

**Charakterisierung der toleranzinduzierenden Interaktion  
zwischen naiven CD8 T-Zellen und den sinusoidalen  
Endothelzellen der Leber (LSEC)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Nanette von Oppen  
aus München

Bonn 2007

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle  
Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2008  
Erscheinungsjahr: 2008

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

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 4 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 im Zeitraum von Juni 2004 bis Dezember 2007 von Herrn Prof. Dr. P. Knolle betreut.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht gemäß § 6 der Promotionsordnung vom 7.1.2004.

Bonn, den 15.12.2007

*Meinen Eltern*

**Im Laufe dieser Arbeit wurden folgende Publikationen und Kongressbeiträge erstellt:**

### **Veröffentlichung**

Nanette von Oppen, Anna Schurich, Albert Geerts, Rene Tolba, Percy Knolle and Linda Diehl

„Liver-specific naive CD8+ T cell retention by cross-presenting LSEC promotes tolerance.“

*Zur Publikation eingereicht.*

### **Kongressbeiträge**

2005            Vortrag auf der 36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI) in Kiel.

Titel: „Antigen-specific accumulation of naive CD8 T cells in the liver.“

2006            Posterpräsentation auf dem „1<sup>st</sup> Meeting of European Societies of Immunology“, Paris, Frankreich.

2007            Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI) in Heidelberg.

Titel: „Cross-presenting LSEC establish antigen-specific adhesion of naive CD8 T cells leading to tolerance in vivo.“

Vortrag auf dem Satteliten Symposium des Arbeitskreises Adhäsionsmoleküle der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI).

Titel: „Cross-presenting LSEC establish antigen-specific adhesion of naive CD8 T cells leading to tolerance in vivo.“

**Inhaltsverzeichnis**

**ZUSAMMENFASSUNG** ..... I

**ABSTRACT**..... II

**1. EINLEITUNG** ..... 1

    1.1 ÜBERBLICK ÜBER DAS IMMUNSYSTEM..... 1

    1.2 T-ZELLEN UND DEREN AKTIVIERUNG ..... 2

    1.3 ADHÄSION UND MIGRATION VON T-ZELLEN..... 3

        1.3.1 Das Multistep Modell..... 4

        1.3.2 An der Migration von T-Zellen beteiligte Moleküle..... 5

    1.4 T-ZELL TOLERANZ..... 7

        1.4.1 Zentrale Toleranz ..... 8

        1.4.2 Periphere Toleranz..... 8

    1.5 DIE LOKALE IMMUNREGULATION DER LEBER ..... 10

        1.5.1 Die Mikroarchitektur der Leber ..... 11

        1.5.2 Die Zellpopulationen der Leber ..... 13

        1.5.3 Die sinusoidalen Endothelzellen ..... 15

        1.5.4 Die Induktion von peripherer Toleranz in der Leber ..... 17

**2. FRAGESTELLUNG** ..... 20

**3. MATERIAL UND METHODEN**..... 21

    3.1 MATERIAL..... 21

        3.1.1 Geräte ..... 21

        3.1.2 Verbrauchsmaterialien ..... 22

        3.1.3 Chemikalien und Reagentien ..... 23

        3.1.4 Allgemeine Lösungen ..... 24

        3.1.5 Antikörper..... 27

        3.1.6 Weitere Fluorochrome ..... 28

        3.1.7 Magnetische Kügelchen (MACS Beads) ..... 28

        3.1.8 Enzyme ..... 28

        3.1.10 Zelllinien..... 29

        3.1.11 Mauslinien..... 29

    3.2 METHODEN..... 30

        3.2.1 Zellisolation..... 30

        3.2.2 Isolation von Zellen aus der Leber ..... 30

        3.2.3 Isolation von primären Zellen aus der Milz ..... 32

        3.2.4 Isolation von Zellen aus dem Lymphknoten ..... 33

3.2.5 Isolation von Zellen aus der Lunge .....	33
3.2.6 Generierung von aktivierten Lymphozyten .....	34
3.2.7 Generierung von CD11c <sup>+</sup> Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark .....	34
3.2.8 Isolation von Zellpopulationen über magnetische Zellseparation (MACS) .....	35
3.2.9 Isolation von Lymphozyten über Nylonwolle .....	36
3.2.10 Produktion von GM-CSF .....	36
3.2.11 Zellzahlbestimmung .....	36
3.2.12 Durchflusszytometrie .....	37
3.2.13 Markierung von Oberflächenantigenen .....	37
3.2.14 Intrazelluläre Färbung von Antigenen.....	38
3.2.15 Zellmarkierung mit CFSE.....	39
3.2.16 In vitro Ko-Kultur im Transwell .....	39
3.2.18 In vitro Video Mikroskopie .....	40
3.2.19 In vitro Transmigrationsanalyse (Parallelfusskammer) .....	41
3.2.20 Generierung von Knochenmarkschimären.....	41
3.2.21 Adoptiver Transfer.....	42
3.2.22 Intravital Mikroskopie .....	42
3.2.23 Konfokale Mikroskopie.....	43
3.2.24 Restimulation von T Zellen .....	43
3.2.25 Statistische Analysen.....	43
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
4.1 LSEC NEHMEN LÖSLICHE ANTIGENE AUS DEM BLUT AUF.....	44
4.2 DIE KREUZPRÄSENTATION VON LÖSLICHEM ANTIGEN DURCH LSEC FÜHRT ZU EINER ANTIGENSPEZIFISCHEN AKTIVIERUNG NAIVER CD8 T-ZELLEN.....	45
4.3 ANTIGENSPEZIFISCHE ADHÄSION NAIVER CD8 T-ZELLEN AUF KREUZPRÄSENTIERENDEN LSEC .....	46
4.4 DIE KREUZPRÄSENTATION VON LÖSLICHEM ANTIGEN IN VIVO FÜHRT ZU EINER ANTIGENSPEZIFISCHEN RETENTION NAIVER CD8 T-ZELLEN IN DER LEBER.....	49
4.5 DIE PRÄSENTATION VON ENDOGENEM ANTIGEN RESULTIERT EBENFALLS IN EINER HEPATISCHEN AKKUMULATION NAIVER CD8 T-ZELLEN.....	54
4.6 ICAM-1 TRÄGT ZUR ANTIGENSPEZIFISCHEN ADHÄSION NAIVER CD8 T-ZELLEN IN DER LEBER BEI .....	55
4.7 NAIVE CD8 T-ZELLEN ADHÄRIEREN UNMITTELBAR IM PERIPORTALEN BERICH DER LEBER, KEINE ADHÄSION NAIVER CD8 T-ZELLEN IM DARM .....	59
4.8 NAIVE UND AKTIVIERTE CD8 T-ZELLEN UNTERSCHIEDEN SICH IN IHRER LOKALISATION UND IHREM ADHÄSIONSVERHALTEN IN DER LEBER .....	60
4.9 LSEC SIND DIE ENTSCHEIDENDE ZELLPOPULATION FÜR DIE ANTIGENSPEZIFISCHE RETENTION NAIVER CD8 T-ZELLEN IN DER LEBER.....	64
4.10 DIE FUNKTIONELLEN KONSEQUENZEN DER ANTIGENSPEZIFISCHE RETENTION NAIVER CD8 T-ZELLEN IN DER LEBER .....	67

