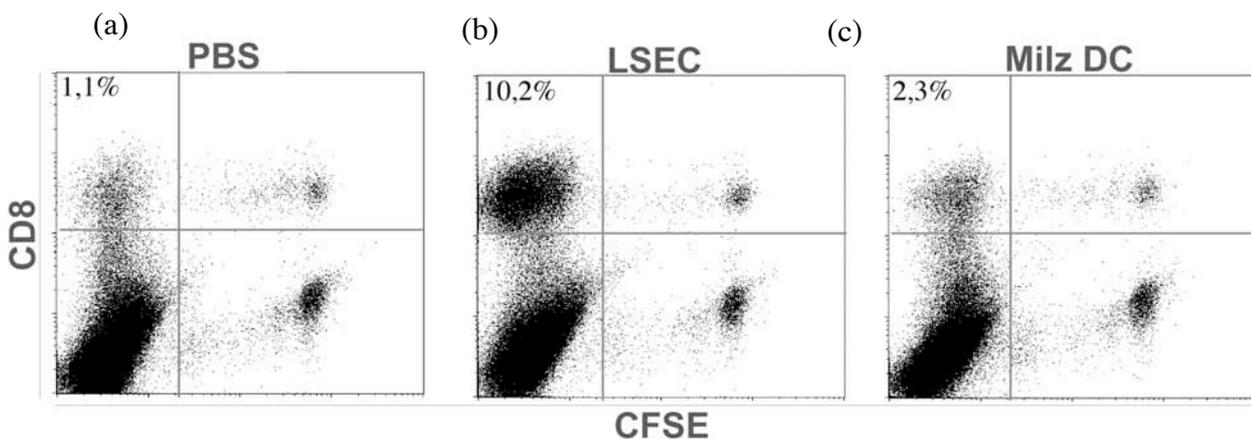


Abb. 4.15: Proliferation von OT-I CD8⁺ T- Zellen, transferiert in RAG2^{-/-} Mäuse nach Transfer von (b) LSEC oder (c) Milz DC isoliert aus C57BL/6 18 Stunden nach Injektion von apoptotischen P815.OVA Zellen. (a) Injektion von PBS anstelle der transferierten Zellen.(Kontrolle). C57BL/6 Mäusen wurden 5×10^6 UV- bestrahlte P815.OVA Tumorzellen intravenös injiziert. 18 Stunden später, wurden die LSEC aus der Leber und die DC aus der Milz mit Hilfe von MACS- Beads isoliert. Diese wurden adoptiv in RAG2- defiziente Mäuse transferiert, die 18 Stunden zuvor mit 10^7 CFSE- markierten OTI- Milzzellen rekonstituiert wurden. 10 Tage nach dem Transfer wurde die Proliferation der CD8⁺ OT-I T- Zellen in der Milz durchflusszytometrisch untersucht. (5 Tiere/ Gruppe) (aus Berg M, EJI 2006)

Wie schon zuvor beschrieben, proliferierten OT-I Zellen, welche in RAG2^{-/-} Mäuse transferiert wurden, homeostatisch *in vivo* (Abb. 4.15a) (Schluns et al., 2000). Nach Transfer von LSEC war der Anteil proliferierender CD8⁺ T- Zellen ca. 10fach erhöht (Abb. 4.15b). Nach Transfer von Milz DC proliferierten mehr Zellen als in der PBS Kontrolle, der Anteil war jedoch 5fach geringer als in Mäusen die LSEC erhalten hatten (Abb. 4.15). In einem

weiteren Versuch wurde die *in vivo* Zytotoxizität und, nach Restimulation *in vitro* die IL-2 und IFN- γ Produktion der OT- I T- Zellen analysiert (Abb. 4.16a und b).

Abb. 4.16:

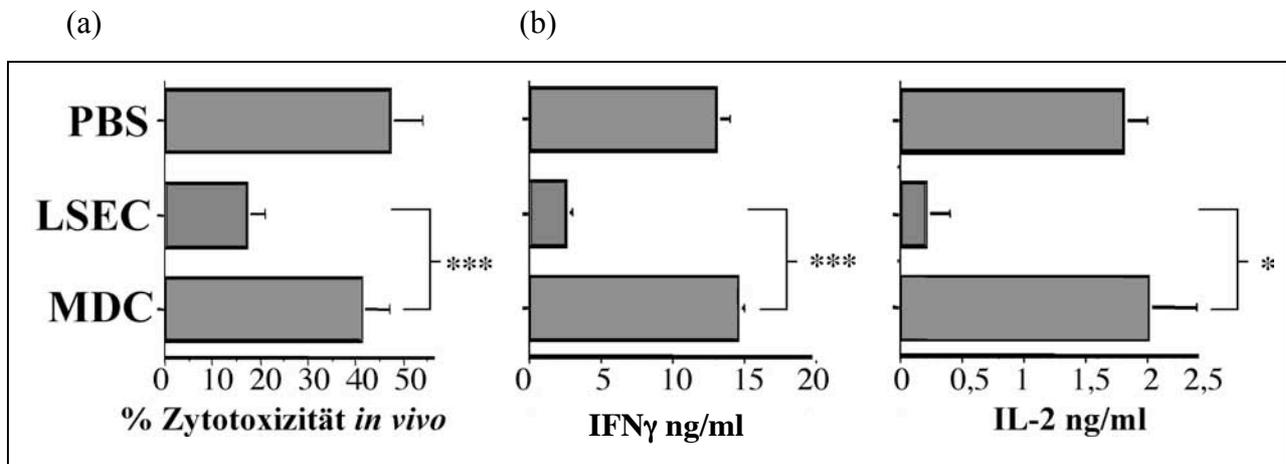


Abb. 4.16: (a) *In vivo* Zytotoxizität in der Milz von RAG2^{-/-} Mäusen rekonstituiert mit OT-I T- Zellen, 10 Tage nach Transfer von LSEC (SEC) oder Milz DC, isoliert aus C57BL/6 Mäusen, welche 18 Stunden zuvor mit apoptotischen 5x10⁶ P815.OVA Tumorzellen behandelt wurden (p***=0,0005). (b) Gleiche Zahlen CD8+ T- Zellen aus der Milz, wurden mit Hilfe von MACS- Beads isoliert und *in vitro* 18 Stunden mit einem α - CD3 Antikörper restimuliert. Die Menge an IFN γ und IL-2 wurde im Überstand mit einem Sandwich- ELISA quantifiziert (IFN γ p***= 0,0008, IL-2 p*= 0,027). (5 Tiere/ Gruppe, n=1), (aus Berg M., EJI 2006)

Nach Interaktion mit LSEC *in vivo* wiesen die OT- I T- Zellen, im Vergleich zu OT-I T- Zellen mit DC interagierten, eine reduzierte zytotoxische Aktivität auf (Abb. 4.16a). Dieses galt auch für die Produktion von IFN γ und IL-2, nach Restimulation *in vitro* (Abb. 4.16b). OT-I T- Zellen produzierten nach Interaktion mit LSEC *in vivo* signifikant weniger IFN γ und IL-2, als nach Interaktion mit DC oder in der PBS Kontrolle.

LSEC, die Tumor- assoziierte Antigene *in vivo* an transgene CD8+ T- Zellen präsentierten, waren in der Lage, diese antigen- spezifisch zu tolerieren.

Die Rekonstitution von RAG2- defizienten Mäusen mit naiven T- Zellen stellt auf Grund der beschriebenen homeostatischen Proliferation ein artifizielles Modell dar (Schluns et al., 2000). Aus diesem Grunde wurde das Experiment in C57BL/6 Empfänger Mäusen wiederholt.

Um zu untersuchen, welche APC- Population für die beobachtete Toleranzinduktion verantwortlich war, wurden neben den LSEC und Milz DC auch Leber DC transferiert. Von diesen Zellen ist ebenfalls bekannt, dass sie Toleranz induzieren können.

Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden analog zu dem vorherigen Experiment aus C57BL/6 Mäusen isoliert, denen 18 Stunden zuvor apoptotische P815.OVA Tumorzellen injiziert worden waren. Die Zellen wurden adoptiv in normale C57BL/6 Wildtypiere transferiert und nach 10 Tagen die zytotoxische Aktivität und die Produktion von IL-2 und IFN γ nach Restimulation *in vitro* untersucht (Abb. 4.17).

Abb. 4.17:

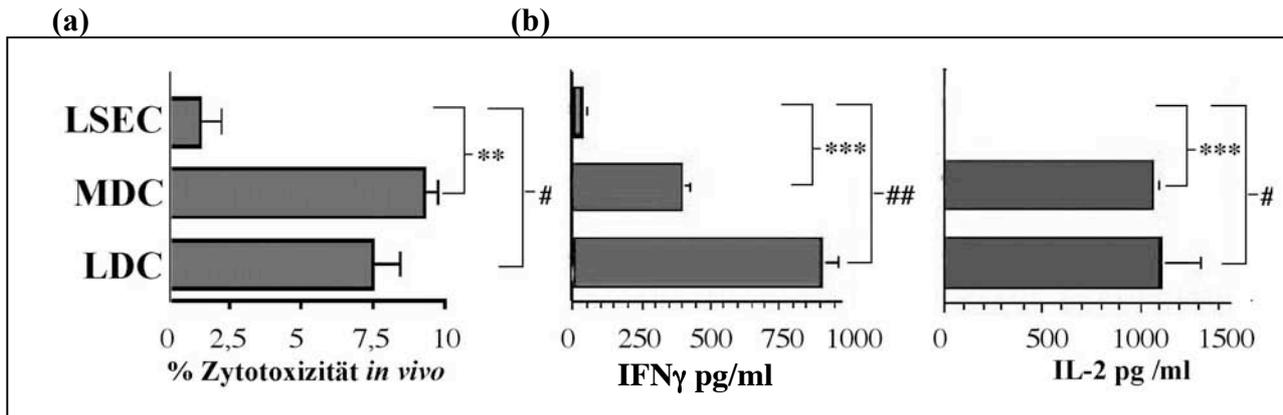


Abb. 4.17: *In vivo* Zytotoxizität (a) und Zytokinproduktion (b) nach Transfer von LSEC, Milz oder Leber DC in C57BL/6 Mäuse. C57BL/6 Mäusen wurden 5×10^6 apoptotische P815.OVA injiziert. 18 Stunden später wurden die LSEC und die DC aus Milz und Leber isoliert und in C57BL/6 Empfängermause transferiert. 10 Tage nach diesem Transfer wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest (a) ($p^{**} = 0,0029$, $p^{\#} = 0,038$) und, nach Isolierung der CD8 $^{+}$ T- Zellen aus der Milz und Restimulation über Nacht mit α -CD3, die Menge an IFN γ ($p^{***} = 0,0016$, $p^{\#\#} = 0,0015$) und IL-2 ($p^{***} = 0,0007$, $p^{\#} = 0,023$) (b) im Überstand mit Hilfe eines Sandwich ELISA gemessen. (5 Tiere/ Gruppe), (aus Berg M., EJI 2006)

Auch in einem normalen C57BL/6 Wildtyp Repertoire induzierte der Transfer von LSEC eine systemische Tumorantigen- spezifische T- Zelltoleranz. Im Gegensatz dazu induzierte der Transfer von DC isoliert aus Milz oder Leber eine antigen- spezifische Immunantwort.

Tumorzellen die mit dem Blutstrom in die Leber gelangen, werden dort in einer ersten Immunantwort von NK1.1 positiven Zellen erkannt und eliminiert (Abb. 4.5 und 10). Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) nahmen apoptotisches Tumormaterial effektiv auf (Abb. 4.8, 9 und 11) und waren in der Lage Tumor- assoziierte Antigene auf MHC Klasse I CD8 $^{+}$ T- Zellen zu kreuzpräsentieren (Abb. 4.13, 14 und 15). Naive CD8 $^{+}$ T- Zellen wurden durch LSEC zunächst stimuliert und proliferierten in vergleichbarer Weise wie CD8 $^{+}$ T- Zellen kultiviert mit DC (Abb. 4.13). Trotz dieser anfänglichen, erfolgreichen Stimulierung der naiven T- Zellen, waren diese an Tag 5 der Kokultur nicht mehr in der Lage, Zielzellen zu

lysieren (Abb. 4.14a), bzw. nach Restimulation $\text{IFN}\gamma$ zu produzieren (Abb. 4.14b). Die Zellen wurden *in vitro* von LSEC, die Tumor- assoziierte Antigene präsentieren, tolerisiert.

Die Beobachtungen *in vitro*, konnten *in vivo* in Transferexperimenten bestätigt werden. Der Transfer von LSEC, isoliert aus Mäusen, welchen kurz zuvor apoptotische Tumorzellen injiziert wurden, induzierte in einem transgenen, wie auch in einem normalen Wildtyp, Repertoire eine antigen- spezifisch Toleranz (Abb. 4.16 und 17)

Basierend auf der ersten Beobachtung, dass eine erste erfolgreiche Tumorabwehr eine folgende Tumorspezifische Immunantwort verhindern kann (Abb. 4.6), konnte gezeigt werden, dass LSEC an der Entstehung einer Tumorantigen- spezifischen Toleranz in der Leber beteiligt waren.

4.3 Charakterisierung zellulärer Mechanismen der T- Zelltoleranz induziert durch LSEC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass LSEC an der Tolerisierung naiver CD8+ T- Zellen gegenüber oraler oder Tumor- assoziierter Antigene beteiligt sind, wurde im Folgenden der zelluläre Mechanismus der Toleranzinduktion und der damit verbundene Phänotyp der T- Zellen näher charakterisiert. Auch der Einfluss exogener Faktoren (IL-2) auf die T- Zelltoleranz wurde untersucht.

4.3.1 Toleranter T- Zellphänotyp an Tag 5 einer Kokultur mit LSEC

LSEC, obwohl sie über alle Moleküle zur Aktivierung von CD8+ T- Zellen verfügen (MHC Klasse I, CD80, CD86), induzieren in naiven CD8+ T- Zellen eine antigen- spezifische Toleranz (Abb. 4.18) (Limmer, 2000).

Abb. 4.18:

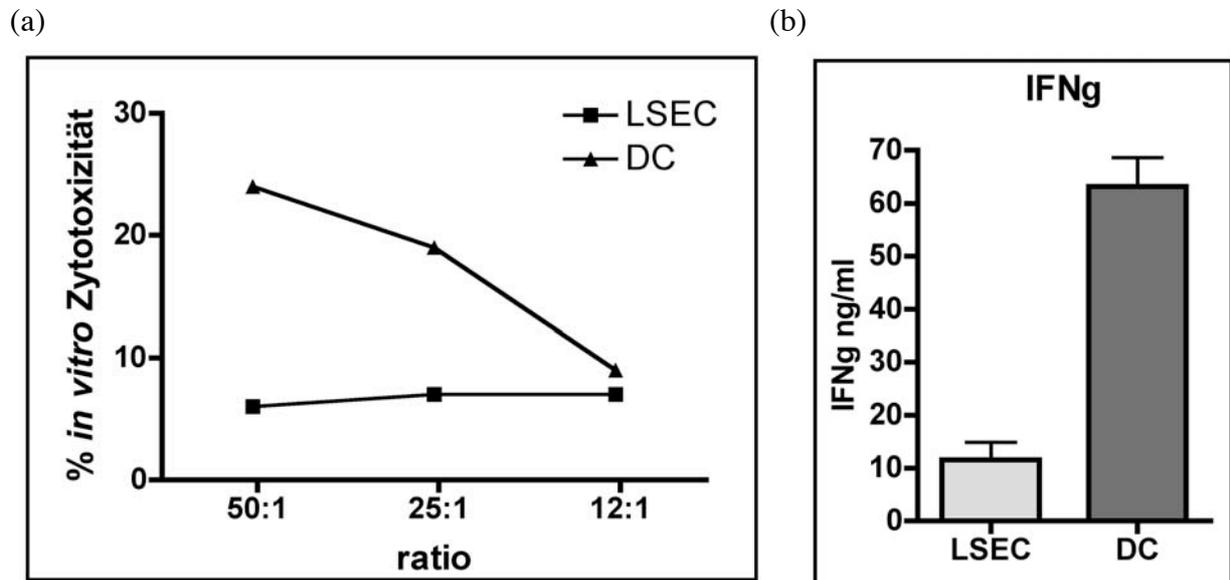


Abb. 4.18: DesTCR transgene CD8+ T- Zellen an Tag 5 einer Kokultur mit C57BL/6 LSEC oder DC. Die T- Zellen wurden aus der 24- Lochplatte geerntet, die toten Zellen über einen Lymphopregradienten abgetrennt und ein *in vitro* Zytotoxizitätstest (a) durchgeführt (Effektor : Target Ratio). Gleiche Mengen T- Zellen wurden ebenfalls über Nacht mit α -CD3 restimuliert und die Menge an IFN γ im Überstand mittels eines Sandwich-ELISA quantifiziert (b).

Der tolerante Phänotyp von T- Zellen, welche mit antigenpräsentierenden LSEC kultiviert wurden, konnte sich durch fehlende oder reduzierte Effektorfunktionen (Zytotoxizität (a) und $IFN\gamma$ (b)) an Tag 5 der Kultivierung charakterisiert werden (Abb. 4.18).