<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>72</b>
5.1 NAIVE CD8 T-ZELLEN ADHÄRIEREN ANTIGENSPEZIFISCH AUF KREUZPRÄSENTIERENDEN LSEC .....	72
5.2 DIE PRÄSENTATION VON LÖSLICHEM ANTIGEN FÜHRT ZU EINER ANTIGENSPEZIFISCHEN RETENTION NAIVER CD8 T-ZELLEN IN DER LEBER.....	73
5.3 DIE INTRAHEPATISCHE RETENTION NAIVER CD8 T-ZELLEN IST BEDINGT DURCH DIE KREUZPRÄSENTATION VON ANTIGEN DURCH DIE SINUSOIDALEN ENDOTHELZELLEN (LSEC) .....	77
5.4 NUR ICAM-1 IST VON DEN UNTERSUCHTEN MOLEKÜLEN AN DER ANTIGENSPEZIFISCHEN ADHÄSION IN DER LEBER BETEILIGT .....	78
5.5 BEI DER UBIQUITÄREN EXPRESSION VON ENDOGENEM ANTIGEN FÜHRT DAS ZUSAMMENSPIEL UNTERSCHIEDLICHER HEPATISCHER ZELLTYPEN ZU EINER STARKEN RETENTION NAIVER CD8 T-ZELLEN ..	81
5.6 LSEC STELLEN MIT DER FÄHIGKEIT ZUR KREUZPRÄSENTATION UND DER RETENTION NAIVER CD8 T- ZELLEN EINE EINZIGARTIGE ENDOTHELZELLPOPULATION DAR .....	82
5.7 NAIVE UND AKTIVIERTE CD8 T-ZELLEN UNTERSCHIEDEN SICH IN IHREM ADHÄSIONS- UND TRANSMIGRATIONSVERHALTEN AUF LSEC .....	83
5.8 DIE INTRAHEPATISCHE RETENTION RESULTIERT IN EINER EXPANSION UND TOLERANZINDUKTION DER NAIVEN CD8 T-ZELLEN.....	85
5.9 DIE INTRAHEPATISCHE RETENTION NAIVER CD8 T-ZELLEN ALS MECHANISMUS DER PERIPHEREN TOLERANZINDUKTION.....	86
<b>6. REFERENZEN</b> .....	<b>89</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>103</b>

## Zusammenfassung

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion der peripheren Toleranz. Dabei trägt die Fähigkeit der sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) lösliches Antigen kreuzpräsentieren und in naiven CD8 T-Zellen eine antigenspezifische Toleranz zu induzieren zur immunregulatorischen Funktion der Leber bei. Der Mechanismus, welcher der Rekrutierung naiver CD8 T-Zellen in die Leber unterliegt, war jedoch bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die organ-residenten kreuzpräsentierenden LSEC naive CD8 T-Zellen antigenspezifisch in die Leber rekrutieren. Die antigenspezifische Akkumulation war schon innerhalb von vier Stunden nach der Antigengabe zu beobachten und trat ausschließlich in der Leber auf, aber nicht in der Milz, den Lymphknoten, oder der Lunge. Die Expression von ICAM-1 trug zur antigenspezifischen Adhäsion bei, aber war nicht essentiell. Die antigenspezifische Adhäsion wurde von einer Stimulation der T-Zellen begleitet, was durch die vorwiegend in der Leber auftretende Hochregulation von CD69 erkennbar war. Durch den Einsatz von Knochenmarkschimären konnte gezeigt werden, dass organ-residente und nicht myeloide antigenpräsentierende Zellen für die antigenspezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen verantwortlich war. Ferner führte die Adhäsion naiver CD8 T-Zellen an kreuzpräsentierende LSEC in den Knochenmarkschimären zu einer Toleranz dieser Zellen. Die hier gezeigten Daten der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen weisen eine neue Funktion der LSEC auf, die für keine anderen Organe gezeigt werden konnte. Die Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber verhindert deren Aktivierung durch professionelle antigenpräsentierende Zellen in den sekundären lymphatischen Organen und stellt möglicherweise einen weiteren Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion dar.

**Abstract**

Presentation of antigen in the liver leads to induction of T cell tolerance rather than immunity. The ability of liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) to cross-present exogenous antigens on MHC class I molecules to naïve CD8 T cells and to induce CD8 T cell tolerance contributes to the hepatic immune regulatory function. However, the mechanisms underlying recruitment of naïve CD8 T cells to the liver remained unclear. This work provides evidence that organ-resident cross-presenting liver sinusoidal endothelial cells recruit naïve CD8 T cells antigen-specifically to the liver. Antigen-specific hepatic recruitment of naïve CD8 T cells occurred rapidly within 4 hours after antigen-challenge and was exclusively observed in the liver but not in spleen, lymph nodes or lung. Expression of ICAM-1 supported antigen-specific CD8 T cell adhesion but was not essential. Antigen-specific adhesion was accompanied by rapid stimulation of CD8 T cells, as shown by up-regulation of CD69, which was also predominantly observed in the liver. Experiments employing bone marrow chimeric mice demonstrated that organ-resident but not myeloid APC were responsible for antigen-specific naïve CD8 T cell adhesion. Importantly, adhesion of naïve CD8 T cells to cross-presenting LSEC in bone marrow chimeric mice resulted in tolerance of these cells. The data shown here attribute a novel function to LSEC, i.e. antigen-specific retention of naïve CD8 T cells, which is not observed for other organs. Delivery of a flow-stop signal by tolerogenic LSEC to passenger naïve CD8 T cells in the hepatic circulation provides a mechanistic insight into the early steps of induction of CD8 T cell tolerance in the liver.

## 1. Einleitung

### 1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem der Säugetiere ist ein komplexes System, bestehend aus der angeborenen (innaten) und der erworbenen (adaptiven) Immunität. Es dient der effektiven Abwehr von Pathogenen wie Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten. Die angeborene und die erworbene Immunität sind keine strikt voneinander abzugrenzenden Systeme, vielmehr findet eine enge Kommunikation zwischen beiden statt. Für den Fall, dass das schnell reagierende angeborene Immunsystem den eingedrungenen Erreger nicht wirksam bekämpfen kann, tritt das adaptive Immunsystem in Kraft, was durch die klonale Expansion der antigenspezifischen Lymphozyten verzögert erfolgt.

Die angeborene Immunität bildet eine erste Verteidigungslinie gegen viele allgemein vorkommende Mikroorganismen, von ihr werden Pathogene durch Phagozytose oder durch die Freisetzung toxischer Substanzen beseitigt. Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität ist das Komplementsystem (Tomlinson, 1993). Dessen Komponenten binden an extrazelluläre Krankheitserreger und erleichtern somit das Erkennen und die Aufnahme des Erregers durch Makrophagen, die Komplementrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Durch die Produktion von reaktiven Substanzen, wie  $H_2O_2$  und OH-Radikale, können Makrophagen Pathogene zerstören (Takao et al., 1996). Neben den Makrophagen zählen Granulozyten zu den phagozytierenden Zellen der angeborenen Immunität. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen bestimmte hoch konservierte und weit verbreitete Muster von viralen oder mikrobiellen Pathogenen, die so genannten PAMPs<sup>1</sup> (Medzhitov, 2001) über die Expression von so genannten TLR<sup>2</sup>. Über TLR können im Allgemeinen fremde von körpereigenen Antigenen unterschieden werden und die Stimulation eines TLR führt zur Aktivierung der Zelle. Diese aktivierten antigenpräsentierenden Zellen (APC<sup>3</sup>) des innaten Immunsystems vermögen dann die antigenspezifischen Zellen des adaptiven Immunsystems anzuschalten (Janeway, 2001).

Das adaptive Immunsystem verfügt über antigenspezifische Rezeptoren und lässt sich in ein humorales und ein zelluläres Abwehrsystem unterscheiden. Das zelluläre

---

<sup>1</sup> *engl.*: pathogen-associated molecular patterns.

<sup>2</sup> *engl.*: toll-like receptors.

<sup>3</sup> *engl.*: antigen presenting cell.

Abwehrsystem wird von T-Lymphozyten gebildet, die mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (TCR<sup>4</sup>) Antigene erkennen, die an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC<sup>5</sup>) antigenpräsentierender Zellen gebunden sind (Zinkernagel and Doherty, 1974). B-Lymphozyten sind hingegen die Effektorzellen der humoralen Immunantwort und sezernieren ihren Rezeptor in Form von Antikörpern (Immunglobulinen, Ig). Im Gegensatz zum B-Zellrezeptor erkennt der T-Zellrezeptor Antigene nur in Form von prozessierten Proteinfragmenten (Peptiden) in Assoziation mit MHC Molekülen. Die extrem hohe Spezifität des T-Zellrezeptors und der Antikörper beruht auf einem rekombinatorischen Vorgang der für Teile vom Antigenrezeptor kodierenden Gensegmente (somatische Rekombination). Wenn eine wiederholte Infektion mit einem Erreger stattfindet, kommt das so genannte immunologische Gedächtnis<sup>6</sup> zum Tragen. Zellen des adaptiven Immunsystems persistieren als Gedächtniszellen und können im Gegensatz zu ungeprägten Zellen eine schnellere und effektivere Immunantwort auslösen. Das immunologische Gedächtnis ist spezifisch und langlebig.

## 1.2 T-Zellen und deren Aktivierung

Es gibt zwei wichtige Untergruppen von T-Zellen mit jeweils unterschiedlichen Effektorfunktionen. Sie lassen sich durch die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 und durch die Klassen von MHC Molekülen die sie erkennen unterscheiden. CD4 bindet dabei an das MHC Klasse II- und CD8 an das MHC Klasse I Molekül. Bei der Antigenerkennung assoziieren je nach T-Zell Typ CD4- oder CD8-Moleküle auf der T-Zell Oberfläche mit dem T-Zellrezeptor und binden an unveränderliche Stellen auf dem MHC Teil des MHC:Peptid Komplexes.

MHC Klasse I wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Präsentation zytosolischer Antigene und der viralen Abwehr. Bestimmte antigenpräsentierende Zellen, in erster Linie die CD8 $\alpha^+$  Dendritischen Zellen (DC<sup>7</sup>), aber auch Makrophagen und B-Zellen, verfügen über die Möglichkeit auch exogene Antigene auf dem MHC Klasse I Molekül zu präsentieren (Carbone and Bevan, 1990; Kurts et al., 1996). Dieser Mechanismus wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Moore et al., 1988; Rock et al., 1990; Shen et al., 1997). Das exogen aufgenommene Antigen wird hierbei

---

<sup>4</sup> *engl.*: T cell receptor.

<sup>5</sup> *engl.*: major histocompatibility complex.

<sup>6</sup> *engl.*: memory.

<sup>7</sup> *engl.*: dendritic cell.

aus dem Phagosom in das Zytosol geschleust und durch das Proteasom, in gleicher Form wie zelleigene Proteine, prozessiert und in den MHC Klasse I Präsentationsweg eingeschleust (Kovacs-Bankowski and Rock, 1995). Dagegen werden extrazellulär aufgenommene Antigene im endosomatischen Abbauweg proteolytisch zu Peptiden zerkleinert und auf MHC Klasse II präsentiert.

Zur Aktivierung naiver T-Zellen reicht die Erkennung des MHC:Peptid Komplexes nicht aus, sondern es bedarf neben diesem Signal 1 noch einem 2. Signal, welches in Form von Kostimulation oder Zytokinproduktion seitens der antigenpräsentierenden Zelle geliefert werden muss (Schwartz, 1992). Die kostimulatorischen Moleküle B7.1, B7.2 und ICOS<sup>8</sup> interagieren dabei mit den entsprechenden Rezeptoren CD28 und ICOS-L auf der T-Zelle und induzieren eine Signalkaskade, die zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle führt (Shaw and Dustin, 1997; Viola and Lanzavecchia, 1996). Die Aktivierung zytotoxischer CD8 T-Zellen benötigt neben der Antigenerkennung (Signal 1) und der Kostimulation (Signal 2) noch ein drittes Signal, was durch die Zytokine IL-12<sup>9</sup> oder Typ I Interferon erfolgt (Curtsinger et al., 2003b; Curtsinger et al., 2005; Valenzuela et al., 2005). IL-12 wird von Dendritischen Zellen nach der Stimulation durch ein TLR Signal oder nach der Ligation von CD40 produziert.

### 1.3 Adhäsion und Migration von T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich aus ihren Vorläuferzellen im Thymus. Nach den Schritten der positiven und negativen Selektion verlassen sie diesen und patrouillieren als naive T-Zellen zwischen Blut, den lymphatischen Organen und den lymphatischen Gefäßen durch den Körper, um im Falle einer Infektion aktiviert zu werden und als Effektorzellen an der Bekämpfung des Pathogens im Gewebe teilzuhaben. T-Zellen überwinden bei ihrer Zirkulation ständig Barrieren von Endothelien, dabei wird der Schritt aus den Blutgefäßen heraus als Extravasation bezeichnet. Die einzelnen Schritte der Extravasation sind im so genannten Mehr-Schritt Modell<sup>10</sup> charakterisiert.

---

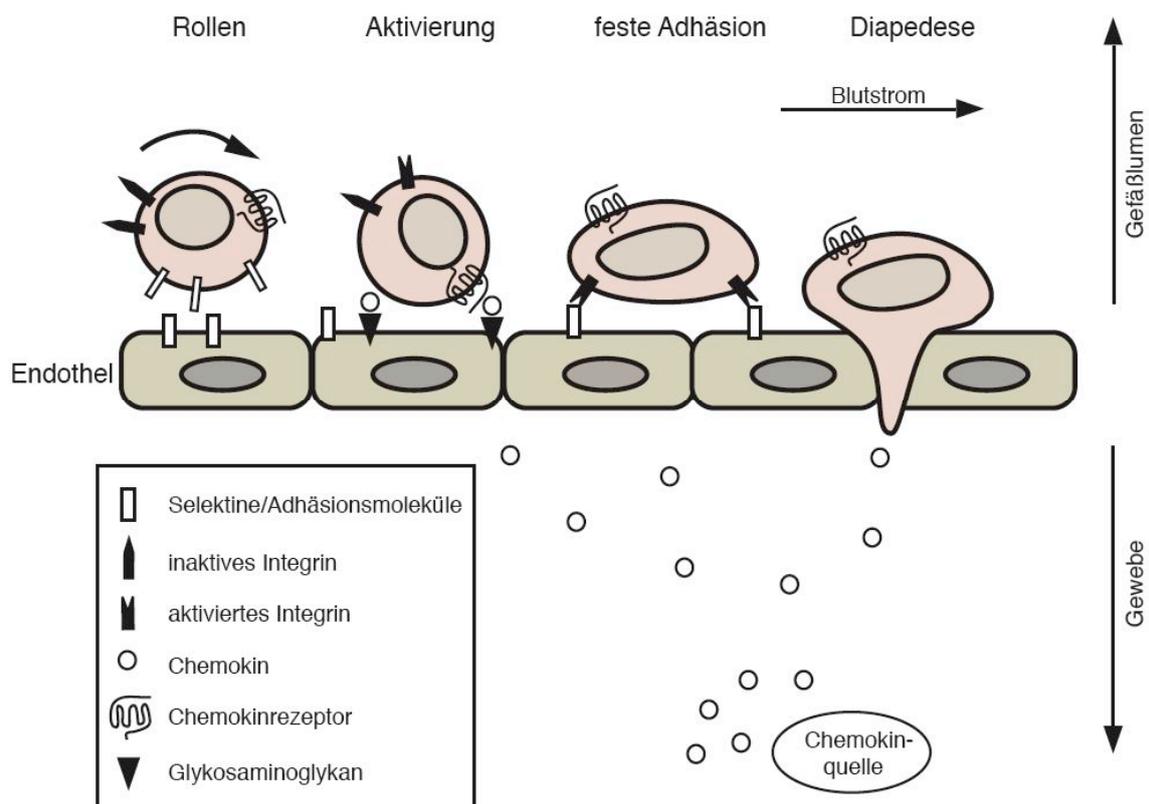
<sup>8</sup> *engl.*: inducible costimulator.

<sup>9</sup> *engl.*: interleukin 12.

<sup>10</sup> *engl.*: multistep model.

### 1.3.1 Das Multistep Modell

Bei der Wanderung von Leukozyten aus den Blutgefäßen heraus nehmen die Zellen zunächst im so genannten Schritt des Rollens einen losen Kontakt mit dem Endothel auf. Dieser Schritt wird vor allem durch Selektine vermittelt (von Andrian and Mackay, 2000). Bei dieser transienten Interaktion mit dem Endothel werden auf dem Endothel präsentierte Chemokine erkannt (Cyster, 1999; Kim and Broxmeyer, 1999), was im so genannten ‚*inside-out signalling*‘ zu einer Aktivierung der Integrine führt. Daraufhin verändern die Integrine ihre Affinität bzw. Avidität und vermitteln eine feste Adhäsion am Endothel (Johnston and Butcher, 2002; von Andrian and Mackay, 2000). Im letzten Schritt des Multistep Modells, der so genannten Diapedese, transmigrieren die Leukozyten durch das Endothel aufgrund chemotaktischer Signale zu bestimmten Kompartimenten im Gewebe (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Das Multistep Modell der Extravasation.** Die Migration von Leukozyten in das Gewebe erfolgt in mehreren Schritten mit jeweils charakteristischen Rezeptor-Ligand Interaktionen.