4.3.2 Im Verlauf der Toleranz werden T- Zellen zunächst stimuliert

Wie schon zuvor beobachtet, scheint die Tolerisierung der T- Zellen über eine Phase der T- Zell Proliferation zu verlaufen, welches eine ausreichende Antigenpräsentation seitens der LSEC voraussetzt (Abb. 4.15 und Limmer, 2000). Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, in wie weit sich das Proliferationsverhalten von T- Zellen, welche durch LSEC oder Milz DC stimuliert werden, unterscheidet. T- Zellstimulierung lässt sich auch an Hand des Expressionsmusters bestimmter Oberflächenmoleküle auf T- Zellen charakterisieren. Hier wurde speziell die Expression von CD25 und CD69 untersucht.

Die Untersuchungen zur T- Zellproliferation fanden mit Hilfe der CFSE- Markierung der T- Zellen statt. CFSE wird mit jedem Teilungsschritt an die Tochterzelle weitergeben, wodurch sich dessen Intensität verringert und sich ein bestimmtes Proliferationsprofil ergibt (Abb. 4.19).

Abb. 4.19:

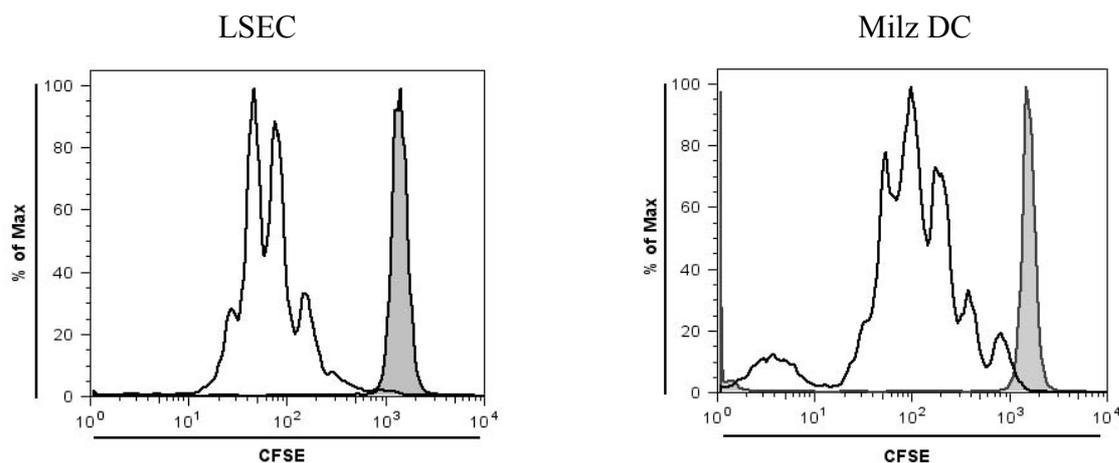


Abb. 4.19: Proliferationsprofil transgener DesTCR T- Zellen an Tag 5 der Kokultur mit antigenpräsentierenden LSEC oder Milz DC. Naive $CD8^+$ DesTCR T- Zellen wurden an Tag 0 mit $2\mu M$ CFSE markiert und in einer 24-Loch Platte mit LSEC oder Milz DC kokultiviert. (grau/ gefüllt: DesTCR T- Zellen an Tag 0, gezeigt für $CD8^+$)

Die Proliferationsprofile von T- Zellen, welche mit LSEC oder Milz DC kultiviert wurden, zeigten eine große Ähnlichkeit (Abb. 4.19). Zur genaueren Analyse der Proliferation wurde im Folgenden die Anzahl lebender Zellen pro Proliferationsschritt quantifiziert (Abb. 4.20).

Abb. 4.20:

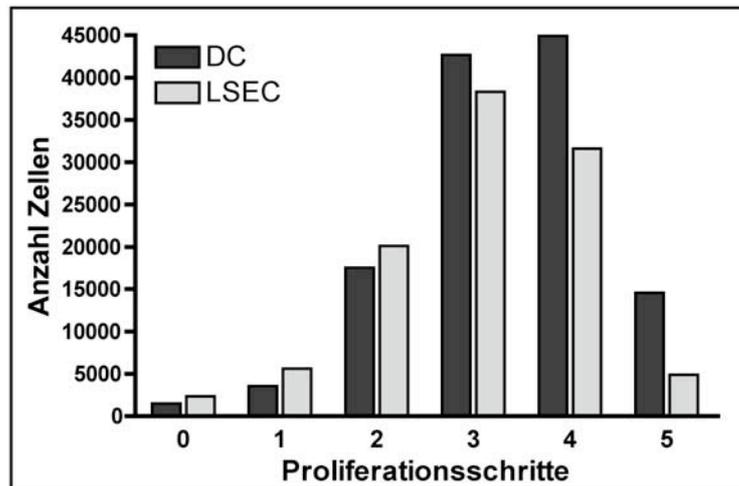


Abb. 4.20: Quantifizierung der Anzahl transgener CD8+ T- Zellen (DesTCR) pro Proliferationschritt an Tag 5 der Kultivierung mit LSEC oder Milz DC. An Tag 5 der Kokultur wurde vor der Messung eine definierte Menge unmarkierter Beads zugeben und die Anzahl der Zellen zu der Anzahl gemessener Beads in Relation gesetzt (totale Zellzahl, gezeigt für lebende, CD8+ T- Zellen)

Die T- Zellen expandierten in beiden Ansätzen während der ersten 4 Teilungsschritte in fast identischer Weise. Am Ende der Kultur (Tag 5) starb der Großteil der Zellen, unabhängig mit welcher APC sie kultiviert wurden (Abb. 4.20).

Weitere Parameter, die eine Stimulierung naiver T- Zellen anzeigen, sind die Regulation bestimmter Marker auf der Zelloberfläche. Bei diesen Markern handelt es sich beispielsweise um die α -Kette (CD25) des hochaffinen IL-2- Rezeptors, oder das „*early activation antigen*“¹ CD69. Die Expression beider Moleküle wird innerhalb der ersten 24 Stunden nach TZR-Signalisierung in der Zelle erhöht und sind dann auf der Zelloberfläche detektierbar.

Um zu untersuchen, wie diese Marker im Zuge der Tolerisierung gegenüber einer Aktivierung der T- Zelle auf der Zelloberfläche reguliert werden, wurden transgene T- Zellen mit LSEC oder Milz DC kultiviert und an mehreren Zeitpunkten die T- Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.21).

¹ engl.: *early activation antigen* = Frühes Aktivierungsantigen

Abb. 4.21:

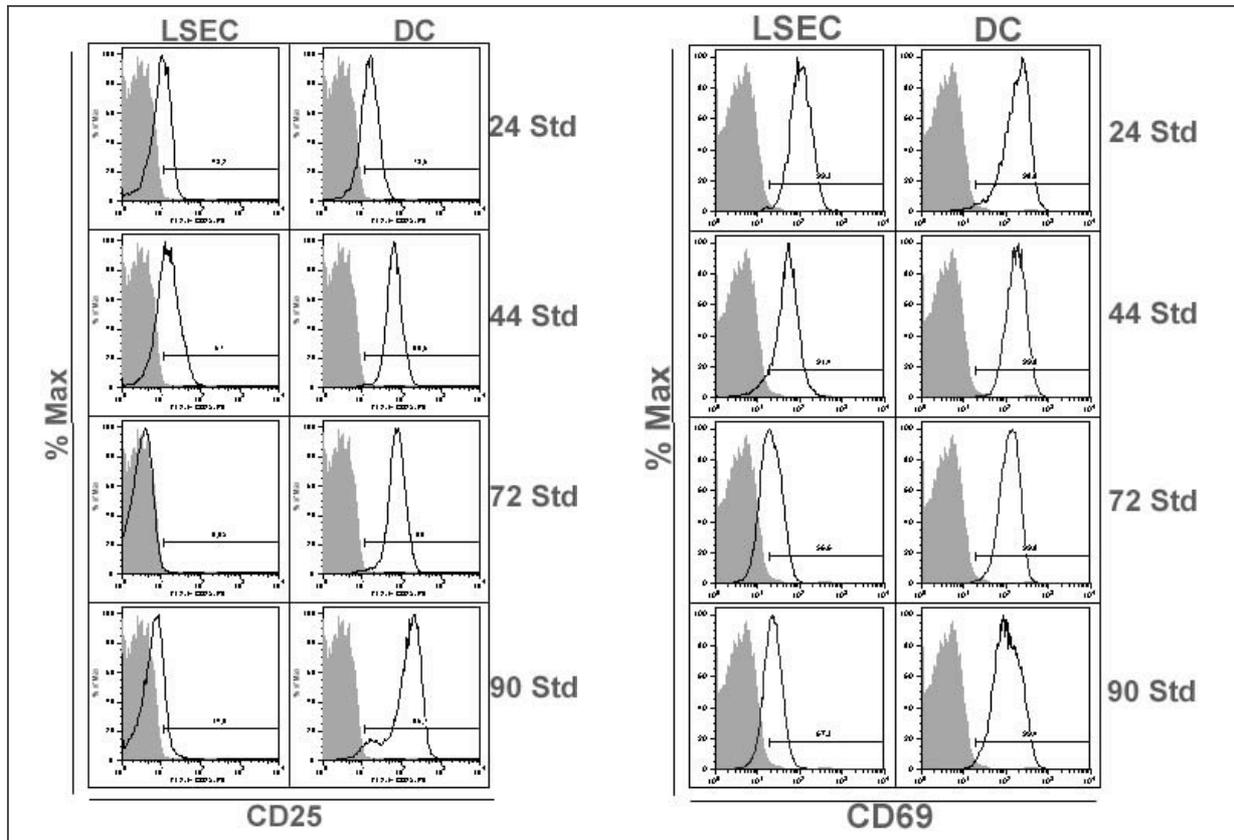


Abb. 4.21: CD25 und CD69 Expression auf der Oberfläche von DesTCR CD8+ T- Zellen kultiviert auf LSEC oder Milz DC. Naive CD8+ T- Zellen wurden mit antigenpräsentierenden LSEC oder Milz DC kokultiviert. An den entsprechenden Zeitpunkten wurden die T- Zellen mit 2mM EDTA/ PBS von den APC abgelöst und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD25 oder CD69 untersucht. (grau/ gefüllt= Expression von CD25 oder CD69 an Tag 0, gezeigt für CD8+ Zellen)

Abb. 4.21 zeigt, dass T- Zellen die mit antigenpräsentierenden LSEC kultiviert wurden CD25 innerhalb der ersten 44 Stunden der Kokultur herauf regulierten. Ab einem Zeitpunkt von 72 Stunden war CD25 jedoch auf toleranten T- Zellen nicht mehr detektierbar. T- Zellen die auf DC kultiviert wurden regulierten CD25 ebenfalls innerhalb der ersten 44 Stunden herauf. Die Expression blieb bis Tag 5 relativ konstant.

CD69, einer der frühen Aktivierungsmarker auf T- Zellen, wurde in beiden Kultivierungsansätzen ebenfalls innerhalb der ersten 24 Stunden hoch reguliert und blieb auf der Oberfläche bis zum Ende der Kultur detektierbar.

Die Daten zeigen, dass T- Zellen, welche nach 5 Tagen einen toleranten Phänotyp aufwiesen, zunächst eine Proliferationsphase durchliefen, welche der aktivierter T- Zellen ähnelte.

Weitere Parameter einer T- Zellstimulierung waren die Regulation von CD25 und CD69 innerhalb der ersten 40- 44 Stunden. Während CD69 auch nach 96 Stunden noch auf der Oberfläche von T- Zellen, welche mit LSEC kultiviert wurden, messbar war, wurde CD25 scheinbar aktiv wieder herab reguliert und war nach 72 Stunden nicht mehr auf der Zelloberfläche detektierbar.

4.3.3 IL-2 kann die Toleranzentstehung beeinflussen

IL-2 ist eines der Zytokine, die früh während der Interaktion zwischen T- Zelle und APC sekretiert werden. Es kann autokrin auf die produzierende Zelle selbst wirken, aber auch parakrin auf benachbarte Zellen die den hochaffinen IL-2 Rezeptor tragen.

Auch DC sind in der Lage in geringen Mengen IL-2 zu produzieren um eine Aktivierung naiver T- Zellen zu erleichtern (Granucci et al., 2001). Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob IL-2 bei der Toleranzentstehung vermittelt durch LSEC eine Rolle spielt.

Um festzustellen, ob sich die Menge an produziertem IL-2 nach Kontakt von CD8+ T- Zellen mit LSEC gegenüber Milz DC unterscheidet, wurde an verschiedenen Zeitpunkten der Kokultur die IL-2 Konzentration im Überstand gemessen (Abb. 4.22).

Abb. 4.22:

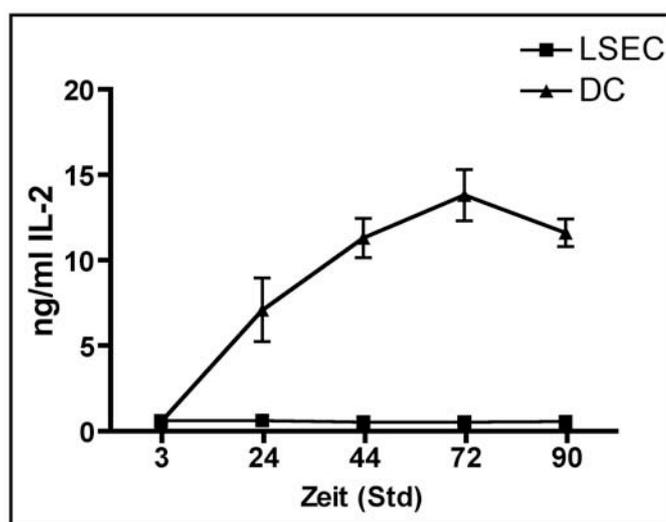


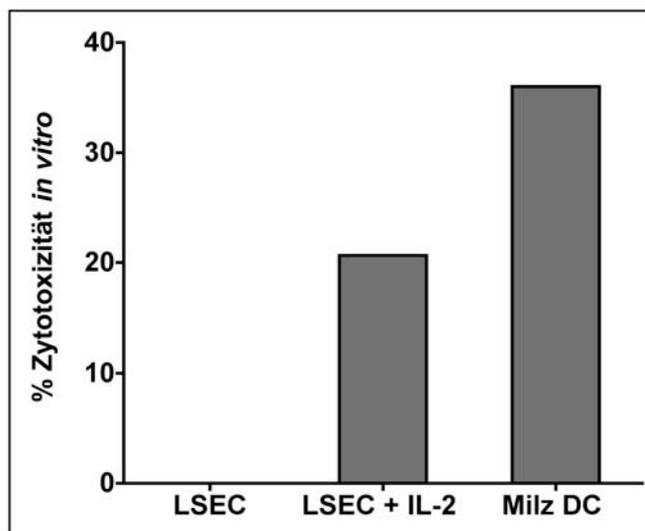
Abb. 4.22: Menge an IL-2, gemessen im Überstand einer Kokultur naiver CD8+ T- Zellen mit LSEC oder DC. In einer 96- Loch Platte wurden LSEC oder Milz DC mit der gleichen Anzahl naiver DesTCR T- Zellen kultiviert und an den gegebenen Zeitpunkten der Überstand auf die Menge an IL-2 in einem Sandwich ELISA untersucht. (Triplikate)

Innerhalb von 24 Stunden war die Menge an IL-2, welches nach Kontakt mit Milz DC produziert wurde, bis zu 10mal höher als die Menge an IL-2 in einer Kokultur mit LSEC (Abb. 4.22). Dies konnte nicht auf eine stärkere Proliferation von T- Zellen, welche mit DC kultiviert wurden zurück geführt werden, da sich tolerante und aktivierte T- Zellen nur unwesentlich in ihren Proliferationsprofil unterschieden (Abb. 4.19 und 4.20). Ein Mangel an IL-2 in der Anfangsphase der Interaktion zwischen T- Zellen und LSEC könnte ein fehlendes Signal darstellen und demnach dazu beitragen, dass in diesen T- Zellen ein Toleranz induziert wurde.

Um die Frage zu beantworten, ob IL-2 einen Einfluss auf die Toleranzinduktion hat, wurde einer Kokultur mit T- Zellen und LSEC exogenes IL-2 zugegeben und die T- Zellen an Tag 5 auf ihre zytotoxische Aktivität und auf die Produktion von Zytokinen untersucht (Abb. 4.23)

Abb. 4. 23:

(a)



(b)

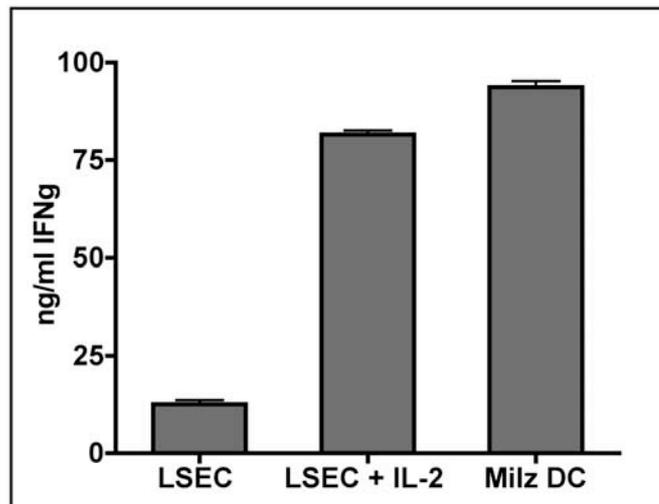


Abb. 4.23: Kokultur naiver CD8⁺ T- Zellen und LSEC mit und ohne Zugabe von IL-2. Naive DesTCR T- Zellen wurden mit LSEC oder Milz DC in einer 24- Loch Platte kultiviert. Einem Ansatz wurde an Tag 0 10ng/ml rekombinantes Maus- IL-2 zugegeben. An Tag 5 wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätstest (a) durchgeführt, und die gleiche Anzahl Zellen über Nacht mit α -CD3 restimuliert und die Menge an IFN γ im Überstand mit Hilfe eines Sandwich ELISA quantifiziert (b).