### 1.3.2 An der Migration von T-Zellen beteiligte Moleküle

#### 1.3.2.1 Selektine

Das Rollen von Leukozyten am Endothel wird über Selektine vermittelt. Diese sind eine Familie von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen membrangebundenen Lektinen (Bevilacqua and Nelson, 1993), welche an sialylierte Karbohydratgruppen binden (Patel et al., 2002). Die drei bekannten Selektine sind L-Selektin, P-Selektin und E-Selektin.

L-Selektin wird von den meisten Leukozyten exprimiert und bindet an so genannte vaskuläre Adressine. Dazu gehören die Moleküle GlyCAM-1<sup>11</sup> und CD34 auf postkapillären Venolen mit hohem Endothel (HEV<sup>12</sup>) im Lymphknoten, das auf Endothelien in der Schleimhaut exprimierte MAdCAM-1<sup>13</sup> und sulfatisierte Sialyl-Lewis<sup>x</sup> Moleküle auf Endothelien im entzündeten Gewebe (Baumhater et al., 1993; Lasky et al., 1992).

P-Selektin wird von Endothelzellen schnell als Reaktion auf Mediatoren einer Inflammation exprimiert (McEver et al., 1989) und bindet an PSGL-1<sup>14</sup> auf der Oberfläche von Neutrophilen, Monozyten, Natürlichen Killer Zellen (NK) und Subpopulationen von Lymphozyten (Moore et al., 1992).

E-Selektin wird ebenfalls auf Endothelzellen als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine exprimiert und bindet an CLA<sup>15</sup> auf Leukozyten (Berg et al., 1991) und ESL-1<sup>16</sup> auf myeloiden Zellen (Stegmaier et al., 1997; Stegmaier et al., 1995).

Im Gegensatz zur Extravasation von Leukozyten in das Gewebe anderer Organe wie z.B. die Haut oder den Muskel, sind Selektine für die Rekrutierung von Leukozyten in der Mikrovaskulatur der Leber nicht essentiell (Wong et al., 1997). Sie spielen daher bei der Adhäsion von CD8 T-Zellen in den Sinusoiden der Leber keine Rolle.

---

<sup>11</sup> *engl.*: glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1.

<sup>12</sup> *engl.*: high endothelial venules.

<sup>13</sup> *engl.*: mucosal addressin cell adhesion molecule-1.

<sup>14</sup> *engl.*: P-Selectin glycoprotein ligand.

<sup>15</sup> *engl.*: cutaneous leukocyte antigen.

<sup>16</sup> *engl.*: E-Selectin monospecific ligand.

### 1.3.2.2 Chemokine

Während Selektine konstitutiv aktiv sind, müssen Integrine aktiviert werden um Adhäsion vermitteln zu können. Rollende T-Zellen aktivieren ihre Integrine wenn sie Signale von Chemokinen auf der Endothelzelloberfläche erhalten (Cyster, 1999; Kim and Broxmeyer, 1999). Diese werden nach ihrer Sekretion an Glykosaminoglykane auf der Zelloberfläche und an die Extrazelluläre Matrix gebunden. Auf T-Zellen binden Chemokine an G-Protein gekoppelten Rezeptoren, diese können mit der Differenzierung der Zelle hoch- oder runterreguliert werden um die Migration der Zelle zu koordinieren. Es wurden bisher mehr als 50 Chemokine und 18 Chemokinrezeptoren beschrieben (Zlotnik and Yoshie, 2000). Die Chemokine werden je nach der Position der Cysteinreste in vier Untergruppen unterteilt (CXC, CC, CX3C, XC). Darüber hinaus werden Chemokine auch in inflammatorische und lymphoide Chemokine unterteilt, wobei die inflammatorischen Chemokine als Reaktion auf entzündliche Stimuli von Endothelzellen, Epithelzellen und Leukozyten gebildet wird. Lymphoide Chemokine werden dagegen in lymphoiden Geweben produziert und dienen der konstitutiven Aktivität und Kompartimentalisierung von Leukozyten in diesen Organen.

### 1.3.2.3 Integrine

T-Zellen exprimieren 12 der 24 bekannten Integrin Heterodimere, wobei das Expressionsmuster von der Untergruppe und dem Reifegrad der T-Zelle abhängt (Hogg et al., 2003; von Andrian and Mackay, 2000). Die vier  $\beta 2$  Integrine ( $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$ ,  $\alpha D\beta 2$ ) findet man auf T-Zellen, dabei kommt  $\alpha L\beta 2$ , welches auch als LFA-1<sup>17</sup> bezeichnet wird, am häufigsten vor. Darüber hinaus exprimieren T-Zellen die beiden  $\beta 7$  Integrine ( $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha E\beta 7$ ) und die Extrazelluläre Matrix bindenden  $\beta 1$  Integrine ( $\alpha 1-\alpha 6\beta 1$ ). Unter normalen Bedingungen sind die Integrine inaktiv, aber der Kontakt zu Chemokinen und die Bindung weiterer Oberflächenrezeptoren resultiert in einer schnellen Aktivierung und Ligandenbindung der Integrine (Hogg et al., 2003). Die Aktivierung der Integrine erfolgt durch eine Konformationsänderung und einer damit verbundenen erhöhten Affinität, oder einem Clustering der Moleküle und einer dadurch hervorgerufenen Aviditätserhöhung (Stewart and Hogg, 1996; van Kooyk and Figdor, 2000). Für das Integrin LFA-1 konnte gezeigt werden, dass auf die Chemokin-induzierte Konformationsänderung von LFA-1

---

<sup>17</sup> engl.: leukocyte function-associated integrin.

eine weitere Aktivierung durch die Bindung des Liganden ICAM-1<sup>18</sup> folgt, was zum sofortigen Arrest des Lymphozyten führt (Shamri et al., 2005). Die Bindung der Integrine an das Endothel ermöglicht naiven T-Zellen den Eintritt in Lymphknoten und aktivierten T-Zellen den Eintritt in entzündete Gewebe.

#### 1.3.2.4 Cytohesine

Der Familie der Cytohesine sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für kleine ADP-Ribosylierungsfaktoren. Im humanen und murinen System wurden bisher vier verschiedene Cytohesine, Cytohesin-1 bis -4, identifiziert. Ihnen konnte eine Rolle beim so genannten ‚*inside-out signalling*‘ des Integrins LFA-1 nachgewiesen werden, da Cytohesin-1 und -2 mit der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta 2$  Kette (CD18) von LFA-1 interagieren können (Kolanus et al., 1996) und die Interaktion von Cytohesin-1 mit CD18 die Affinität von LFA-1 gegenüber seinem Liganden ICAM-1 reguliert. Die Interaktion mit CD18 wird von der sec-7 Domäne von Cytohesin-1 vermittelt (Geiger et al., 2000). So führt die Überexpression von Cytohesin-1 oder dessen isolierter sec-7 Domäne zu einer verstärkten Adhäsion der humanen T-Zelllinie Jurkat an ICAM-1 (Kolanus et al., 1996).

#### 1.4 T-Zell Toleranz

Bei der Reifung der T-Zellen im Thymus durchlaufen die T-Vorläuferzellen eine somatische Rekombination und Hypermutation des T-Zellrezeptors, wodurch ein Repertoire von ca.  $10^{18}$  möglichen Spezifitäten entsteht. Dadurch wird der Schutz gegen eine Vielzahl von fremden Pathogenen sichergestellt. Doch bringt die Diversität der T-Zellrezeptorspezifitäten die Gefahr mit sich, potentiell reaktiv gegenüber körpereigenen Strukturen zu sein. Um diese Gefahr zu umgehen, werden T-Zellen sowohl bei ihrer Reifung im Thymus im Laufe der zentralen Toleranz, als auch in der Peripherie, bei der so genannten peripheren Toleranzinduktion, auf eine mögliche Selbstreaktivität überprüft und gegebenenfalls deletiert bzw. durch unterschiedliche Mechanismen aktiv inhibiert.

---

<sup>18</sup> *engl.*: intercellular adhesion molecule-1.

### 1.4.1 Zentrale Toleranz

Der erste Mechanismus zur Kontrolle selbstreaktiver T-Zellen findet während der Reifung im Thymus statt und beruht auf der Repräsentation einer großen Anzahl körpereigener Antigene durch die medullären Thymusepithelzellen (MEC<sup>19</sup>) selbst (Derbinski et al., 2001), oder durch den Transfer der Antigene an knochenmarksabhängige antigenpräsentierende Zellen (Gallegos and Bevan, 2004). Die Transkription dieser Proteine wird durch das Protein AIRE<sup>20</sup> gesteuert (Anderson et al., 2002). Bindet während der T-Zell Reifung ein Thymozyt mit entsprechendem T-Zellrezeptor und hoher Affinität an eines dieser von MECs präsentierten gewebespezifischen Antigene, so kommt es zur negativen Selektion, d.h. zur Deletion des potentiell autoreaktiven Thymozyten (Mathis and Benoist, 2004; Starr et al., 2003). Dieser Mechanismus wird als zentrale Toleranz bezeichnet.

### 1.4.2 Periphere Toleranz

Neben der zentralen Toleranzinduktion sind zusätzliche Toleranzmechanismen notwendig um autoreaktive T-Zellen zu kontrollieren, da zum Einen eine Immunantwort gegenüber der unüberschaubaren Anzahl an harmlosen Umwelt- und Nahrungsantigene unterbunden werden muss (Huang et al., 2000; Mowat, 2003), zum Anderen ist der Mechanismus der zentralen Toleranz auf die Aktivität von AIRE limitiert und es können nicht alle körpereigenen Antigene in dem Maße im Thymus exprimiert werden um alle autoreaktiven Thymozyten zu eliminieren. So werden z.B. selbstreaktive T-Zellen mit einer niedrigen Affinität nicht eliminiert und wandern in die Peripherie, was die potentielle Gefahr einer Autoimmunreaktion bedeutet (Liu et al., 1995).

Die periphere Toleranz wird durch die Mechanismen der Ignoranz, der Anergie, der Deletion und der Modulation der T-Zellantwort durch immature oder tolerisierende Dendritische Zellen oder regulatorische CD4 T-Zellen (Tregs) gewährleistet.

Die Ignoranz von Antigenen tritt ein, wenn das Antigen in Bereiche abgesondert ist, die für die Immunzellen nicht zugänglich sind (Alferink et al., 1998; Zinkernagel, 1996) oder wenn das Antigen nicht in ausreichender Konzentration für den Schwellenwert zur Aktivierung vorhanden ist (Kurts et al., 1998). Der Zustand der Ignoranz kann jedoch

---

<sup>19</sup> *engl.*: medullary epithelial cells.

<sup>20</sup> *engl.*: autoimmune regulator.

gebrochen werden, sobald das Antigen in einem stimulatorischen Umfeld präsentiert wird (Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991).

Außerdem kann die Begegnung von T-Zellen mit ihrem Antigen zu einer funktionellen Inaktivierung führen, der so genannten Anergie. Diese kann durch das Fehlen der Kostimulation bei der T-Zellrezeptor Aktivierung entstehen (Jenkins and Schwartz, 1987). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass so genannte ko-inhibitorische Moleküle, wie CTLA-4<sup>21</sup> und PD-1<sup>22</sup> für die Induktion peripherer Toleranz durch Dendritische Zellen von Bedeutung sind (Probst et al., 2005).

Ein effektiver Weg um Schädigungen durch autoreaktive T-Zellen zu verhindern, ist deren Deletion durch AICD<sup>23</sup>. Dies ist ein Weg der Selbsttötung von T-Zellen, der die Ligation von Fas Ligand und Fas involviert und in zuvor aktivierten T-Zellen ausgelöst wird, wenn diese wiederholt auf ihr Antigen treffen (Dhein et al., 1995; Klas et al., 1993; Radvanyi et al., 1993; Singer and Abbas, 1994; Suda and Nagata, 1997). Da körpereigene Antigene permanent im System präsent sind, trifft der autoreaktive T-Zellrezeptor repetitiv auf Selbst-Proteine, was ein Auslöser des AICD sein kann. Das Zytokin IL-2 ist als T-Zell Wachstumsfaktor bekannt. Darüber hinaus scheint IL-2 aber die T-Zellen für die Apoptose zu programmieren und spielt beim AICD, und somit in der peripheren Toleranzinduktion, eine entscheidende Rolle (Lenardo, 1991). Das Fehlen von IL-2 oder der IL-2 Signalleitung führt zur Autoimmunität (Sadlack et al., 1995; Willerford et al., 1995).

Die Präsentation von Antigen durch immature oder tolerisierende Dendritische Zellen stellt einen weiteren Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion dar. Selbst-Proteine werden kontinuierlich durch immature oder tolerogene Dendritische Zellen an selbst-reaktive T-Zellen präsentiert (Kurts et al., 1996). Die niedrige Expression von kostimulatorischen Liganden, und womöglich die Expression von zusätzlichen noch nicht identifizierten Liganden auf diesen Dendritischen Zellen führt zur T-Zell Toleranz und nicht zur Aktivierung. Diese kann in Form von Anergie der T-Zelle, oder der Induktion regulatorischer CD4 T-Zellen auftreten (Jonuleit et al., 2001; Walker and Abbas, 2002). Zudem führt die Kreuzpräsentation von Selbst-Antigenen zu einer Toleranz durch die

---

<sup>21</sup> *engl.*: cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4.

<sup>22</sup> *engl.*: programmed death-1.

<sup>23</sup> *engl.*: activation induced cell death.

Deletion der autoreaktiven Zellen und wird als ‚*cross-tolerance*‘ bezeichnet (Heath et al., 1998; Kurts et al., 1997).

Die Kontrolle autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie kann auch durch die aktive Suppression CD4 regulatorischer T-Zellen (Treg) erfolgen (Groux et al., 1997; Klein et al., 2007). Regulatorische T-Zellen entstehen auf zweierlei Weise. Die so genannten natürlichen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg werden kontinuierlich im Thymus generiert und exprimieren den charakteristischen Transkriptionsfaktor FoxP3. Sie werden antigenspezifisch aktiviert, das heißt sie müssen in der Peripherie Selbst-Antigene erkennen um suppressiv aktiv zu werden und können dann unabhängig von der Antigenpezifität der Zielzelle die Proliferation anderer T-Zellen durch einen direkten Zell-Zell Kontakt supprimieren (Kuniyasu et al., 2000; Schwartz, 2005; Thornton and Shevach, 1998). Dagegen entstammen die induzierten regulatorische T-Zellen (Th3, Tr1) der Begegnung mit natürlichen Treg oder tolerogenen Dendritischen Zellen in der Peripherie und sind FoxP3-unabhängig (Jonuleit et al., 2001; Maloy and Powrie, 2001; Sakaguchi, 2000). Werden diese Zellen aktiviert, so inhibieren sie CD4 sowie CD8 T-Zellen antigen-unspezifisch durch die Produktion von den suppressiven Zytokinen IL-10 und TGF-β<sup>24</sup> (Takahashi and Sakaguchi, 2003).

### **1.5 Die lokale Immunregulation der Leber**

Die Leber ist das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels und besitzt eine Vielzahl an Aufgaben. So ist sie beispielsweise an der Entgiftung und Metabolisierung toxischer Substanzen sowie am Cholesterin- und Lipidstoffwechsel beteiligt, fungiert als Glukosespeicher, produziert Gerinnungsfaktoren und nimmt immunologische Aufgaben wahr.

Die Leber ist ein stark durchblutetes Organ, welches vom gesamten Blutvolumen mehr als 300 Mal pro Tag passiert wird. Die Leber wird von Blut durchströmt, in dem sich bakterielle Produkte und harmlose Nahrungsantigene aus dem Darm befinden. T-Zellen in der Leber sind kontinuierlich diesen Antigenen ausgesetzt und verschiedene Mechanismen bestimmen, ob die Begegnung mit dem Antigen in der Toleranz, oder der Immunität der Zellen endet.