Die exogene Zugabe von IL-2 zu Beginn der Kultur mit LSEC verhinderte die Induktion der Toleranz (Abb. 4.23). Diese T- Zellen waren am Tag 5 in der Lage zytotoxisch aktiv Targetzellen zu lysieren (Abb. 4.23a) und produzierten vergleichbar viel IFN γ , wie aktivierte T- Zellen (Abb. 4.23b).

Um zu untersuchen, ob IL-2 zu Beginn der Interaktion mit LSEC für die Toleranzentstehung entscheidend ist, wurde IL-2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Kokultur naiver CD8⁺ T- Zellen und LSEC zugegeben und die Zellen an Tag 5 restimuliert (Abb. 4.24).

Abb. 4.24:

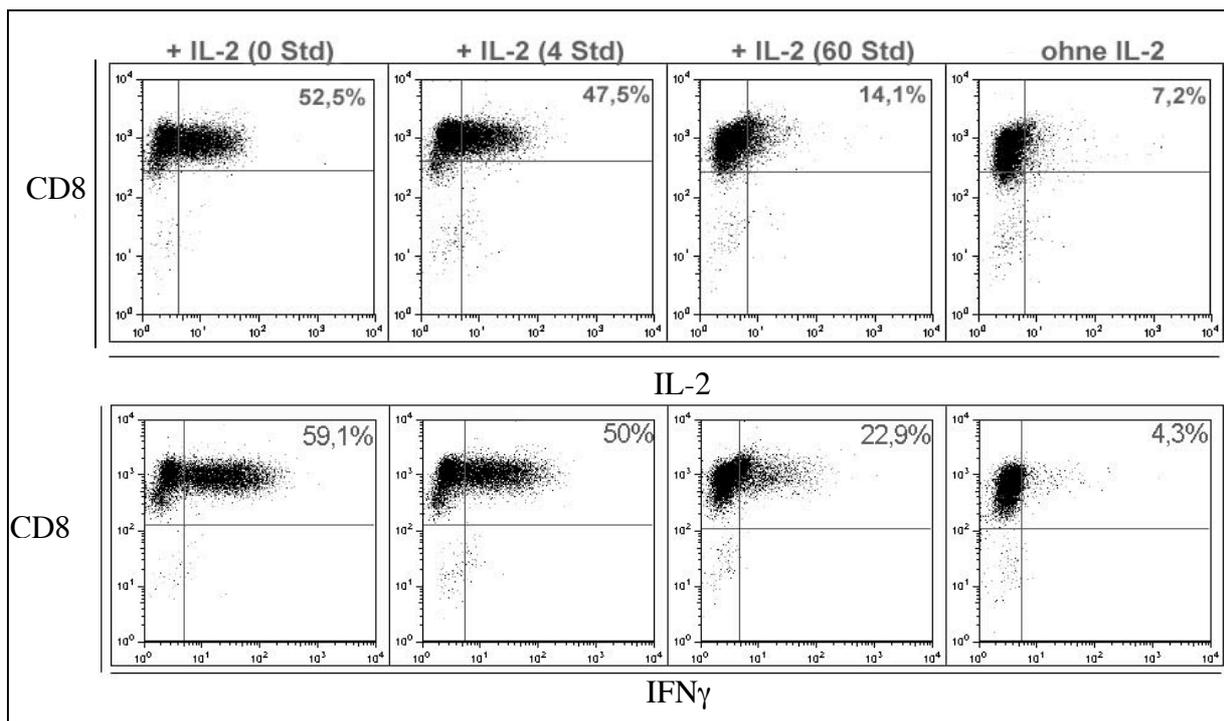


Abb. 4.24: Zugabe von IL-2 zu verschiedenen Zeitpunkten. Naive DesTCR T- Zellen wurden mit LSEC, isoliert aus C57BL/6 Mäusen, kokultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten der Kultivierung wurden 10ng/ml IL-2 zugegeben. Die T- Zellen wurden an Tag 5, für 5 Stunden mit α -CD3 restimuliert und die Menge an IL-2 und IFN γ intrazellulär analysiert.

Dieses Experiment zeigte, dass eine Zugabe von IL-2 direkt oder nach 4 Stunden der Kokultivierung von LSEC und T- Zellen die Entstehung der Toleranz verhinderte. Die Zugabe von IL-2 nach 60 Stunden, schien jedoch keinen entscheidenden Einfluss mehr auf den toleranten Phänotyp der T- Zellen zu haben, da am Ende der Kultur deutlich weniger Zellen IL-2 und IFN γ produzierten (Abb. 4.24). Dies könnte mit der Expression von CD25 auf der Zelloberfläche zusammenhängen. Wie in Abbildung 4.21 gezeigt, regulierten T- Zellen zwischen 40 und 72 Stunden der Interaktion mit LSEC CD25 auf der Oberfläche herunter. Dies könnte erklären, weshalb zugegebenes IL-2 kein Signal mehr über CD25 in die Zelle senden konnte.

Zusammenfassend produzierten T- Zellen während der Kultur mit LSEC, deutlich weniger IL-2 als T- Zellen die von DC aktiviert wurden (Abb. 4.22). Die exogene Zugabe von IL-2 zu Beginn der Kultivierung konnte eine Toleranzinduktion durch LSEC verhindern (Abb. 4.23). IL-2 schien aber nur zu Beginn der Interaktion zwischen T- Zelle und LSEC einen Einfluss auf die Aktivierung der T- Zellen zu haben, so konnte eine Zugabe von IL-2 zu einem

späteren Zeitpunkt (60 Stunden) eine Toleranzinduktion nicht mehr deutlich beeinflussen (Abb. 4.24).

4.3.4 Parakrines IL-2, produziert von aktivierten CD4 Helfer- T- Zellen, kann die Toleranzinduktion durch LSEC *in vitro* beeinflussen

Es wird angenommen, dass die Induktion peripherer Toleranz in nicht- inflammatorischen Situationen entscheidend ist, um Autoimmunreaktion zu verhindern. Wie bereits gezeigt, induzieren LSEC in der Leber dauerhaft Toleranz gegenüber Antigenen, die mit dem Blut in dieses Organ gelangen. Eine dauerhafte Toleranzinduktion ist im Falle einer Infektion, allerdings nicht sinnvoll.

Wie zuvor gezeigt, ist IL-2 ein Faktor der die Toleranzinduktion durch LSEC beeinflussen konnte. Im Folgenden stellte sich die Frage, ob IL-2 *in vivo* eine regulatorische Funktion übernehmen kann, in dem seine An- oder Abwesenheit zwischen Aktivierung und Toleranz unterscheidet. Zellen die *in vivo* IL-2 produzieren, sind in erster Linie aktivierte CD4+ Helferzellen (Malek and Bayer, 2004). Im Fall einer Infektion würde die Aktivierung von CD4+ T- Zellen oder auch von Gedächtniszellen dazu führen, dass lokal IL-2 in der Leber von diesen Zellpopulationen produziert würde. Dies könnte die Tolerierung naiver CD8+ T- Zellen durch LSEC beeinflussen.

Um in einem ersten *in vitro* Versuch zu klären, ob aktivierte CD4+ T- Zellen einen Einfluss auf die Toleranzinduktion haben, wurde eine Kokultur mit naiven OT- I T- Zellen und aktivierten CD4+ T- Zellen (DO11.10) im Kontext einer antigenpräsentierenden LSEC durchgeführt. Am Tag 5 der Kultur wurden die T- Zellen, nach Restimulation mit α -CD3, auf die Produktion von intrazellulärem IFN γ und IL-2 untersucht (Abb. 4.25).

Abb. 4.25:

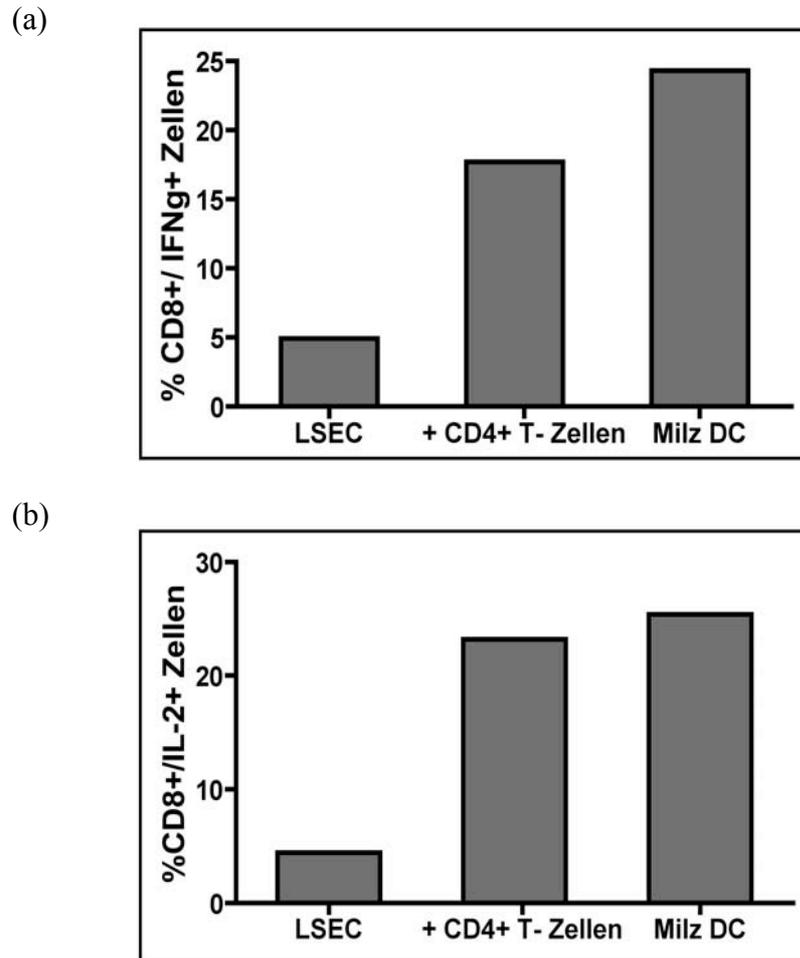


Abb. 4.25: Einfluss aktivierter CD4+ T- Zellen auf die Toleranzinduktion durch LSEC *in vitro*. Naive OT-I T- Zellen wurden mit aktivierten, transgene CD4+ T- Zellen (DO11.10), welche schon 18 Stunden zuvor zu den OVA- beladenen LSEC (H2^{bxd}) gegeben wurden, kokultiviert. DO11.10 CD4+ T- Zellen, wurden zuvor *in vivo* durch Infektion mit AdOVA, aktiviert. Als positiv Kontrolle wurden OT-I T- Zellen mit OVA beladenen Milz DC kultiviert. Am Tag der Kultur wurden tote Zellen mit Hilfe eines Lymphoprepgradienten abgetrennt und die T- Zellen 5 Stunden mit α -CD3 restimuliert. (a) IFN γ und (b) IL-2 (intrazellulär gefärbt, zeigt für lebende, CD8 positive Zellen)

Die Daten demonstrieren, dass aktivierte CD4+ T- Zellen einen deutlichen Einfluss auf die Toleranzinduktion durch LSEC hatten. In Anwesenheit aktivierter CD4+ T- Zellen fand keine Tolerisierung naiver CD8+ T- Zellen durch die antigenpräsentierende LSEC statt (Abb. 4.25a und b). Künftige Experimente müssen klären, ob dies auf die autokrine Produktion von IL-2 zurückzuführen ist oder auf eine direkte Zell- Zellinteraktion.

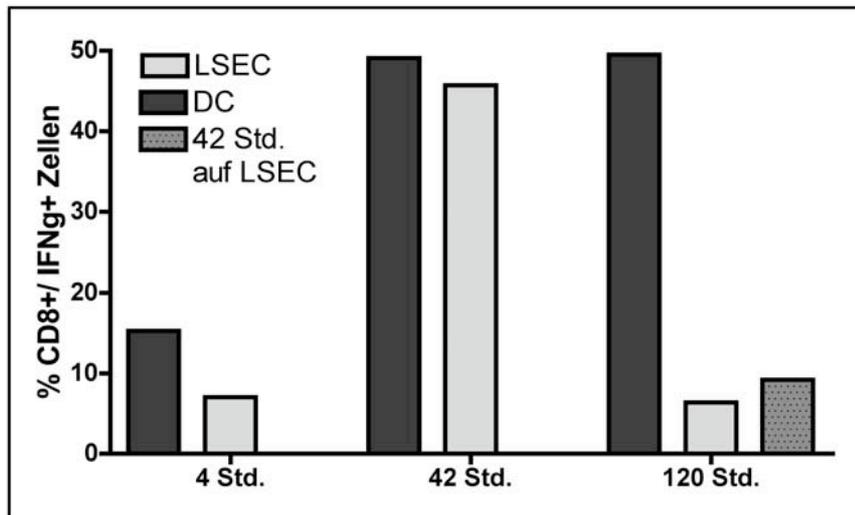
4.3.5 Toleranz basiert auf einer definierten Interaktionszeit zwischen T- Zelle und LSEC und unterscheidet sich von Anergie, durch fehlende Kostimulation

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung naiver CD8+ T- Zellen auf einer definierten Interaktionszeit zwischen APC und T- Zelle basiert. T- Zellen die weniger als 20 Stunden mit einer antigenpräsentierenden Zelle interagierten, waren nicht in der Lage, Effektorfunktionen auszuüben und gingen leichter in Apoptose (van Stipdonk et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob die Induktion von Toleranz in naiven CD8+ T- Zellen auf einem ähnlichen Prinzip einer definierten Interaktionszeit basiert, wurden T- Zellen nach bestimmten Zeitpunkten (4, 42 und 120 Stunden) der Interaktion mit LSEC abgenommen und ihre Fähigkeit Effektorzytokine zu produzieren untersucht. Dabei wurden die T- Zellen direkt mit α - CD3 restimuliert oder auf LSEC weiter transferiert, die kein Antigen präsentierten und an Tag 5 restimuliert (Abb. 4.26).

Abb. 4.26:

(a)



(b)

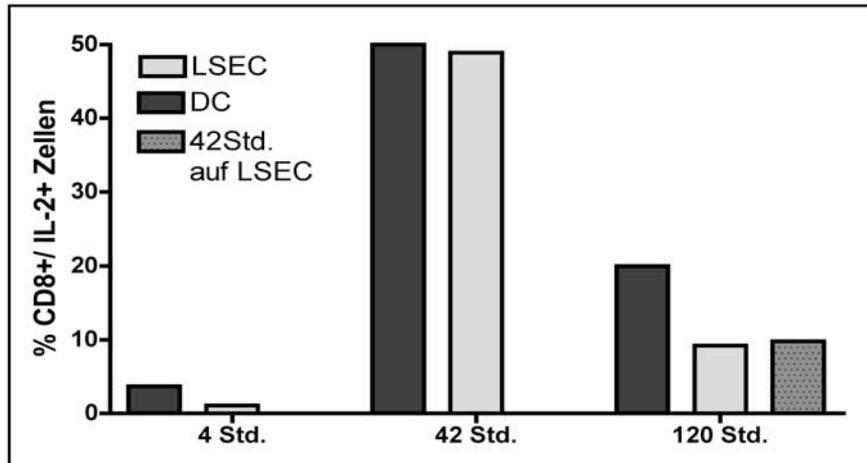


Abb. 4.26: Kinetik einer Kokultur naiver, transgener CD8⁺ T- Zellen auf antigenpräsentierenden LSEC oder Milz DC. DesTCR T- Zellen wurden mit LSEC und Milz DC, isoliert aus C57BL/6 Mäusen, kultiviert. Nach 4, 42 und 120 Stunden wurden die T- Zellen aus der Kokultur genommen direkt mit α -CD3 restimuliert und die Menge an IFN γ (a) oder IL-2 (b) intrazellulär gemessen. Parallel wurden nach 42Std. T- Zellen, welche mit LSEC interagierten aus der Kultur genommen und auf Antigen- freie APC (LSEC isoliert aus CBA Mäusen) transferiert. Diese Zellen wurden dort weitere 80Std. belassen und dann ebenfalls an Tag 5 (120Std.) restimuliert (42 Std. auf LSEC) (Gezeigt für CD8⁺ T- Zellen)

T- Zellen, die über einen Zeitraum von 4 Stunden mit DC oder LSEC kultiviert wurden, produzierten nach Restimulation noch keine signifikanten Mengen an IFN γ oder IL-2 (Abb. 4.26a und b). Diese Zellen schienen innerhalb der ersten 4 Stunden noch kein ausreichendes Aktivierungssignal erhalten zu haben und waren demnach weiterhin naiv. Wurden die Zellen jedoch nach 42 Stunden der Kokultur restimuliert, produzierten T- Zellen kultiviert mit Milz DC vergleichbar viel IFN γ und IL-2 wie T- Zellen kultiviert mit LSEC. Die T- Zellen waren nach 42 Stunden der Interaktion mit LSEC noch nicht tolerant geworden. Nahm man diese Zellen jedoch nach 42 Stunden ab und kultivierte sie weitere 80 Stunden ohne Antigen, waren sie am Ende der Kultur nicht mehr in der Lage, signifikante Mengen an IL-2 oder IFN γ zu produzieren (42Std. auf LSEC) (Abb. 4.26).

Daraus ließ sich schlussfolgern, dass T- Zellen die mit Antigen- präsentierenden LSEC interagierten innerhalb der ersten 20- 40 Stunden Signale erhielten, die in den folgenden Stunden zu Toleranz führten.

Die Expression der Kostimulatorischen Moleküle auf LSEC ist im Vergleich zu DC eher gering. Dass, eine fehlende Kostimulation zu T- Zelltoleranz führt, wurde mehrfach beschrieben (Schwartz, 1996). Um herauszufinden, ob naive CD8⁺ T- Zellen auf Grund

einer unzureichenden Kostimulation durch CD80 und CD86 seitens der LSEC tolerant werden, wurde in einer *in vitro* Kultur mit unterschiedlichen APC der Einfluss der Kostimulation untersucht.

DesTCR T- Zellen wurden *in vitro* mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen (DC), einer B-Zelllinie (LB27.4), welche wenig Kostimulatorische Moleküle exprimiert; einer Fibroblastenlinie (C57), welche keine Kostimulatorischen Moleküle auf der Oberfläche trägt, sowie mit LSEC kokultiviert. An Tag 5 der Kultur wurde die Proliferation und die Produktion von Zytokinen nach Restimulation mit α -CD3 untersucht (Abb. 4.27).

Abb. 4.27:

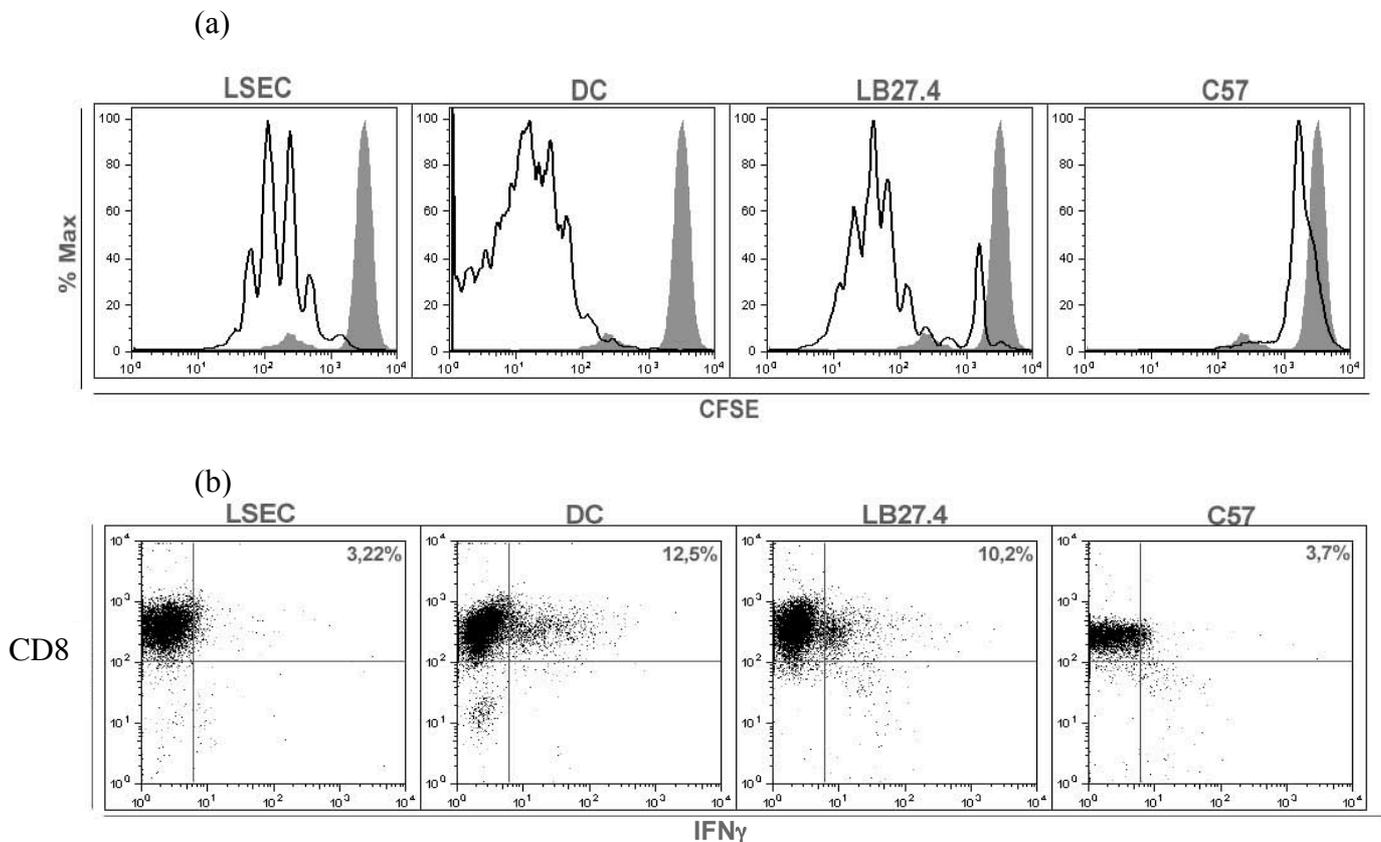


Abb. 4.27: Kokultur naiver T- Zellen mit APC unterschiedlichem Kostimulationvermögen. Naive DesTCR T- Zellen wurden mit LSEC, Milz DC, der B- Zelllinie LB27.4 oder der Fibroblastenlinie C57 über einen Zeitraum von 5 Tagen kokultiviert. An Tag 5 wurde die (a) Proliferation der T- Zellen, und nach Restimulation mit α - CD3 die (b) IFN γ Produktion durchflusszytometrisch untersucht.

Abhängig von der vorhandenen Kostimulation proliferierten T- Zellen kultiviert mit LSEC, DC oder B- Zellen in vergleichbarem Ausmaß. T- Zellen, welche mit Fibroblasten kultiviert worden waren, zeigten keine Zellteilung (Abb. 4.27a). Eine Restimulation der Zellen an Tag 5 zeigte, dass T- Zellen die mit LSEC kultiviert wurden, tolerant waren. Während T- Zellen,

kultiviert mit DC oder LB27.4, in der Lage waren, IFN γ zu produzieren. T- Zellen welche mit C57 interagiert hatten, zeigten ebenfalls keine Zytokinproduktion (Abb. 4.27b).

Auch wenn LSEC, vergleichbar mit LB27.4, nur über eine geringe Kostimulation verfügen, reichte diese aus, um T- Zellen zur Proliferation zu stimulieren. T- Zellen, welche keine Kostimulation seitens der APC (C57) erhielten, waren auch nicht in der Lage zu proliferieren und Zytokine zu produzieren. Der Toleranzprozess, der von LSEC induziert wird, scheint sich demnach von dem durch fehlende Kostimulation, wie er für Anergie beschrieben ist, zu unterscheiden.

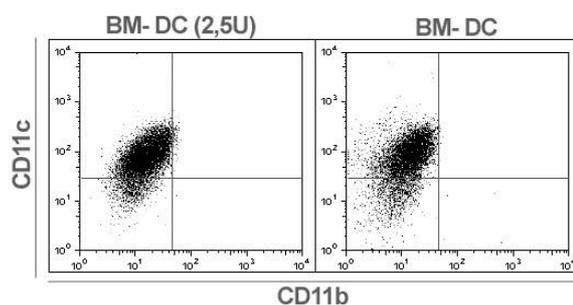
4.3.6 Etablierung eines weiteren Toleranzsystems *in vitro*, durch Generierung tolerogener Knochenmark- DC

Unreife oder tolerogene DC sind ebenfalls in der Lage T- Zellen antigen- spezifisch zu tolerisieren. Im Folgenden wurde ein weiteres Toleranzsystem *in vitro* etabliert. Dieses könnte künftig dazu beitragen, die zellulären Mechanismen der Toleranzinduktion in naiven CD8⁺ T- Zellen näher zu charakterisieren.

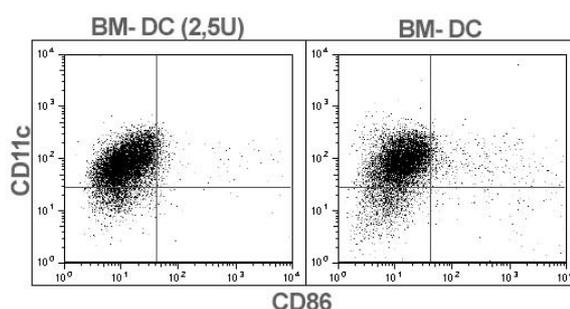
Nach einem Protokoll zur Generierung tolerogener DC (Lutz et al., 1999), wurden Knochenmarkszellen über einen Zeitraum von 10 Tagen mit 2,5U rekombinantem GM- CSF zu tolerogenen DC generiert. Die Analyse an Tag 10 zeigte einen DC Phänotyp mit einer schwachen Expression kostimulatorischer Moleküle (Abb. 4.28).

Abb. 4.28:

(a)



(b)



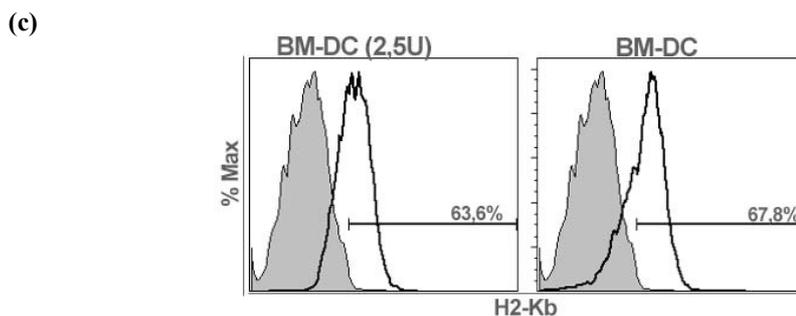


Abb. 4.28: Phänotyp von BM- DC generiert über einen Zeitraum von 10 Tagen aus Knochenmarkzellen. 5×10^6 Knochenmarkzellen wurden in einer Petrischale mit 10ml RPMI (10%FCS, 1% Pen./ Strep./ L- Glu) ausgesät. Zur Generierung von DC wurde 2,5U rekombiantes GM- CSF zugesetzt und alle 2 Tage das Medium erneuert. Zum Vergleich wurden BM- DC mit dem Standardprotokoll generiert. Dazu wurden ebenfalls 5×10^6 Knochenmarkzellen in einer Petrischale ausgesät und in IMDM + 30% Kulturüberstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie (Ag8653) kultiviert. An Tag 10 der Kultur wurden die Zellen mit Trypsin / EDTA abgelöst und ihr Phänotyp im Durchflusszytometer analysiert. Gefärbt mit α CD11c / α CD11a (a), α CD11c / α CD86 (b) und CD11c / H2K^b (c).

Knochenmarkzellen die über eine Dauer von 10 Tagen mit 2,5U rekombinaten GM- CSF kultiviert wurden, exprimierten den DC Marker CD11c, wie auch CD11b, wenig CD86 und vergleichbar viel MHC Klasse I (H2-K^b) (Abb. 4.28 a-c).

Um zu untersuchen, ob die generierten Knochenmark DC (BM-DC) in der Lage waren naive T- Zellen zu tolerisieren, wurden sie über einen Zeitraum von 5 Tagen mit naiven transgenen T- Zellen kokultiviert. An Tag 5 wurden die T- Zellen abgenommen, über Nacht mit α -CD3 restimuliert und die Menge an produziertem IFN γ wurde im Überstand quantifiziert (Abb. 4.29).

Abb. 4.29:

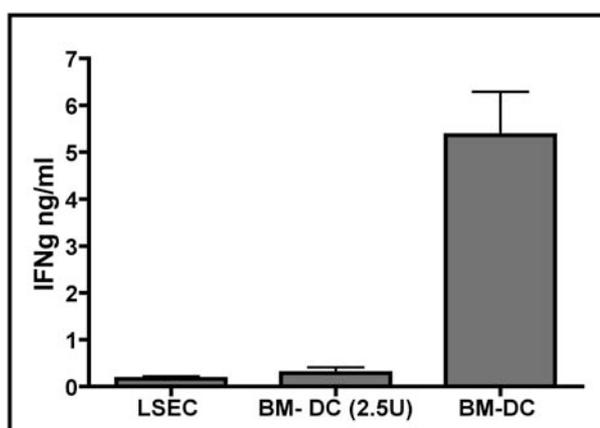


Abb. 4.29: Kokultur naiver CD8⁺ T- Zellen mit tolerogenen DC (2,5U). DestTCR T- Zellen wurden mit LSEC, tolerogenen Knochenmark DC (BM- DC (2,5U)) oder mit Knochenmark DC, welche nach einem.

Standardprotokoll generiert wurden, 5 Tage kultiviert. An Tag 5 wurden die T- Zellen über Nacht mit α - CD3 restimuliert und die Menge an IFN γ im Überstand mit Hilfe eines Sandwich ELISA quantifiziert.

Tolerogene BM-DC, generiert mit 2,5U GM- CSF, waren in der Lage naive CD8+ T- Zellen zu tolerisieren (Abb. 4.29).

Die Tolerisierung naiver CD8+ T- Zellen durch LSEC verlief über eine Phase der T- Zellstimulierung, während der die T- Zellen proliferierten und Marker, wie z.B. CD25 und CD69 exprimierten (Abb. 4.19 und 4.21). Um zu untersuchen ob die Tolerisierung durch tolerogene BM-DC nach einem ähnlichen Prinzip abläuft, wurden die T- Zellen mit CFSE markiert und die Proliferation an Tag 5 der Kultivierung durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.30).

Abb. 4.30:

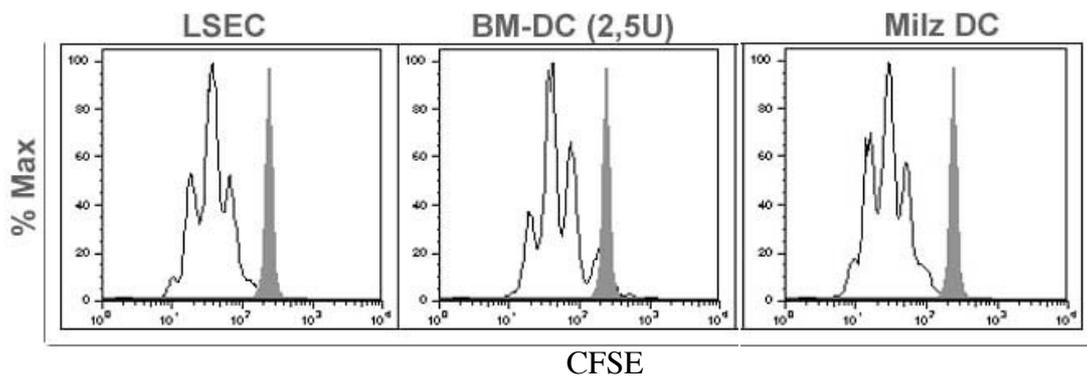


Abb. 4.30: Proliferationsprofil von CD8+ T- Zellen an Tag 5 der Kokultur mit LSEC, tolerogenen DC (2,5U), normalen BM- DC oder Milz DC. Naive DesTCR T- Zellen wurden mit CFSE markiert und 5 Tage in einer 24-Loch Platte mit LSEC, tolerogenen BM-DC (2,5U), normalen BM-DC oder Milz DC kultiviert. Die Proliferation wurde an Hand der CFSE Verdünnung durchflusszytometrisch analysiert. (grau/ gefüllt= DesTCR an Tag 0 nach CFSE Markierung, gezeigt für CD8+ Zellen)

CD8+ T- Zellen, die nach 5- tägiger Kultivierung mit tolerogenen BM- DC tolerant wurden, proliferierten in vergleichbarer Weise, wie CD8+ T- Zellen die durch Milz DC oder normale BM-DC aktiviert wurden.

IL-2 schien bei der Entstehung von Toleranz durch LSEC ein regulierender Faktor zu sein. Ob IL-2 auch bei der Toleranzinduktion durch tolerogene DC eine Rolle spielt, wurde im Folgenden untersucht. Naive T- Zellen wurden mit tolerogenen DC, mit und ohne Zugabe von IL-2 kultiviert und an Tag 5 restimuliert (Abb. 4.31).

Abb. 4.31:

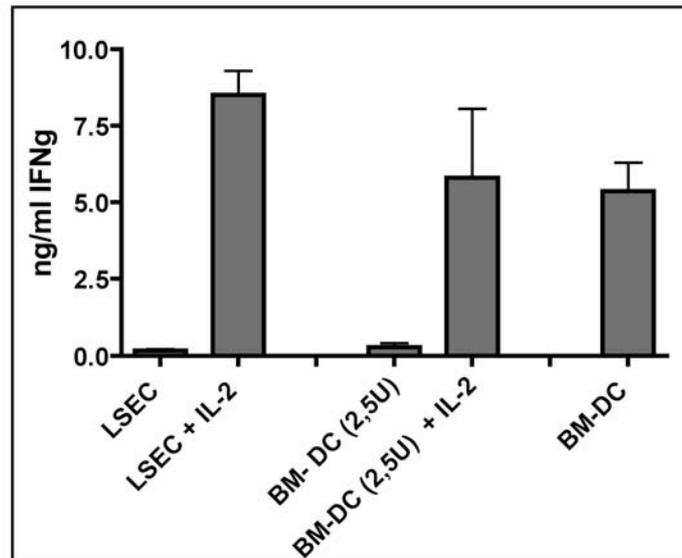


Abb. 4.31: Kokultur naiver CD8⁺ T- Zellen mit tolerogenen DC, LSEC oder normalen BM-DC mit ohne Zugabe von IL-2. Naive DesTCR T- Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen mit antigenpräsentierenden LSEC, tolerogenen BM- DC (2,5U), oder normal generierten BM- DC mit und ohne Zugabe von 10ng/ml IL-2 an Tag 0 kultiviert. An Tag 5 wurden die T- Zellen mit einem α -CD3 Antikörper für 18 Stunden restimuliert und die Menge an IFN γ im Überstand mit Hilfe eines Sandwich ELISA quantifiziert.