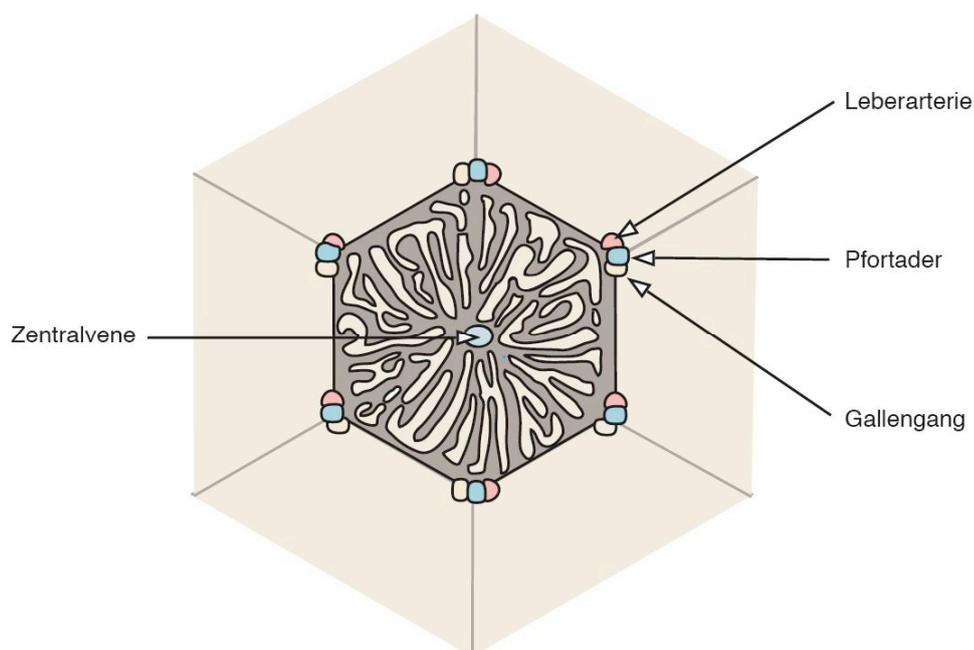
---

<sup>24</sup> engl.: transforming growth factor-β.

### 1.5.1 Die Mikroarchitektur der Leber

Die Blutversorgung der Leber erfolgt zum großen Teil (80%) mit venösem Blut des Gastrointestinaltrakts über die Pfortader<sup>25</sup>, in dem Nahrungsantigene, Toxine und bakterielle Produkte angereichert sind. Zusätzlich erhält die Leber Blut (ca. 20%) über die hepatische Arterie<sup>26</sup>. Diese beiden Blutzuflüsse vermischen sich in den mikrovaskulären Gefäßen der Leberlappen, den so genannten Sinusoiden. Der sinusoidale Blutstrom gelangt über die Zentralvenolen in die untere Hohlvene<sup>27</sup> und erreicht so wieder die systemische Zirkulation.

Die Leber besteht aus mehreren Leberlappen, die sich wiederum aus Leberläppchen, den so genannten Lobuli, zusammensetzen. An den Eckpunkten benachbarter Lobuli liegen die Portalfelder, in denen jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang verlaufen (Abb. 1.2). Die Sinusoide liegen zwischen den Hepatozyten und transportieren das Blut aus der Pfortader und der Arterie in Richtung Zentrum der Lobuli, wo es von einer Zentralvene aufgenommen wird.



**Abbildung 1.2: Leber Lobulus.** Die Leber setzt sich aus einer Vielzahl an Lobuli zusammen. An den Eckpunkten benachbarter Lobuli liegen die Portalfelder, in denen jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang verlaufen. Das Blut tritt aus der Pfortader und der Arterie ein, durchströmt die Sinusoide und sammelt sich in der Mitte des Lobulus in der Zentralvene.

<sup>25</sup> *lat.*: vena porta.

<sup>26</sup> *lat.*: arteria hepatica.

<sup>27</sup> *lat.*: vena cava inferior.

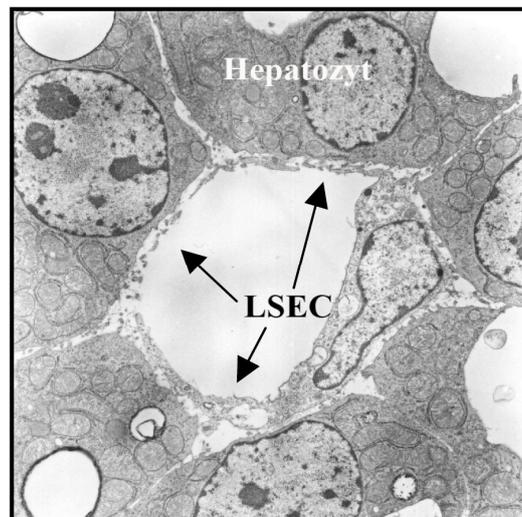
Die Sinusoide sind mit einer Endothelzellschicht ausgekleidet, den so genannten LSEC<sup>28</sup> (Wisse et al., 1985) (Abb. 1.3). Sie bilden eine Barriere zwischen dem Blut und den Hepatozyten und vermitteln den Stoffaustausch unter anderem durch aktiv regulierte Poren, den so genannten Fenestrae. Diese haben zwar einen Durchmesser von ca. 100 nm (Wisse, 1970; Wisse et al., 1985), es wurde jedoch gezeigt, dass selbst kleine Moleküle von nur 15 nm Größe diese Fenestrae nicht frei passieren (Kolb-Bachofen et al., 1984; Schlepper-Schafer et al., 1986), sondern nach ihrer intravenösen (*i.v.*) Injektion nur auf der luminalen Seite der LSEC zu finden waren (Kempka and Kolb-Bachofen, 1988). LSEC bilden also eine Barriere zwischen Makromolekülen im sinusoidalen Lumen und den Hepatozyten (Fraser et al., 1995). Größere Makromoleküle werden von LSEC aufgenommen und gelangen durch Transzytose auf die andere Seite des Endothels (Irie et al., 1988; Tavassoli et al., 1986).

Durch die große Oberfläche der Sinusoide in der Leber hat das Blut hier im Vergleich zu anderen peripheren Blutgefäßen (300  $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ ) eine geringe Fließgeschwindigkeit von lediglich 25-250  $\mu\text{m}/\text{Sek.}$  (MacPhee et al., 1992, 1995). Die Sinusoide haben einen Durchmesser von nur 5-7  $\mu\text{m}$  (MacPhee et al., 1995; Wisse et al., 1985), so dass Leukozyten mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$  nicht frei passieren können, sondern sich regelrecht durch die Sinusoide drängen müssen und den Blutstrom zeitweilig zum Erliegen bringen. Sowohl der langsame und temporär unterbrochene Blutfluss, als auch die Enge und die Beschaffenheit der Sinusoide lassen einen starken Austausch von Molekülen zwischen dem Blut und den Zellen in der Leber zu und ermöglichen einen direkten Kontakt zwischen den sinusoidalen Zellpopulationen und den Leukozyten im Blut (Knolle and Gerken, 2000; MacPhee et al., 1995; Smedsrod et al., 1990).

Im Gegensatz zu den Endothelien anderer Organe fehlt in der Leber die typische Basalmembran. Das Sinusendothel ist von den Hepatozyten durch einen schmalen Spalt, den perisinusoidalen Raum oder Dissé Raum, getrennt (Smedsrod et al., 1994). Hier findet der Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten statt. Außerdem wird hier die Lymphe gesammelt, welche durch die Lymphgefäße in die drainierenden Lymphknoten abfließt.

---

<sup>28</sup> engl.: liver sinusoidal endothelial cells.



**Abbildung 1.3: Das Leber Sinusoid.** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Breiner et al., 2001).

Die Trennung der Hepatozyten von dem Blutstrom durch LSEC schützt diese vor Pathogenen und verhindert die Transmigration von Lymphozyten in Abwesenheit einer Infektion (Limmer et al., 1998). Neuere elektronenmikroskopische Studien von Warren et al. zeigen jedoch, dass intrahepatische Lymphozyten und CD8 T-Zellen durch die Fenestrae der LSEC hindurch Ausläufer bilden, und diese mit Hepatozyten interagieren können (Warren et al., 2006). Die funktionellen Folgen dieser Interaktion sind jedoch ungeklärt.