Die Zugabe von IL-2 verhinderte auch bei der Kultivierung mit tolerogenen BM- DC eine Toleranzinduktion in naiven T- Zellen (Abb. 4. 31). Entscheidend für die Erkennung von IL-2 ist die Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors auf der Oberfläche der T- Zellen. Bei der Kultivierung von CD8⁺ T- Zellen mit LSEC konnte beobachtet werden, dass CD25 zwar während der Kokultur herauf reguliert wurde, nach 72 Stunden aber nicht mehr detektierbar war (Abb. 4.21). Um herauszufinden, ob eine solche zeitliche Regulation des Moleküls auch bei der Kultivierung mit tolerogenen DC statt findet, wurde die Expression von CD25 auf naiven T- Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert (Abb. 4.32).

Abb. 4.32:

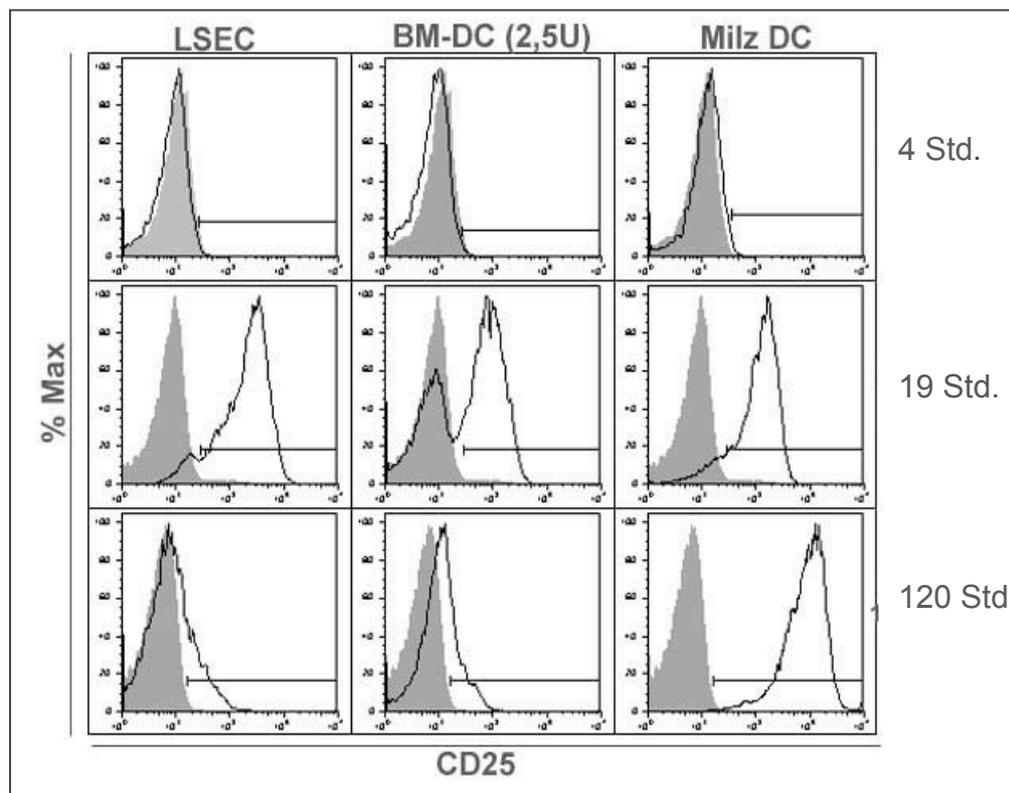


Abb. 4.32: CD25 Expression auf T- Zellen kultiviert mit LSEC, tolerogenen BM-DC (2,5U) oder Milz DC. Naive DesTCR T- Zellen wurden mit LSEC, BM-DC (2,5U) oder Milz DC, isoliert aus C57BL/6 Mäusen, kokultiviert. Die Expression von CD25 auf der Oberfläche wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. (grau/ gefüllt= CD25 Expression auf naiven CD8+ T- Zellen an Tag 0, gezeigt für CD8+ Zellen).

CD25 wurde auf T- Zellen, welche mit tolerogenen BM- DC kultiviert wurden, zu Beginn der Interaktion (19 Stunden) hoch reguliert. Wie bei der Kultivierung mit LSEC beobachtet, wurde CD25 gegen Ende der Kultur herunter reguliert und war nicht mehr auf der Oberfläche der T- Zellen detektierbar. Bei T- Zellen, welche mit Milz DC kultiviert wurden, blieb CD25 dagegen während der gesamten Interaktionsdauer auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 4.32).

Die Kultivierung naiver CD8+ T- Zellen mit tolerogenen Knochenmark DC, induzierte einen toleranten Phänotyp in diesen T- Zellen (Abb. 4.29). Die Toleranzinduktion konnte ebenfalls durch IL-2 Zugabe verhindert werden (Abb. 4.31) und es fand eine Regulation von CD25 auf der Zelloberfläche im Laufe der Kultivierung statt (Abb. 4.32).

Mit rekombinantem GM-CFS generierte tolerogene DC könnten somit ein weiteres *in vitro* System darstellen, um antigen- spezifische T- Zelltoleranz zu studieren.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zum Verständnis der Rolle der sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) bei der Vermittlung spezifischer T- Zelltoleranz gegenüber oraler, Tumor-assoziiertes und löslicher Antigene beizutragen. Diese sessile Zellpopulation in der Leber unterscheidet sich grundsätzlich von den Endothelzellen anderer Gewebe. LSEC exprimieren alle immunologisch relevanten Moleküle, um mit passierenden Lymphozyten zu interagieren. Sie sind in der Lage, äußerst effizient Antigene aufzunehmen und können diese auf MHC Klasse I kreuzpräsentieren. Eine antigen- spezifische Interaktion zwischen einer LSEC und einer naiven CD8⁺ T- Zelle führt jedoch zu T- Zelltoleranz (Limmer, 2000).

Die Daten zeigten einerseits, dass diese besondere APC Population der Leber zu der Etablierung einer peripheren, oralen Toleranz beitragen. Auf der anderen Seite trug die tolerogene Eigenschaft dieser Zellen zu der Entstehung einer Tumorantigen- spezifischen Toleranz bei. Die genauere Untersuchung der zellulären Mechanismen zeigte, dass deren Verlauf von der Interaktionsdauer mit der LSEC abhing und sich von dem einer Anergieinduktion unterschied. Es konnte gezeigt werden, dass IL-2 eine wichtige Rolle als regulativer Faktor im Verlauf der Tolerisierung hatte.

5.1 LSEC tragen zu der Etablierung oraler Toleranz bei

Die Aufnahme von Antigenen über die orale Route induziert eine antigen- spezifische, so gennante, orale Toleranz. Als Ort der Entstehung dieser Form der peripheren Toleranz wurde bislang der Gastrointestinaltrakt und hier im Wesentlichen die mesenterischen Lymphknoten, beschrieben (Kraal et al., 2006; Spahn et al., 2001; Spahn et al., 2002). Orale Antigene konnten nach Resorption jedoch in geringen Konzentrationen auch im Blut detektiert werden. Welches einen Transport oraler Antigene in die peripheren Organe nicht ausschließt (Husby et al., 1985). Die anatomische Lage der Leber impliziert, dass sie mit dem Gastrointestinaltrakt eng assoziiert ist. Die Leber wird direkt mit Blut aus dem Intestinalbereich drainiert, was dazu führt, dass ständig Nahrungsantigene und bakterielle Bestandteile in die Leber gelangen. Somit liegt eine der Hauptaufgaben der Leber auch in der Beseitigung dieser Stoffe. Frühere Studien zeigten schon indirekt eine Rolle der Leber bei der Entstehung oraler Toleranz. So verhinderte z.B. die chirurgische Abzweigung des Blutflusses

vom Intestinalbereich zur Leber die Induktion einer Toleranz gegenüber oraler Antigene (Yang et al., 1994). Dies zeigte aber noch keine mechanistischen Erkenntnisse oder Hinweise welche hepatische Zellpopulation in diesem Prozess involviert war. Die sessilen LSEC der Leber stellen eine sessile Zellpopulation dar, die auf Grund ihrer gezeigten tolerogenen Eigenschaften (Limmer et al., 2000) zu diesem Prozess beitragen könnten. Dieser Frage wurde im ersten Abschnitte der vorliegenden Arbeit nachgegangen.

Zwei prinzipielle Mechanismen führen zu oraler Toleranz: 1) Die aktive Suppression durch regulatorische CD4⁺ T- Zellen, oder 2) die Induktion einer klonalen Anergie oder Deletion (Faria and Weiner, 2005). Welcher Mechanismus zum Zuge kommt, hängt ganz entscheidend von der Antigenosis ab. Eine niedrige Antigenosis begünstigt die Entstehung regulatorischer T- Zellen im Gastrointestinaltrakt. Eine hohe Dosis führt in der Peripherie zu Anergie oder Deletion (Friedman and Weiner, 1994). Die meisten dieser Erkenntnisse basieren auf Untersuchungen transgener CD4⁺ T- Zellmodelle. Dabei kamen Analysemethoden, wie die DTH² Antwort, Proliferation, und Zytokinproduktion zum Einsatz. Die Untersuchungen in dieser Arbeit basierten dagegen auf der Analyse der CD8⁺ T- Zellantwort, welche an Hand der zytotoxischen Aktivität und Zytokinproduktion bestimmt wurde. Da gezeigt werden konnte, dass CD4⁺ T- Zellen nicht von LSEC tolerisiert werden, (Knolle et al., 1999) wurde deren Rolle in der Induktion oraler Toleranz im Zusammenhang mit naiven CD8⁺ T- Zellen untersucht.

Die sessile Population der LSEC in der Leber nahmen oral applizierte Antigene äußerst effektiv auf und waren in der Lage, diese *in vitro* an CD8⁺ T- Zellen zu kreuzpräsentieren (4.1.1). Die Eigenschaft der Kreuzpräsentation exogener Antigene durch LSEC (Limmer, 2000) ist von besonderer Bedeutung, da diese bislang nur für professionelle APC beschrieben wurde (Bevan, 1976; Rock et al., 1990; Shen et al., 1997). Der Transfer von LSEC, welche aus OVA gefütterten Tieren isoliert wurden, induzierte eine antigen- spezifisch T- Zelltoleranz *in vivo* (4.1.2). Diese Befunde weisen auf eine Rolle der Leber in der frühen Phase der Entstehung oraler Toleranz hin. LSEC würden demnach dazu beitragen, die Aktivierung naiver CD8⁺ T- Zellen zu verhindern. Dass es im Verlauf der Induktion oraler Toleranz zu einer Phase der T- Zellaktivierung kommen kann, wurde von unabhängigen Gruppen gezeigt (Blanas et al., 1996; Gutgemann et al., 1998; Liu and Lefrancois, 2004; Sun et al., 1999). Eine Kontrolle solcher aktivierter CD4⁺ T- Zellen in einem autoimmunen Kolitis- Modell konnte durch die Generierung regulatorischer CD4⁺ T- Zellen (Tr1) erzielt

² engl.: DTH = *delayed type hypersensitivity*

werden (Groux et al., 1997). Auch im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich, dass regulatorische CD4⁺ T- Zellen eine wichtige Funktion in der Kontrolle aktivierter T- Zellen übernehmen (4.1.3, Abb. 4.4). Dieses Experiment unterstrich die Bedeutung der regulatorischer CD4⁺ Zellen bei der Kontrolle aktivierter CD8⁺ T- Zellen. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützen ein Modell, bei dem in einer frühen Phase der Entstehung oraler Toleranz LSEC dazu beitragen, naive CD8⁺ T- Zellen zu kontrollieren. Während dieser Phase generieren auch antigen- spezifische regulatorische CD4⁺ T- Zellen, die in der späteren Phase aktivierte CD8⁺ T- Zellen kontrollieren können und somit zu einer systemischen Toleranz beitragen. LSEC schienen in dieser späteren Phase nicht mehr direkt an der Tolerisierung der T- Zellen beteiligt gewesen zu sein, trugen aber als antigenpräsentierende Zellen indirekt zu der Kontrolle aktivierter CD8⁺ T- Zellen bei (4.1.3, Abb. 4.4).

Der Induktion oraler Toleranz in einer späten Phase, in der bereits aktivierte T- Zellen vorlagen, konnte ein Deletionsmechanismus zu Grunde gelegt werden (4.1.3, Abb. 4.4b). Die orale Gabe des Antigens im Zuge einer Virusinfektion sollte die späte Phase des Verlaufs einer Toleranzinduktion imitieren in der antigen- spezifische T- Zellen vorliegen (4.1.3, Abb. 4.3). Der beobachtete Deletionsmechanismus in diesem experimentellen System muss auf einen aktiven Prozess zurückgeführt werden und kann nicht mit einer sogenannten „*exhaustion*“ oder einer verstärkten Kontraktionsphase der T- Zellen (Badovinac et al., 2002; Badovinac et al., 2004; Van Parijs and Abbas, 1998) erklärt werden. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass es auch 21 Tage nach Infektion mit einem AdOVA- Virus noch nicht zu einer signifikanten Kontraktion der antigen- spezifischen CD8⁺ T- Zellpopulation kam (F. Jüngerkes, nicht publizierte Daten). Eine erhöhte Sensibilität der Zellen gegenüber Apoptose- induzierender Mechanismen, wie sie bei oraler Toleranz bereits beschrieben wurde, könnten hier ebenfalls zu der Deletion beigetragen haben (Chen et al., 1995; Faria and Weiner, 2005; Garside and Mowat, 2001). Eine Deletion von T- Zellen, welche durch LSEC tolerisiert wurden, konnte zuvor weder *in vitro* noch *in vivo* beobachtet werden und war auch in diesem Transferexperiment nicht zu erwarten (4.1.3, Abb. 4.4). Die beobachtete Toleranz war hier auf die Aktivität der regulatorischen CD4⁺ T- Zellen zurückzuführen, von denen bereits beschrieben wurde, dass sie in der Leber aktiv Apoptose induzieren können (Watanabe et al., 2002). Im Zusammenhang mit der Etablierung oraler Toleranz wurde beschrieben, dass regulatorische CD4⁺ T- Zellen unter anderem in den leberdrainierenden Lymphknoten generieren (Hultkrantz et al., 2005). Ob auch weitere Zellpopulationen an der beobachteten Tolerisierung bereits aktivierter CD8⁺ T- Zellen beteiligt sind, sollte in weiteren Studien

untersucht werden. Auch der Mechanismus könnte Gegenstand der weiteren Untersuchungen sein. Hier wäre zu analysieren, ob wirklich Apoptose induziert wird, da auch in CD95L-defizienten Tieren die Induktion oraler Toleranz beobachtet werden konnte (Faria and Weiner, 2005).

Auch in der Transplantationsmedizin wurden schon früh die tolerogenen Eigenschaften der Leber beobachtet (Calne et al., 1969). Neben dem Metabolismus aufgenommener Stoffe haben die Zellen der Leber, in erster Linie Kupffer Zellen und LSEC, die Aufgabe der Beseitigung bakterieller Substanzen wie LPS (Jacob et al., 1977; Lumsden et al., 1988). In anderen peripheren Organen wird in der Regel nach Kontakt einer DC mit LPS die Maturierung und daraus folgend Immunität induziert (Banchereau and Steinman, 1998). Die effektive Beseitigung dieser Substanzen in der Leber ist demnach essentiell, um unkontrollierte Immunreaktion zu unterbinden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass bei einer Leberzirrhose die Etablierung der oralen Toleranz gestört war und die unzureichende Beseitigung bakterieller Stoffe zu einer systemischen Immunreaktion gegenüber Nahrungsantigenen führte (Thomas et al., 1976). Im Gegensatz zu den DC wiesen LSEC nach Kontakt mit TLR-L keine veränderte Funktion auf. Es konnte zwar eine erhöhte IL-6 Produktion *in vitro* beobachtet werden, diese hatte jedoch keinen Einfluss auf die tolerogenen Eigenschaften dieser hepatischen Zellpopulation (B. Schumak, nicht veröffentlichte Daten). Diese speziellen Eigenschaften unterscheiden die Leber von den anderen peripheren Organen und heben ihre wichtige immunologische Funktion in der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz hervor.

Eine aktuelle Untersuchung von Worbs et al. begrenzt allerdings die Erkennung oraler Antigene ausschließlich auf den Intestinalbereich. Die Induktion oraler Toleranz ist demnach abhängig von einem DC -assoziierten Transport der oral aufgenommenen Antigene in den mesenterischen Lymphknoten und induziert, diesen Daten nach, nur hier eine Immunantwort (Worbs et al., 2006). Diese Studie weicht von den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen und denen anderer unabhängiger Gruppen ab, welche alle zeigten, dass auch in peripheren Organen, wie Milz und Lymphknoten, orale Antigene erkannt werden und dort eine Immunantwort induzieren werden kann (Garside and Mowat, 2001; Gutgemann et al., 1998; Hultkrantz et al., 2005; Mowat, 2003; Nagatani et al., 2006; Trop et al., 1999; Watanabe et al., 2002). Diese unterschiedlichen Ergebnisse zum Ort der Erkennung oraler Antigene und Induktion einer Toleranz könnten ganz unterschiedliche Ursachen haben. Ein jedoch

entscheidender Faktor könnte die verabreichte Antigenosis sein. Auf dieser basieren die verschiedenen Mechanismen der oralen Toleranz und damit wahrscheinlich auch die unterschiedlichen Befunde.

Diese Daten weisen erstmals auf eine Beteiligung der sessilen, sinusoidalen Leberendothelzellen bei der Induktion einer Toleranz in CD8⁺ T- Zellen gegenüber oral aufgenommenen Antigenen hin. Der überwiegende Anteil der bisherigen Untersuchungen zur oralen Toleranz basiert auf Studien der CD4⁺ T- Zellantwort. In dieser Arbeit konnte jedoch ein deutlicher Einfluss oraler Antigene auf die primäre Aktivierung und auf bereits aktivierte CD8⁺ T- Zellen gezeigt werden.

5.2 Tumor *escape* durch Präsentation von Tumor- assoziierten Antigenen durch LSEC in der Leber

Eine zentrale Frage in der Tumorummunologie ist es, ob die Erkennung von Tumorantigenen zu einer Aktivierung, oder zu einer Tolerisierung des Immunsystems führt (Pardoll, 2003). Beobachtungen zeigten, dass es trotz einer erfolgreichen Elimination, basierend auf einer effektiven *immune surveillance*, zu einem späteren Zeitpunkt, zu einem progressiven Tumorwachstum kommen konnte (Shankaran et al., 2001). Dieses Phänomen basiert auf einem, als *immuno editing* bezeichneten, Prozess (Dunn et al., 2002). Dieser umfasst drei Phasen: 1) (*elimination*) in einer frühen Phase findet eine Elimination von Tumorzellen, auf Grund der Expression von Tumorantigenen, statt 2) (*equilibrium*) ist diese Elimination nicht vollständig, kann es zur Selektion schwach immunogener Tumorvarianten kommen. 3) Diese können (*tumor escape*) im Folgenden einer Überwachung durch das Immunsystem entgehen (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004). Demnach kann eine frühe Antitumorantwort eine spätere Entstehung von Tumoren sogar begünstigen (Shankaran et al., 2001) *Tumor escape* basiert im Wesentlichen auch auf der Induktion von Toleranz, entweder seitens des Tumors selbst (Willimsky and Blankenstein, 2005) oder durch Präsentation Tumor- assoziierter Antigene in Abwesenheit ausreichender Kostimulation durch DC in den peripheren Lymphorganen (Melief, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob die Leber, auf Grund ihrer tolerogenen Eigenschaften, zu einem *tumor escape* Mechanismus beiträgt. Dies könnte bedeuten, dass Tumore die hämatogen in die Leber metastasieren einen Selektionsvorteil besäßen.

Die Induktion von Toleranz in der Leber, wie zuvor für orale Antigene beschrieben (4.1), ermöglichte auch Tumoren der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen (4.2). Hier führte eine anfänglich erfolgreiche *immune surveillance* im späteren Verlauf zu einer aktiven Induktion Tumorantigen- spezifischer Toleranz in CD8+ T- Zellen. Auch hier waren LSEC beteiligt, indem sie nach einer initialen Antitumorantwort apoptotisches Zellmaterial aufnahmen und naive CD8+ T- Zellen, durch Kreuzpräsentation Tumor- assoziierter Antigene, *in vitro* und *in vivo* tolerisierten (4.2).

Wie zuvor beschrieben, ist die Leber über die Blutzirkulation eng mit dem Gastrointestinaltrakt assoziiert. Dies führt dazu, dass bevorzugt Tumore des Intestinalbereichs (z.B. Kolonkarzinome) nach erfolgreicher Extravasation aus dem Gewebe mit der Blutzirkulation in die Leber metastasieren. Hier begünstigt zunächst die Interaktion mit den hepatischen Endothelien und der langsame Blutfluss in den engen Sinusoiden einen Arrest der Tumorzellen (Vidal-Vanaclocha et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Leber über eine ungewöhnlich große Population innater Immunzellen, die NK- und NKT- Zellen, verfügt (Wingender et al., 2006). Diese Zellen vermittelten eine erste erfolgreiche Antitumorantwort (4.2.1, Abb. 4.5), indem sie Tumorzellen durch TRAIL- vermittelte Apoptose (Smyth et al., 2001a) eliminierten.

Unter inflammatorischen Bedingungen führt die Aktion von Zellen des innaten Immunsystems in der Regel dazu, im Folgenden den adaptiven Arm zu aktivieren (Janeway, 2001). Die Aktivierung des adaptiven Arms setzt die Maturierung antigen- präsentierender DC voraus, um eine effiziente T- Zellantwort induzieren zu können. LSEC sind dagegen unempfindlich für diese Signale und induzieren auch in deren Anwesenheit Toleranz. Daher induzierte eine initiale, erfolgreiche Antwort innater Immunzellen keine effektive adaptive Antitumorantwort in der Leber, sondern führte zu einer Tumorantigen- spezifischen Toleranzsituation. Diese äußerte sich im Wachstum eines subkutanen Tumors, der dasselbe Tumorantigen trug, wie ein zuvor injizierter allogener Tumor (4.2.2, Abb. 4.6). Der subkutan applizierte syngene Tumor wurde in unbehandelten Tieren, auf Grund der Expression des Tumorantigens, erfolgreich abgestoßen. Dies deutet daraufhin, dass der Ort der Entstehung einer Tumor- spezifischen Immunantwort von Bedeutung ist. Entgegen erster Berichte konnte mittlerweile gezeigt werden, dass Tumore, welche außerhalb lymphatischer Organe entstehen, nicht ignoriert werden (Ochsenbein et al., 2001). Entweder erfolgt eine Erkennung direkt durch Tumorzellen, die in lymphatischen Organe metastasieren, oder indirekt über DC, welche Tumorantigene in der Peripherie aufnehmen, in die lymphatischen Organe migrieren

und sie dort T- Zellen kreuzpräsentieren (Cho and Bhardwaj, 2003; Morelli et al., 2003; Nowak et al., 2003). Ob diese Kreuzpräsentation jedoch zu einer Aktivierung oder einer Toleranzinduktion führt, hängt wesentlich von den Signalen ab die die DC erhält. Die Invasion eines Tumors zu Beginn des Metastasierungsprozess zerstört umgebendes Gewebe und kann ausreichende Signale liefern, um DC zu aktivieren und im Folgenden eine Tumorantwort zu induzieren (Fuchs and Matzinger, 1996). Studien progressiver Tumore legen jedoch die Vermutungen nahe, dass es durch die Abwesenheit inflammatorischer Signale jedoch auch zu einer Tolerisierung der T- Zellen kommt, welche mit immaturren DC interagieren (Fuchs and Matzinger, 1996). Dies stellt ein großes Problem der Induktion einer effektiven Antitumorantwort dar, da unter nicht- inflammatorischen Umständen eine Unterscheidung zwischen „entartet“ und „selbst“ getroffen werden muss.

LSEC nahmen nach erfolgreicher Elimination der Tumorzellen sehr effektiv apoptotisches Zellmaterial *in vitro*, als auch *in vivo* auf (4.2.3, Abb. 4.8- 4.10 und 4.2.4, Abb. 4.11) (Dini and Carla, 1998). Entgegen den Beobachtungen anderer Gruppen (Iyoda et al., 2002) war dieser Prozess *in vivo* anscheinend so effektiv, dass in der DC Population der Milz kaum eine Aufnahme von apoptotischem Material detektiert werden konnte (4.2.4, Abb.4.11). Der Großteil des apoptotischen Zellmaterials wurde durch die hepatischen Zellen (LSEC und DC) der Leber aufgenommen (4.2.4, Abb.4.11). Es konnte in diesem Zusammenhang erstmals gezeigt werden, dass LSEC in der Lage waren, auch Zell- assoziiertes Antigen auf MHC Klasse I Molekülen naiven CD8⁺ T- Zellen zu kreuzpräsentieren (4.2.5). Dies induzierte *in vitro* und *in vivo* eine antigen- spezifische CD8⁺ T- Zelltoleranz (4.2.6 und 4.2.7). Auch unter normalen Umständen sind LSEC an der Beseitigung zellulärer Bestandteile beteiligt. Nach einer erfolgreichen Immunantwort kommt es zu einer lokalen Elimination der Lymphozyten in der Leber (Huang et al., 1994). Dies ist ein physiologischer Mechanismus, um den Pool expandierter T- Zellen wieder zu normalisieren. Der Toleranzinduktion durch LSEC kommt in dieser Situation eine äußerst wichtige Rolle zu. Sie sind dafür verantwortlich, die periphere Toleranz gegenüber „selbst“- Antigenen aufrecht zu erhalten. Der Befund, dass LSEC in der Lage waren, apoptotische Tumorzellen aufzunehmen, setzte einen aktiven Phagozytosemechanismus dieser Zellen voraus, wie er bereits für LSEC beschrieben werden konnte (Steffan et al., 1986). Aktive Phagozytose ist eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft der LSEC und unterscheidet sie von anderen Endothelzellpopulation.

In einem Transferexperiment, bei dem transgene CD8⁺ T- Zellen in RAG2- defiziente Tiere transferiert wurden, kam es zu einer homeostatischen Proliferation der T- Zellen, welche mit einer Aktivierung einhergeht (Brown et al., 2006; Schluns et al., 2000). Die homeostatische Proliferation kann zu einer Reaktivierung anergischer T- Zellen führen (Brown et al., 2006; Schluns et al., 2000). Auch in dieser Situation waren transferierte LSEC jedoch in der Lage, die T- Zellen Antigen- spezifisch zu tolerisieren (4.2.7, Abb. 4.16).

Wie zuvor beschrieben, nahmen *in vivo* neben den LSEC auch hepatische DC einen Großteil der injizierten apoptotischen Tumorzellen auf. Diese DC Population wurde auf Grund des suppressiven Milieu der Leber (TGF- β und IL-10 Produktion) ebenfalls als tolerogen beschrieben (Lau and Thomson, 2003; Steinbrink et al., 1997). Der Transfer hepatischer DC induzierte *in vivo* jedoch keine Tumorantigen- spezifische Toleranz, sondern eine spezifische Immunantwort (4.2.7, Abb. 4.17). Die Art der Immunantwort, welche durch DC induziert wird, hängt wesentlich von äußeren Signalen ab (Banchereau and Steinman, 1998). Aus diesem Grund ist eine Maturierung dieser Zellen durch den Transferprozess nicht auszuschließen. Von LSEC konnte gezeigt werden, dass sie nach Transfer in der Leber des Empfängertieres orthotrop implantieren (Limmer et al., 2000). Transferierte hepatische DC dagegen wurden wahrscheinlich auch in andere Organe verteilt. Dies könnte dazu geführt haben, dass sie außerhalb des tolerogenen Milieus der Leber eher Immunität induzierten. Die Rolle hepatischer DC im Rahmen der Antitumorantwort bedarf demnach weiterer Untersuchungen.

Der Einfluss einer erfolgreichen innate Immunreaktion in der Leber auf eine spätere adaptive Tumorantwort schließt eine Beteiligung regulatorischer T- Zellen nicht aus. Die transferierten Tumorzellen konnten auf Grund fehlender Kreuzpräsentation zwar nicht direkt mit CD8⁺ T- Zellen interagieren. Jedoch waren sie in der Lage, das Antigen auf MHC Klasse II Molekülen CD4⁺ T- Zellen zu präsentieren (4.2.2, Abb. 4.7). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass regulatorische T- Zellen einen Einfluss auf eine erfolgreiche Tumorantwort haben (Sakaguchi, 2000). Die Elimination regulatorischer T- Zellen führte dazu, dass eine effektive Immunantwort gegenüber syngener Tumore induziert werden konnte, welche sonst ignoriert wurden (Shimizu et al., 1999). Da auch LSEC über die Expression von MHC Klasse II Molekülen verfügen, ist die Interaktion mit regulatorischen CD4⁺ T- Zellen (Wiegard et al., 2005), wie zuvor bei der oralen Toleranz beschrieben (4.1.3, Abb. 4.4), möglich (Knolle et al., 1999). Eine Rolle regulatorischer T- Zellen in einer durch LSEC vermittelten

Tumorantigen- spezifischen Toleranz sollte demnach in künftigen Studien weiter analysiert werden.

Die gewonnen Daten lassen die Vermutung zu, dass der Ort der Entstehung einer Immunantwort gegenüber eines Tumors, einen entscheidenden Einfluss auf die Ausgang der Immunantwort hat. Während in peripheren Organen eher eine protektive Immunantwort induziert wird, findet in der Leber langfristig eine Toleranzinduktion statt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten legen ein Konzept nahe, in dem es nach Metastasierung von Tumorzellen in die Leber zunächst zu einer erfolgreichen *immune surveillance*, vermittelt durch hepatische NK1.1, positive Zellen kommt. Apoptotische Tumorzellen werden im Folgenden lokal elimiert, unter anderem von LSEC, welche Tumor-assoziierte Antigene kreuzpräsentieren können. Dies induziert in naiven interagierenden CD8⁺ T- Zellen eine antigen- spezifische Toleranz, welche langfristig zu einem Tumor *escape* führt. Eine Konsequenz dieses Konzeptes wäre ein Wachstumsvorteil eines soliden Tumors, der hämatogene Metastasen ausbildet.

Die hier beschriebenen Erkenntnisse könnten die klinische Beobachtung erklären, dass eine Formation von Lebermetastasen mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden ist.

5.3 Zelluläre Mechanismen einer durch LSEC vermittelten T- Zelltoleranz

Die Beobachtungen, dass LSEC naive CD8⁺ T- Zellen durch Kreuzpräsentation oraler, Tumor- assoziierter oder löslicher Antigene tolerisieren (4.1 und 4.2(Limmer et al., 2000), führte im Folgenden zu einer näheren Untersuchung der zellulären Mechanismen dieser Toleranzinduktion (4.3).

CD8⁺ T- Zellen, welche über einen Zeitraum von 5 Tagen mit antigenpräsentierenden LSEC interagierten, zeigten einen charakteristischen Phänotyp. Diese Zellen waren nicht mehr in der Lage, Effektorfunktionen auszuüben (4.3.1, Abb. 4.19). Dies wurde auch für anergische T- Zellen beschrieben, die auf Grund mangelnder Kostimulation tolerant wurden (Arnold, 2002; Lamb et al., 1983; Schwartz, 1996). Die Daten zeigten jedoch, dass der Verlauf der Toleranzinduktion, vermittelt durch LSEC, sich wesentlich von dem einer Anergieinduktion unterschied (4.3.5, Abb. 4.28). LSEC- vermittelte Toleranz verlief über eine Phase der Stimulierung. T- Zellen, die zum Ende einer Kokultur nicht mehr in der Lage waren,

Effektorfunktionen auszuüben proliferierten in gleichem Maße wie T- Zellen, welche durch DC aktiviert wurden (4.3.2, Abb. 4.19 und 4.20). Neben der Proliferation der T- Zellen im Verlauf der Tolerisierung durch LSEC, konnte die Expression von CD69 (4.3.2, Abb. 4.21) und die Regulation von CD44 (Daten nicht gezeigt) auf der Zelloberfläche registriert werden, was auf einen vorübergehenden stimulierten Status der Zellen hinweist. Der Verlauf einer Toleranz über eine Phase der Stimulation konnte auf eine definierte Interaktionszeit der T- Zelle mit der LSEC bezogen werden (4.3.5, Abb. 4.26). Wie bereits für die Aktivierung naiver CD8+ T- Zellen gezeigt, schien auch die Induktion einer Antigen- spezifischen Toleranz durch LSEC auf einer definierten Interaktionsdauer zu beruhen. In zwei unabhängigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung naiver CD8+ T- Zellen über einen Zeitraum von 4 bzw. 6- 18 Stunden *in vivo* zu einer unvollkommenen Proliferation und einer reduzierten CD25 Expression führte. T- Zellen hingegen, welche über einen Zeitraum von 20 bzw. 64 Stunden aktiviert wurden, proliferierten *in vivo* extensiv und übernahmen Effektorfunktionen (Curtsinger et al., 2003a; van Stipdonk et al., 2003). *In vivo* scheint die Interaktionszeit eher die Stärke der primären Antwort zu bestimmen. So konnte Prlic et. al zeigen, dass sie keinen Einfluss auf die weitere Differenzierung dieser Zellen in Gedächtniszellen hatte (Prlic et al., 2006). Erkenntnisse von van Stipdonk et. al zeigten weiter, dass *in vitro* noch vor der ersten Zellteilung ein Programm induziert wurde, welches die Aktivierung der T- Zellen induzierte. Vergleichbare Schlussfolgerungen legten die beobachteten Ergebnisse auch für die Induktion der T- Zelltoleranz nahe. Während T- Zellen, welche ca. 40 Std. mit LSEC interagierten, spontan nach Restimulation noch IFN γ und IL-2 produzierten, wiesen die selben Zellen 80 Std. später keine Effektorfunktionen mehr auf (4.3.5). In wie weit es sich dabei um ein „Toleranzprogramm“ handelt, müssen künftige molekulare Untersuchungen zeigen.