### 1.5.2 Die Zellpopulationen der Leber

Zu den Zellpopulationen der Leber gehören die Hepatozyten, die Ito Zellen, die Kupffer Zellen, die hepatische Lymphozyten, die Dendritischen Zellen und LSEC. Deren Anordnung ist in Abb. 1.4 schematisch dargestellt.

Die Hepatozyten (Parenchymzellen) stellen die größte Zellpopulation der Leber dar (60%). Sie sind entscheidend für den Metabolismus von Nährstoffen, den Lipid- und Cholesterolfstoffwechsel und die Neutralisierung von Toxinen. Im Falle einer Entzündung reagieren Hepatozyten mit der Produktion von Akute-Phase-Proteinen, welche sowohl lokal als auch systemisch wirken (Bernuau et al., 1989; Fey and Gaudie, 1990).

Zwischen den die Sinusoide auskleidenden sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) und den Hepatozyten, im so genannten Dissé Raum, befinden sich die Ito Zellen (Blouin et al., 1977; Geerts, 2001). Sie sind Fettspeicherzellen, deren Lipidtropfen viel Vitamin A enthalten (Geerts, 2001). Durch die Bildung von Kollagen sind sie für die Vernarbung der Leber bei einer Leberzirrhose verantwortlich (Kanta et al., 2002). Sie besitzen die Fähigkeit, Antigen in Form von Peptid zu präsentieren und CD4-, CD8- und NKT Zellen zu aktivieren (Winau et al., 2007).

Die Leber besitzt eine große Population an residenten Makrophagen, die so genannten Kupffer Zellen. Deren Ursprung ist umstritten, einige Studien belegen eine Entwicklung dieser Zellen aus intrahepatischen Vorläuferzellen (Shepard and Zon, 2000; Yamamoto et al., 1996), andere Ergebnisse sprechen für eine Entstehung aus Monozyten aus dem Blut (Diesselhoff-den Dulk et al., 1979; van Furth, 1980). Sie sind in den hepatischen Sinusoiden zu finden, können aber auch in den Dissé Raum einwandern und Kontakt zu Hepatozyten ausbilden. Kupffer Zellen sind endozytotisch aktiv und phagozytieren apoptotische Zellen (Shi et al., 1996) und Mikroorganismen (Filice, 1988; Wardle, 1987). Nach ihrer Aktivierung sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ <sup>29</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>30</sup>. Kupffer Zellen exprimieren MHC Klasse I und II Moleküle und niedrige Level der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Lohse et al., 1996). Sie wandern hauptsächlich in den periportalen Arealen der Leber mit langsamer Flussrate durch die Sinusoide, wobei es durch den geringen Durchmesser der Sinusoide wiederholt zum Erliegen des Blutstroms durch die passierenden Kupffer Zellen kommt (MacPhee et al., 1992).

Es werden zwei Untergruppen von Kupffer Zellen unterschieden, die so genannte ‚sessile‘ Population ist radio-resistent, wird aber nicht durch einen inflammatorischen Stimulus rekrutiert. Die radio-sensitive Population nimmt an der Immunreaktion teil. Beide Gruppen sind phagozytotisch aktiv (Klein et al., 2007).

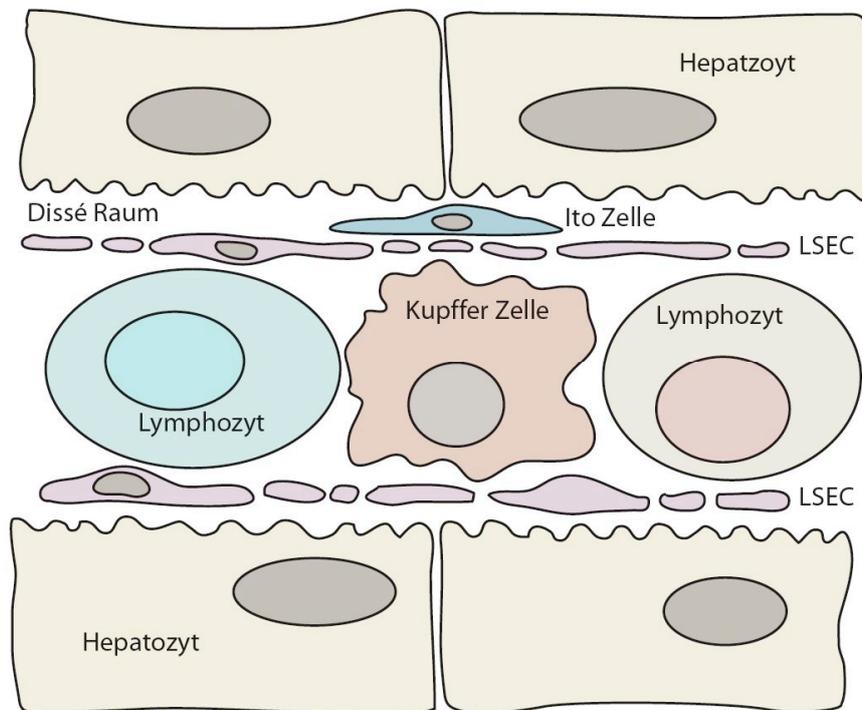
Neben den Kupffer Zellen befinden sich in den Sinusoiden sowohl CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> myeloide, als auch CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> lymphoide Dendritische Zellen (O'Connell et al., 2000). Sie nehmen Antigene aus dem Blut auf, migrieren dann zum drainierenden Lymphknoten und präsentieren diese (Kudo et al., 1997; Matsuno and Ezaki, 2000). Die Präsentation von Antigen *in vivo* kann in einer Aktivierung der T-Zellen oder in der Toleranz dieser Zellen

---

<sup>29</sup> engl.: tumor necrosis factor- $\alpha$ .

<sup>30</sup> engl.: interferon- $\gamma$ .

enden, wobei die Produktion von inflammatorischem IL-12 bzw. entzündungshemmenden IL-10 hierbei ausschlaggebend ist (Banchereau et al., 2000; Crispe, 2003; Steinbrink et al., 1997).



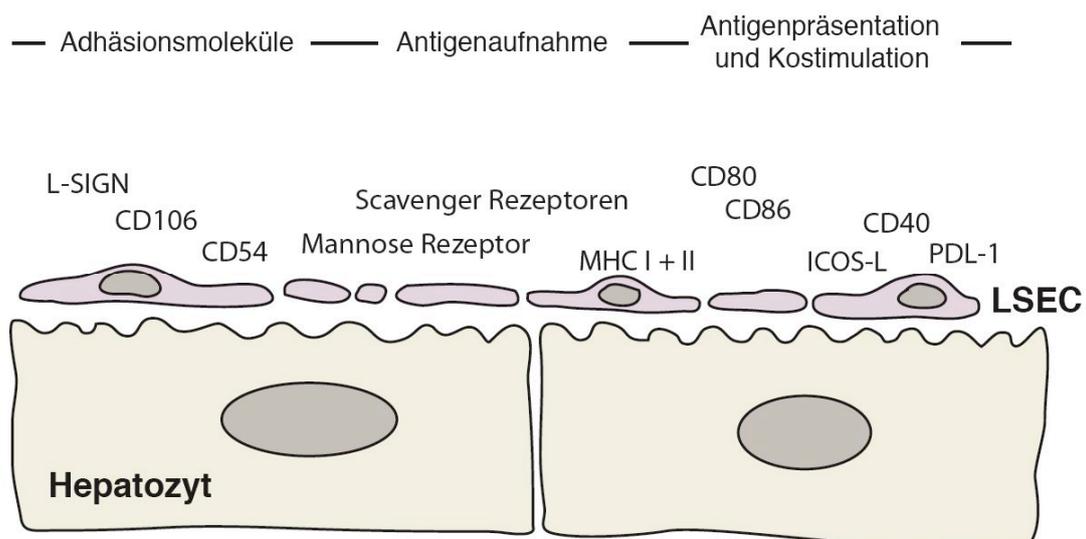
**Abbildung 1.4: Die Zellen des Sinusoids.** Schematische Darstellung.