Der beobachtete Verlauf einer Toleranzinduktion, vermittelt durch LSEC, über eine Phase der Stimulierung unterscheidet sich zwar von dem der für Anergie beschrieben wurde (Schwartz, 1997). Der Phänotyp der T- Zellen am Ende einer Kokultur mit LSEC gleicht jedoch dem anergischer Zellen. Deren wesentliches Merkmal ist die Reaktivierung durch Zugabe von exogenem IL-2 (Beverly et al., 1992). IL-2 scheint auch bei einer LSEC- vermittelten Toleranz ein regulativer Faktor zu sein (4.3.3). Die Analyse der IL-2 Produktion im Verlauf einer Kokultur von T- Zellen mit LSEC oder DC zeigte deutlich eine verminderte IL-2 Produktion durch T- Zellen, welche mit LSEC interagierten (4.3.3, Abb. 4.18). So konnte auch die Zugabe von IL-2 zu Beginn der Kultur mit LSEC eine Toleranzinduktion verhindern

und führte zu einer Aktivierung der Zellen (4.3.4, Abb. 4.23). Da LSEC, im Gegensatz zu DC (Granucci et al., 2002; Granucci et al., 2003a), kein IL-2 produzieren, könnte IL-2 zu Beginn der Kultur ein essentieller Faktor sein. Dafür spricht, dass eine spätere Zugabe von IL-2 zu einer Kokultur von LSEC und T- Zellen keinen deutlichen Einfluss mehr auf die Toleranzinduktion hatte (4.3.4, Abb. 4.24). Dies könnte jedoch auch mit der beobachteten Regulation von CD25 auf der Zelloberfläche zusammen hängen. CD25 wurde nach anfänglicher Expression wieder herunter reguliert und war an Tag 5 der Kultur nicht mehr detektierbar (4.3.2, Abb. 4.21). Die Regulation des hochaffinen IL-2- Rezeptors könnte die Sensitivität der T- Zellen gegenüber exogenem IL-2 verändert haben. Eine Signalisierung wäre zwar noch über den semi- affinen IL-2- Rezeptor möglich, dieser induziert jedoch eine andere intrazelluläre Signalkaskade als CD25 (Ellery and Nicholls, 2002a; Ellery and Nicholls, 2002b). Paradoxerweise konnte beobachtet werden, dass der tolerante Status der T- Zellen durch Zugabe von IL-2 an Tag 5 unter Anwesenheit von Signal 1 (MHC Klasse I- Peptid Komplex) wieder aufgehoben werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf die Existenz eines Mechanismus hinweisen, auf dessen Verlauf IL-2 keinen Einfluss mehr nehmen kann. Erst nach Abschluss und der Etablierung eines toleranten Phänotyps könnten Signale durch IL-2 wieder verarbeitet werden (Bruniquel and Schwartz, 2003). Dass tolerante T- Zellen wieder reaktivierbar sind, konnte auch nach Gabe von Signal 1 und 2 in Anwesenheit von Signal 3 (IL-12) beobachtet werden (L. Diehl, Publikation eingereicht). Eine mögliche Reaktivierung toleranter T- Zellen und die Tatsache, dass diese T- Zellen nicht eliminiert werden, schließt eine mögliche spätere Funktion dieser Zellen nicht aus. Da jedoch die bisherigen Beobachtungen zeigen, dass LSEC- induzierte Toleranz zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz (z.B. oraler) beiträgt, bedürften diese reaktivierten T- Zellen einer stringenter Kontrolle.

IL-2 wurde zunächst als der Schlüsselfaktor für das Wachstum der T- Zellen beschrieben. Jedoch zeigten spätere Analysen in IL-2- oder CD25- defizienten Tieren entgegen aller Erwartungen starke autoimmune Reaktionen, die durch übermäßige Proliferation der T- Zellen induziert wurden (Malek and Bayer, 2004). Diese Befunde stellten die Rolle von IL-2 zunächst wieder in Frage. In späteren Studien konnte demonstriert werden, dass die Ursache dafür in der fehlenden Population regulatorischer CD4+CD25+ T- Zellen lag (Malek et al., 2002). Erst neuere Erkenntnisse stellen IL-2 wieder in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit. D'Souza et. al demonstrierte, dass CD8+ T- Zellen zwar zunächst IL-2 unabhängig proliferierten, später jedoch IL-2 vorhanden sein musste (D'Souza and Lefrancois, 2003).

Auch konnte ein essentieller Einfluss von IL-2 auf die Generierung der späteren Gedächtniszellpopulation beschrieben werden (Williams et al., 2006). Zellen, die *in vivo* schnell und viel IL-2 produzieren, sind aktivierte CD4⁺ Helferzellen und Gedächtniszellen (D'Souza and Lefrancois, 2004; Jenkins et al., 2001; Sallusto et al., 2000). Das postulierte „drei-Zellen“ Modell zur Aktivierung von CD8⁺ T- Zellen beschreibt die Lizenzierung einer DC durch eine CD4⁺ T- Zelle nach CD40– CD40L Interaktion. Es schließt aber auch eine lokale Produktion von IL-2 seitens der CD4⁺ T- Zelle zur Aktivierung der CD8⁺ T- Zelle nicht aus. Einen Hinweis darauf konnte zu Beginn einer viralen CD4⁺ Antwort beobachtet werden, bei der die parakrine Wirkung von IL-2 auf Nachbarzellen ein wichtiger Mechanismus der T- Zellaktivierung war (Long and Adler, 2006). Auch den hier beschriebenen Daten zu Folge, scheint IL-2 ein regulativer Faktor bei der LSEC- vermittelten T- Zelltoleranz zu sein. Eine Kokultur mit aktivierten CD4⁺ T- Zellen zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Toleranzentstehung in naiven CD8⁺ T- Zellen (4.3.4, Abb. 4.25). Ob dieser Effekt allein auf parakrines IL-2 oder auf eine direkte Interaktion der aktivierten CD4⁺ T- Zellen mit den naiven CD8⁺ T- Zellen zurückzuführen war, muss in weiteren Experimenten analysiert werden. Ebenso bleibt die Frage nach der Relevanz dieser Beobachtung *in vivo* offen. Dies wäre allerdings ein möglicher Mechanismus der im Fall einer Inflammation von Bedeutung sein könnte, um eine lokale Toleranz zu verhindern und so einen größeren Pool an Effektorzellen zu generieren. Dies könnte nur unter inflammatorischen Bedingungen stattfinden, wenn aktivierte CD4⁺ T- Zellen oder auch Gedächtniszellen in der Leber Antigen- spezifisch mit LSEC im Kontext von naiven CD8⁺ T- Zellen interagieren. Auch in dieser Situation müsste eine Aktivierung oder auch Reaktivierung der T- Zellen genau kontrolliert werden.

Einen ähnlichen Einfluss auf die Tolerisierung naiver CD8⁺ T- Zellen konnte auch nach Zugabe von antigen- spezifischen Gedächtniszellen (CD4⁺ und CD8⁺) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch hier sind weiterführende Untersuchungen des IL-2- abhängigen Mechanismus, sowie der Relevanz dieser Beobachtungen *in vivo*, notwendig.

Die Fragestellung nach der Regulation dieser IL-2- abhängigen Toleranzinduktion durch LSEC auf molekularer Ebene sollte ebenfalls Gegenstand künftiger Untersuchungen sein. In Vorversuchen konnte eine gegenläufige Regulation der Moleküle LAT³ und Cbl-b in toleranten T- Zellen registriert werden. Dabei wurde LAT in toleranten T- Zellen reduziert und Cbl-b erhöht exprimiert (Daten nicht gezeigt). Ein Defekt in der Regulation von LAT,

³ engl.: LAT= linker of activation of T cells

einem wichtigen Adaptermolekül am Anfang des TZR Signalweges, konnte von Hundt et. al in toleranten T- Zellen demonstriert werden (Hundt et al., 2006). Cbl-b gehört zu der Familie der E3 Ub- Ligasen. Von mehreren unabhängigen Gruppen konnte eine Aktivität von Cbl-b in toleranten T- Zellen verzeichnet werden. Cbl-b trug dabei z.B. zum Abbau wichtiger, an der TZR Signaltransduktion beteiligter, Moleküle bei (Chiang et al., 2000; Jeon et al., 2004; Li et al., 2004; Zhang et al., 2002). Diese Befunde, sowie erste Beobachtungen der Regulation dieser Moleküle in toleranten T- Zellen, machen diese zu interessanten Kandidaten für nachfolgende Studien, die dazu beitragen sollen, die molekularen Mechanismen dieser Toleranzinduktion zu verstehen.

Eine durch LSEC- vermittelte Toleranz wurde nicht allein durch mangelnde Kostimulation induziert (4.3.5, Abb. 4.27) und legt die Beteiligung inhibitorischer Moleküle nahe. In der Tat zeigen Daten von L. Diehl (Publikation eingereicht), dass LSEC das inhibitorische Molekül PDL-1 exprimieren. PDL-1 interagiert mit PD1 und induziert in der T- Zelle negative Signale. Im Rahmen einer schwachen Kostimulation durch B7.1 und B7.2, wie sie für LSEC beschrieben wurde, kann die negative Stimulation durch PDL-1 und PD1 überwiegen. Der beobachtete Verlauf bis zur Induktion des toleranten Phänotyps der T- Zellen könnte somit auf einen Mechanismus hinweisen, welcher durch inhibitorische Moleküle induziert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein weiteres *in vitro* –Modell der Toleranzinduktion, durch Generierung tolerogener Knochenmark DC, etabliert. Dieses könnte zukünftig ebenfalls genutzt werden, um die zellulären und molekularen Mechanismen der Toleranzinduktion in naiven CD8⁺ T- Zellen zu studieren. Erste Untersuchungen zeigten die Induktion einer T- Zelltoleranz an Tag 5 der Kultur, die über eine Phase der Stimulierung (Proliferation) verlief. Auch in diesem System hatte die Zugabe von IL-2 einen Einfluss und es konnte eine Regulation des CD25 Moleküls auf der T- Zelloberfläche beobachtet werden. Tolerogene BM- DC stellen ein weiteres zellvermitteltes System der Toleranzinduktion *in vitro* dar, welches auch im Hinblick auf andere Fragestellung von Interesse wäre. Jedoch bedarf dieses System weiterer Charakterisierungen, unter anderem hinsichtlich seiner Relevanz *in vivo*.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde trugen zu dem Verständnis der Rolle der sinusoidalen Leberendothelzellen in komplexen Immunantworten bei. Dabei waren LSEC einerseits an der Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz gegenüber oraler Antigene beteiligt, andererseits führte jedoch ihre Eigenschaft konstitutiv Toleranz zu induzieren, zu der Modellierung einer systemischen Tumorantigen- spezifischen Immunantwort und trug damit zu einem Tumor *escape* bei. LSEC induzierten durch Kreuzpräsentation der entsprechenden Antigene Toleranz in naiven CD8+ T- Zellen. Der Verlauf dieser Toleranzinduktion wurde durch die Anwesenheit von IL-2 bestimmt und demonstrierte eine weitere Funktion dieses Zytokins in der Regulation einer antigen- spezifischen Immunantwort.

Basierend auf diesen Untersuchungen sollten in künftigen Analysen Fragen, wie z.B. nach dem Einfluss regulatorischer CD4+ T- Zellen im Rahmen der oralen und tumorantigen- spezifischen Toleranz und nach den molekularen Mechanismen, in den Vordergrund gestellt werden.

6 Zusammenfassung

Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber unterscheiden sich grundsätzlich von Endothelzellen anderer Gewebe. Sie exprimieren alle immunologisch wichtigen Moleküle, um mit passierenden T- Lymphozyten zu interagieren. Sie nehmen äußerst effektiv Antigene auf und sind in der Lage, sie auf MHC Klasse I Molekülen zu kreuzpräsentieren.

LSEC in der Leber, welche über die Blutversorgung eng mit dem Gastrointestinaltrakt assoziiert ist, nahmen orale Antigene auf und präsentierten sie auf MHC Klasse I Molekülen naiven CD8⁺ T- Zellen *in vitro*. Der Transfer von LSEC, welche mit oralen Antigenen beladen waren, zeigte eine antigen- spezifische Tolerisierung naiver CD8⁺ T- Zellen auch *in vivo*. Die orale Gabe eines Antigens während einer laufenden Immunantwort (Infektion) zeigte, dass auch hier eine Toleranz induziert werden konnte, die auf der Depletion antigen-spezifischer CD8⁺ T- Zellen beruhte. Dafür verantwortlich waren regulatorische CD4⁺ T- Zellen, welche zusammen mit antigenpräsentierenden DC oder LSEC systemische Toleranz induzierten.

Der zuvor für die Induktion einer oralen Toleranz beschriebene Mechanismus in der Leber ermöglichte Tumoren, dem Immunsystem zu entgehen. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer initialen Antitumorantwort LSEC apoptotisches Zellmaterial aufnahmen und naive CD8⁺ T- Zellen durch Kreuzpräsentation Tumor- assoziierter Antigene *in vitro* und *in vivo* tolerisierten. Die tolerogene Präsentation eines Tumorantigens durch LSEC könnte einen neuen *immune escape* Mechanismus metastasierender Tumore darstellen.

Die nähere Untersuchung der zellulären Mechanismen einer Toleranzinduktion durch LSEC wies auf einen charakteristischen Verlauf hin. CD8⁺ T- Zellen wurden zunächst zu Proliferation angeregt und exprimierten verschiedene Aktivierungsmarker (CD69, CD44) in vergleichbarer Weise wie T- Zellen, die von DC aktiviert wurden. IL-2 konnte als ein wichtiger regulativer Faktor zu Beginn der Kultur beschrieben werden. Die Zugabe von exogenem IL-2 oder die Anwesenheit IL-2 produzierender CD4⁺ T- Zellen konnten eine Toleranzinduktion durch LSEC verhindern. Diese basierte auf einer definierten Interaktionszeit und war nicht ausschließlich auf eine unzureichende Kostimulation zurückzuführen.

7 Literaturverzeichnis

- Appleman, L. J., and Boussiotis, V. A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192, 161-180.
- Arnold, B. (2002). Levels of peripheral T cell tolerance. *Transpl Immunol* 10, 109-114.
- Badovinac, V. P., Porter, B. B., and Harty, J. T. (2002). Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3, 619-626.
- Badovinac, V. P., Porter, B. B., and Harty, J. T. (2004). CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* 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.
- Bashirova, A. A., Geijtenbeek, T. B., van Duijnhoven, G. C., van Vliet, S. J., Eilering, J. B., Martin, M. P., Wu, L., Martin, T. D., Viebig, N., Knolle, P. A., *et al.* (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193, 671-678.
- Belz, G. T., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2002). Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 22, 439-448.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 186, 65-70.
- Bertolino, P., McCaughan, G. W., and Bowen, D. G. (2002). Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 80, 84-92.
- Bevan, M. J. (1975). The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigens. *J Exp Med* 142, 1349-1364.
- Bevan, M. J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* 117, 2233-2238.

- Beverly, B., Kang, S. M., Lenardo, M. J., and Schwartz, R. H. (1992). Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int Immunol* 4, 661-671.
- Blanas, E., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1996). Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science* 274, 1707-1709.
- Bogers, W. M., Stad, R. K., van Es, L. A., and Daha, M. R. (1991). Immunoglobulin A: interaction with complement, phagocytic cells and endothelial cells. *Complement Inflamm* 8, 347-358.
- Brown, I. E., Blank, C., Kline, J., Kacha, A. K., and Gajewski, T. F. (2006). Homeostatic proliferation as an isolated variable reverses CD8+ T cell anergy and promotes tumor rejection. *J Immunol* 177, 4521-4529.
- Bruniquel, D., and Schwartz, R. H. (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* 4, 235-240.
- Buller, R. M., Holmes, K. L., Hugin, A., Frederickson, T. N., and Morse, H. C., 3rd (1987). Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* 328, 77-79.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.
- Calne, R. Y., Sells, R. A., Pena, J. R., Ashby, B. S., Herbertson, B. M., Millard, P. R., and Davis, D. R. (1969). Toleragenic effects of porcine liver allografts. *Br J Surg* 56, 692-693.
- Carbone, F. R., and Bevan, M. J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 171, 377-387.
- Carter, L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. J., and Carreno, B. M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32, 634-643.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V. K., and Weiner, H. L. (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376, 177-180.

- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.
- Chiang, Y. J., Kole, H. K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R. J., Jang, I. K., Gutkind, J. S., Shevach, E., and Gu, H. (2000). Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* 403, 216-220.
- Chiodetti, L., Choi, S., Barber, D. L., and Schwartz, R. H. (2006). Adaptive tolerance and clonal anergy are distinct biochemical states. *J Immunol* 176, 2279-2291.
- Cho, H. J., and Bhardwaj, N. (2003). Against the self: dendritic cells versus cancer. *Apms* 111, 805-817.
- Crispe, I. N., Dao, T., Klugewitz, K., Mehal, W. Z., and Metz, D. P. (2000). The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 174, 47-62.
- 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. (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., 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, 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.
- D'Souza, W. N., and Lefrancois, L. (2004). Frontline: An in-depth evaluation of the production of IL-2 by antigen-specific CD8 T cells in vivo. *Eur J Immunol* 34, 2977-2985.
- D'Souza, W. N., Schluns, K. S., Masopust, D., and Lefrancois, L. (2002). Essential role for IL-2 in the regulation of antiviral extralymphoid CD8 T cell responses. *J Immunol* 168, 5566-5572.
- Dini, L., and Carla, E. C. (1998). Hepatic sinusoidal endothelium heterogeneity with respect to the recognition of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 240, 388-393.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.

- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.
- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Elgert, K. D., Alleva, D. G., and Mullins, D. W. (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 64, 275-290.
- Ellery, J. M., and Nicholls, P. J. (2002a). Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 27-40.
- Ellery, J. M., and Nicholls, P. J. (2002b). Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunol Cell Biol* 80, 351-357.
- Faria, A. M., and Weiner, H. L. (2005). Oral tolerance. *Immunol Rev* 206, 232-259.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5, 405-411.
- Ferrone, S., and Marincola, F. M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16, 487-494.
- Fey, G. H., Hattori, M., Northemann, W., Abraham, L. J., Baumann, M., Braciak, T. A., Fletcher, R. G., Gauldie, J., Lee, F., and Reymond, M. F. (1989). Regulation of rat liver acute phase genes by interleukin-6 and production of hepatocyte stimulating factors by rat hepatoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 557, 317-329; discussion 329-331.
- Friedman, A., and Weiner, H. L. (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6688-6692.
- Fuchs, E. J., and Matzinger, P. (1996). Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 8, 271-280.
- Fujihashi, K., Dohi, T., Rennert, P. D., Yamamoto, M., Koga, T., Kiyono, H., and McGhee, J. R. (2001). Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3310-3315.

- Gaidano, G., and Dalla-Favera, R. (1992). Biologic aspects of human immunodeficiency virus-related lymphoma. *Curr Opin Oncol* 4, 900-906.
- Garside, P., and Mowat, A. M. (2001). Oral tolerance. *Semin Immunol* 13, 177-185.
- Gatti, R. A., and Good, R. A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28, 89-98.
- Gays, F., Unnikrishnan, M., Shrestha, S., Fraser, K. P., Brown, A. R., Tristram, C. M., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., and Brooks, C. G. (2000). The mouse tumor cell lines EL4 and RMA display mosaic expression of NK-related and certain other surface molecules and appear to have a common origin. *J Immunol* 164, 5094-5102.
- Geissmann, F., Cameron, T. O., Sidobre, S., Manlongat, N., Kronenberg, M., Briskin, M. J., Dustin, M. L., and Littman, D. R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 3, e113.
- Granucci, F., Andrews, D. M., Degli-Esposti, M. A., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2002). IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells. *Trends Immunol* 23, 169-171.
- Granucci, F., Feau, S., Angeli, V., Trottein, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2003a). Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol* 170, 5075-5081.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2, 882-888.
- Granucci, F., Zanoni, I., Feau, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2003b). Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *Embo J* 22, 2546-2551.
- Greenwald, R. J., Boussiotis, V. A., Lorschach, R. B., Abbas, A. K., and Sharpe, A. H. (2001). CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14, 145-155.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Gutgemann, I., Fahrner, A. M., Altman, J. D., Davis, M. M., and Chien, Y. H. (1998). Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* 8, 667-673.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.

- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I. N. (1994). The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1, 741-749.
- Hultkrantz, S., Ostman, S., and Telemo, E. (2005). Induction of antigen-specific regulatory T cells in the liver-draining celiac lymph node following oral antigen administration. *Immunology* 116, 362-372.
- Hundt, M., Tabata, H., Jeon, M. S., Hayashi, K., Tanaka, Y., Krishna, R., De Giorgio, L., Liu, Y. C., Fukata, M., and Altman, A. (2006). Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect. *Immunity* 24, 513-522.
- Husby, S., Jensenius, J. C., and Svehag, S. E. (1985). Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Quantification, estimation of size distribution, and relation of uptake to levels of specific antibodies. *Scand J Immunol* 22, 83-92.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89-95.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190, 229-239.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (2001). Unique functions of CD11b⁺, CD8 alpha⁺, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166, 4884-4890.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R. M., and Inaba, K. (2002). The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195, 1289-1302.
- Jacob, A. I., Goldberg, P. K., Bloom, N., Degenshein, G. A., and Kozinn, P. J. (1977). Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 72, 1268-1270.
- Janeway, C. A., Jr. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-1171.
- Janeway, C. A., Jr., and Bottomly, K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, 275-285.
- Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., and Pape, K. A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 19, 23-45.
- Jeon, M. S., Atfield, A., Venuprasad, K., Krawczyk, C., Sarao, R., Elly, C., Yang, C., Arya, S., Bachmaier, K., Su, L., *et al.* (2004). Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity* 21, 167-177.

- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., and Enk, A. H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 22, 394-400.
- Kaech, S. M., and Ahmed, R. (2001). Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2, 415-422.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-7561.
- Kappler, J., White, J., Wegmann, D., Mustain, E., and Marrack, P. (1982). Antigen presentation by Ia⁺ B cell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3604-3607.
- Kawabe, Y., and Ochi, A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature* 349, 245-248.
- Ke, Y., and Kapp, J. A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* 184, 1179-1184.
- 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.
- Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K. L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246.
- Kraal, G., Samsom, J. N., and Mebius, R. E. (2006). The importance of regional lymph nodes for mucosal tolerance. *Immunol Rev* 213, 119-130.
- Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T., and Ogawa, M. (1997). A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 185, 777-784.
- 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.

- Lamb, J. R., Skidmore, B. J., Green, N., Chiller, J. M., and Feldmann, M. (1983). Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med* 157, 1434-1447.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000a). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92-97.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000b). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 12, 92-98.
- Lau, A. H., and Thomson, A. W. (2003). Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 52, 307-314.
- Lechner, O., Lauber, J., Franzke, A., Sarukhan, A., von Boehmer, H., and Buer, J. (2001). Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol* 11, 587-595.
- Lenardo, M., Chan, K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17, 221-253.
- Lenardo, M. J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861.
- Li, D., Gal, I., Vermes, C., Alegre, M. L., Chong, A. S., Chen, L., Shao, Q., Adarichev, V., Xu, X., Koreny, T., *et al.* (2004). Cutting edge: Cbl-b: one of the key molecules tuning CD28- and CTLA-4-mediated T cell costimulation. *J Immunol* 173, 7135-7139.
- 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.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hammerling, G. J. (1998). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol* 28, 2395-2406.
- List, A. F., Greco, F. A., and Vogler, L. B. (1987). Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus. *J Clin Oncol* 5, 1673-1689.
- Liu, Z., and Lefrancois, L. (2004). Intestinal epithelial antigen induces mucosal CD8 T cell tolerance, activation, and inflammatory response. *J Immunol* 173, 4324-4330.
- 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.
- Long, M., and Adler, A. J. (2006). Cutting edge: Paracrine, but not autocrine, IL-2 signaling is sustained during early antiviral CD4 T cell response. *J Immunol* 177, 4257-4261.
- Lu, X., and Lane, D. P. (1993). Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75, 765-778.
- Lumsden, A. B., Henderson, J. M., and Kutner, M. H. (1988). Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 8, 232-236.
- MacPhee, P. J., Schmidt, E. E., and Groom, A. C. (1992). Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 263, G17-23.
- MacPhee, P. J., Schmidt, E. E., and Groom, A. C. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 269, G692-698.
- Malek, T. R., and Bayer, A. L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 4, 665-674.
- Malek, T. R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167-178.
- Maloy, K. J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2, 816-822.
- Marzo, A. L., Klonowski, K. D., Le Bon, A., Borrow, P., Tough, D. F., and Lefrancois, L. (2005). Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat Immunol* 6, 793-799.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Mayer, L., and Shao, L. (2004). Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 4, 407-419.
- McClain, K. L. (1997). Immunodeficiency states and related malignancies. *Cancer Treat Res* 92, 39-61.
- Mehal, W. Z., Azzaroli, F., and Crispe, I. N. (2001). Immunology of the healthy liver: old questions and new insights. *Gastroenterology* 120, 250-260.

- Melief, C. J. (2003). Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol* 33, 2645-2654.
- Mitchell, D. A., Nair, S. K., and Gilboa, E. (1998). Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 1923-1933.
- Moog, F. (1981). The lining of the small intestine. *Sci Am* 245, 154-158, 160, 162 et passiom.
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Papworth, G. D., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., Jr., and Thomson, A. W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611-620.
- Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., and Gallo, R. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Nagatani, K., Dohi, M., To, Y., Tanaka, R., Okunishi, K., Nakagome, K., Sagawa, K., Tanno, Y., Komagata, Y., and Yamamoto, K. (2006). Splenic dendritic cells induced by oral antigen administration are important for the transfer of oral tolerance in an experimental model of asthma. *J Immunol* 176, 1481-1489.
- Nowak, A. K., Lake, R. A., Marzo, A. L., Scott, B., Heath, W. R., Collins, E. J., Frelinger, J. A., and Robinson, B. W. (2003). Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* 170, 4905-4913.
- Nurieva, R., Thomas, S., Nguyen, T., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Kaja, M. K., Yu, X. Z., and Dong, C. (2006). T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *Embo J* 25, 2623-2633.
- Ochsenbein, A. F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hermans, J., Hemmi, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2001). Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411, 1058-1064.
- Okazaki, T., and Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 27, 195-201.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21, 807-839.

- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2005). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560, 11-18.
- Pooley, J. L., Heath, W. R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.
- Powrie, F., Carlino, J., Leach, M. W., Mauze, S., and Coffman, R. L. (1996). A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* 183, 2669-2674.
- Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G., and Bevan, M. J. (2006). Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J Exp Med* 203, 2135-2143.
- 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.
- Rahemtulla, A., Fung-Leung, W. P., Schilham, M. W., Kundig, T. M., Sambhara, S. R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C. J., Zinkernagel, R. M., and et al. (1991). Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353, 180-184.
- Ralph, P., Moore, M. A., and Nilsson, K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* 143, 1528-1533.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361-367.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.
- Rieder, H., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Ramadori, G. (1992). Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. Filtration, endocytosis, synthetic capacities and intercellular communication. *J Hepatol* 15, 237-250.
- Rivoltini, L., Carrabba, M., Huber, V., Castelli, C., Novellino, L., Dalerba, P., Mortarini, R., Arancia, G., Anichini, A., Fais, S., and Parmiani, G. (2002). Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 188, 97-113.

- Robinson, B. W., Lake, R. A., Nelson, D. J., Scott, B. A., and Marzo, A. L. (1999). Cross-presentation of tumour antigens: evaluation of threshold, duration, distribution and regulation. *Immunol Cell Biol* 77, 552-558.
- Rock, K. L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-921.
- Sadlack, B., Kuhn, R., Schorle, H., Rajewsky, K., Muller, W., and Horak, I. (1994). Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4. *Eur J Immunol* 24, 281-284.
- Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101, 455-458.
- Sallusto, F., Langenkamp, A., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2000). Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 251, 167-171.
- 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.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-432.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schwartz, R. H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068.
- Schwartz, R. H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184, 1-8.
- Schwartz, R. H. (1997). T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9, 351-357.
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334.
- Schwartz, R. H. (2005). Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 6, 327-330.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Shaw, A. S., and Dustin, M. L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6, 361-369.

- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K. L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* *158*, 2723-2730.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* *163*, 5211-5218.
- Smith, K. M., Davidson, J. M., and Garside, P. (2002). T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology* *106*, 144-158.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrout, R. H., Sedger, L. M., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001a). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* *193*, 661-670.
- Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2000). NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol* *1*, 459-460.
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., and Trapani, J. A. (2001b). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* *2*, 293-299.
- Spahn, T. W., Fontana, A., Faria, A. M., Slavin, A. J., Eugster, H. P., Zhang, X., Koni, P. A., Ruddle, N. H., Flavell, R. A., Rennert, P. D., and Weiner, H. L. (2001). Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* *31*, 1278-1287.
- Spahn, T. W., Weiner, H. L., Rennert, P. D., Lugering, N., Fontana, A., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2002). Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* *32*, 1109-1113.
- Sprent, J., and Surh, C. D. (2001). Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* *13*, 248-254.
- Sprent, J., and Surh, C. D. (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol* *20*, 551-579.
- Srivastava, P. K. (2006). Therapeutic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* *18*, 201-205.
- Steffan, A. M., Gendrault, J. L., McCuskey, R. S., McCuskey, P. A., and Kirn, A. (1986). Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* *6*, 830-836.
- Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* *159*, 4772-4780.

- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M., and Germain, R. N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296, 1873-1876.
- Sun, J., Dirden-Kramer, B., Ito, K., Ernst, P. B., and Van Houten, N. (1999). Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J Immunol* 162, 5868-5875.
- Sun, J. C., Williams, M. A., and Bevan, M. J. (2004). CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5, 927-933.
- Takahashi, T., Nieda, M., Koezuka, Y., Nicol, A., Porcelli, S. A., Ishikawa, Y., Tadokoro, K., Hirai, H., and Juji, T. (2000). Analysis of human V alpha 24⁺ CD4⁺ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 164, 4458-4464.
- Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2003). Naturally arising CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease. *Curr Mol Med* 3, 693-706.
- Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., and Srivastava, P. K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278, 117-120.
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., and Hamuro, J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302, 305-310.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., and Berzofsky, J. A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-520.
- Tham, E. L., Shrikant, P., and Mescher, M. F. (2002). Activation-induced nonresponsiveness: a Th-dependent regulatory checkpoint in the CTL response. *J Immunol* 168, 1190-1197.
- Thomas, H. C., Singer, C. R., Tilney, N. L., Folch, H., and MacSween, R. N. (1976). The immune response in cirrhotic rats. Antigen distribution, humoral immunity, cell-mediated immunity and splenic suppressor cell activity. *Clin Exp Immunol* 26, 574-582.
- Thomas, L. (1959). Discussion of Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitive States (New York, ed. HS Lawrence, Hoeber-Harper).
- Thomson, A. W., O'Connell, P. J., Steptoe, R. J., and Lu, L. (2002). Immunobiology of liver dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80, 65-73.

- Timmers, M., Vekemans, K., Vermijlen, D., Asosingh, K., Kuppen, P., Bouwens, L., Wisse, E., and Braet, F. (2004). Interactions between rat colon carcinoma cells and Kupffer cells during the onset of hepatic metastasis. *Int J Cancer* *112*, 793-802.
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., and Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* *3*, 541-547.
- Trop, S., Samsonov, D., Gotsman, I., Alper, R., Diment, J., and Ilan, Y. (1999). Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology* *29*, 746-755.
- Valenzuela, J. O., Hammerbeck, C. D., and Mescher, M. F. (2005). Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol* *174*, 600-604.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* *375*, 148-151.
- van Berkel, M. E., and Oosterwegel, M. A. (2006). CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol Lett* *105*, 115-122.
- Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* *280*, 243-248.
- van Stipdonk, M. J., Hardenberg, G., Bijker, M. S., Lemmens, E. E., Droin, N. M., Green, D. R., and Schoenberger, S. P. (2003). Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. *Nat Immunol* *4*, 361-365.
- Venanzi, E. S., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Good riddance: Thymocyte clonal deletion prevents autoimmunity. *Curr Opin Immunol* *16*, 197-202.
- Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi, G., Mendoza, L., Fuentes, A. M., Anasagasti, M. J., Martin, J., Carrascal, T., Walsh, P., Reznikov, L. L., Kim, S. H., *et al.* (2000). IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 734-739.
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104-106.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J. P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* *18*, 605-617.

- Walker, P. R., Saas, P., and Dietrich, P. Y. (1998). Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr Opin Immunol* 10, 564-572.
- Warren, A., Le Couteur, D. G., Fraser, R., Bowen, D. G., McCaughan, G. W., and Bertolino, P. (2006). T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182-1190.
- Watanabe, T., Yoshida, M., Shirai, Y., Yamori, M., Yagita, H., Itoh, T., Chiba, T., Kita, T., and Wakatsuki, Y. (2002). Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4+ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J Immunol* 168, 2188-2199.
- Weiner, H. L. (2000). Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J Clin Invest* 106, 935-937.
- 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.
- Whitacre, C. C., Gienapp, I. E., Orosz, C. G., and Bitar, D. M. (1991). Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 147, 2155-2163.
- Whiteside, T. L., and Herberman, R. B. (1995). The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 7, 704-710.
- Wiegard, C., Frenzel, C., Herkel, J., Kallen, K. J., Schmitt, E., and Lohse, A. W. (2005). Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology* 42, 193-199.
- Williams, M. A., Tyznik, A. J., and Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441, 890-893.
- Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2005). Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437, 141-146.
- Wingender, G., Berg, M., Jungerkes, F., Diehl, L., Sullivan, B. A., Kronenberg, M., Limmer, A., and Knolle, P. A. (2006). Immediate antigen-specific effector functions by TCR-transgenic CD8+ NKT cells. *Eur J Immunol* 36, 570-582.
- Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* 31, 125-150.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203, 519-527.

- Wucherpfennig, K. W., Zhang, J., Witek, C., Matsui, M., Modabber, Y., Ota, K., and Hafler, D. A. (1994). Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *J Immunol* *152*, 5581-5592.
- Yang, R., Liu, Q., Grosfeld, J. L., and Pescovitz, M. D. (1994). Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg* *29*, 1145-1148.
- Zhang, J., Bardos, T., Li, D., Gal, I., Vermes, C., Xu, J., Mikecz, K., Finnegan, A., Lipkowitz, S., and Glant, T. T. (2002). Cutting edge: regulation of T cell activation threshold by CD28 costimulation through targeting Cbl-b for ubiquitination. *J Immunol* *169*, 2236-2240.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Alle von mir verwendeten Hilfsmittel und Quellen sind als solche gekennzeichnet.

Bonn, 17. Dezember 2006

(Martina Berg)