Die Zusammensetzung der intrahepatischen Lymphozyten unterscheidet sich von der in lymphatischen Geweben, als dass die Anzahl an Natürlichen Killer Zellen (NK), NKT Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen innerhalb der totalen Lymphozyten erhöht ist und ein vermehrtes Vorkommen an CD8 T-Zellen im Verhältnis zu CD4 T-Zellen besteht. Darüber hinaus weisen die  $\alpha\beta$  T-Zellen vornehmlich einen Effektor- oder Gedächtnis- Phänotyp auf (Crispe and Mehal, 1996; Klugewitz et al., 2004; Pruvot et al., 1995).

### 1.5.3 Die sinusoidalen Endothelzellen

Die sinusoidalen Endothelzellen in der Leber (LSEC) haben, verglichen mit den makrovaskulären Endothelzellen oder den mikrovaskulären Endothelzellen anderer Organe, einen einzigartigen Phänotyp. LSEC exprimieren konstitutiv Moleküle, die den

Kontakt zu Leukozyten ermöglichen, wie z.B ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1<sup>31</sup> (CD106) und L-SIGN. Darüber hinaus werden konstitutiv MHC Klasse I und II und kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86, CD40, ICOS-L und PDL-1 exprimiert (Knolle and Limmer, 2003). Durch die Expression von zahlreichen Rezeptoren wie dem Mannoserezeptor, so genannten ‚Scavenger‘ Rezeptoren, Fc-Rezeptoren und L-SIGN tragen LSEC zur Reinigung des sinusoidalen Blutes von Makromolekülen bei (Bashirova et al., 2001; Bogers et al., 1991; Knolle and Limmer, 2003). Sie verfügen außerdem über die Fähigkeit zur Phagozytose von Partikeln bis zu 200 nm Größe (Steffan et al., 1986). Die aufgenommenen Antigene scheinen durch Transzytose an die unterliegenden Hepatozyten weitergegeben zu werden, aber werden auch für die Präsentation auf MHC Klasse I und II durch LSEC selbst genutzt (Knolle and Limmer, 2003). So sind LSEC in der Lage CD4 T-Zellen zu stimulieren (Lohse et al., 1996).



**Abbildung 1.5: Der Phänotyp von LSEC.** LSEC exprimieren Rezeptoren zur Adhäsion, Antigenaufnahme, Antigenpräsentation und Kostimulation.

Ferner sind LSEC in der Lage, lösliches Antigen aus der Zirkulation aufzunehmen und über den Mechanismus der Kreuzpräsentation auf MHC Klasse I an CD8 T-Zellen zu präsentieren (Limmer et al., 2000). Die LSEC-stimulierten CD8 T-Zellen verlieren jedoch ihre Fähigkeit zur Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 und zeigen keine zytotoxische Aktivität.

<sup>31</sup> engl: vascular cell adhesion molecule-1.

Im Gegensatz zu Dendritischen Zellen, die zunächst eine Maturierung unterlaufen und in lymphatische Organe migrieren um Antigen zu präsentieren (Cella et al., 1997), stellen LSEC eine organ-residente Zellpopulation dar, die keiner Maturierung bedarf um effizient Antigene an CD4 und CD8 T-Zellen zu präsentieren.

#### **1.5.4 Die Induktion von peripherer Toleranz in der Leber**

Die Leber ist ein entscheidendes Organ bei der Induktion der peripheren Toleranz. So wurde bei Transplantationsversuchen beobachtet, dass allogene Leber Transplantate in verschiedenen Spezies erhalten blieben, ohne eine begleitende Therapie mit immunsuppressiven Substanzen (Calne et al., 1969; Cantor and Dumont, 1967). Im Gegensatz dazu wurden Haut-, Nieren- und andere Transplantate schnell abgestoßen. Darüber hinaus resultierten Experimente, in denen das Antigen direkt in die Pfortader injiziert wurde, in einer antigenspezifischen Toleranz (Cantor and Dumont, 1967).

Verschiedene Mechanismen werden für diesen tolerisierenden Effekt der Leber in Erwägung gezogen. So scheinen z.B. die von intrahepatischen Zellen produzierten immunregulatorischen Zytokine und Chemokine eine Rolle zu spielen. Neben der Produktion von IL-10 durch Dendritischen Zellen in der Leber (Goddard et al., 2004) wird IL-10 von anderen Zellpopulationen, wie z.B durch LSEC- oder durch hepatische Dendritische Zellen aktivierte CD4 T-Zellen produziert (Knolle et al., 1999; O'Connell et al., 2000). Aber auch die in großer Anzahl in der Leber vorkommenden NKT Zellen tragen durch die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-4, IL-10 und IL-13 zu einem tolerogenen Milieu in der Leber bei (Godfrey and Kronenberg, 2004). Ferner werden Kupffer Zellen, durch die Produktion und suppressive Wirkung von Nitritoxid auf T-Zellen (Roland et al., 1994) und die reduzierte Toleranzinduktion von allogenen Leukozyten *in vivo* nach der Depletion von Kupffer Zellen (Roland et al., 1993), mit der hepatischen Toleranzinduktion in Zusammenhang gebracht.

Eine wichtige Funktion der Leber ist die Eliminierung aktivierter T-Zellen (Huang et al., 1994). So wurde gezeigt, dass aktivierte T-Zellen selektiv in der Leber zurückgehalten werden und dort in Apoptose gehen (Mehal et al., 1999). Dies wird als ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranz diskutiert. Für die Induktion der Apoptose halten zwei Therorien her. Die so genannte ‚*Graveyard*‘ Hypothese besagt, dass die apoptotischen T-Zellen in der Leber akkumulieren um dort in Apoptose zu gehen, währen

die ‚*Killing Field*‘ Hypothese eine Apoptose als Folge der intrahepatischen Adhäsion mutmaßt (Crispe et al., 2000).

LSEC tragen maßgeblich zur Induktion der peripheren Toleranz in der Leber bei, als dass die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC zu einer Toleranzinduktion von CD8 T-Zellen führt. Diese zeichnet sich durch eine fehlende Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  und eine ausbleibende Zytotoxizität der Zellen nach einer Restimulation aus (Limmer et al., 2000). Die Induktion der Toleranz durch LSEC beinhaltet die Ligation von B7H1 und führt nicht zu einer Deletion dieser Zellen, sondern löst in den tolerierten T-Zellen ein Überlebenssignal in Form von Bcl-2 aus (Diehl et al., 2007). Die Präsentation von Antigen auf MHC Klasse II resultiert in einer Aktivierung von CD4 T-Zellen, was nach einer Restimulation zu der Produktion von IL-4 und IL-10, und somit zu einem regulatorischen Phänotyp dieser Zellen führt (Knolle et al., 1999).

Die intrahepatische Aktivierung von T-Zellen wird von dem Milieu in der Leber beeinflusst. Dieses ist charakterisiert durch die konstitutive Anwesenheit pro-inflammatorischer Substanzen (bakterielle Bestandteile, LPS<sup>32</sup>), die mit dem Blut aus dem Gastrointestinaltrakt in die Leber gelangen. Es wird angenommen, dass das Potential eine Immunreaktion von antigenpräsentierenden Zellen in der Leber auszulösen, durch eine Hyporeaktion auf LPS unterdrückt wird (De Creus et al., 2005; Uhrig et al., 2005). So wird durch die konstitutive Präsenz von geringen Mengen LPS ein refraktärer Status der LSEC hervorgerufen, welcher zu einer ausbleibenden Transaktivierung von NF $\kappa$ B und dem Unvermögen CD54 und CD106 hoch zu regulieren führt (Knolle and Gerken, 2000). Dieser Status kann durch eine hohe Dosis von LPS gebrochen werden und so zu einer erhöhten Adhäsion von Leukozyten führen. Außerdem wird die übliche durch LPS induzierte vermehrte Expression von CD54 und CD106 auf Kupffer Zellen und LSEC *in vitro*, *in vivo* durch eine konstitutiven Produktion suppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  von Kupffer Zellen verhindert (Knolle and Gerken, 2000; Knolle et al., 1998).

Die tolerisierende Funktion der Leber steht vermutlich im Zusammenhang mit verschiedenen persistierenden Infektionen, wie z.B. den epidemiologisch problematischen Erregern der Malaria, Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus (Good,

---

<sup>32</sup> Lipopolysaccharid.

1995; Rehermann et al., 1996; Spengler et al., 1996). Diese sind nicht-zytotoxische Pathogene, die Hepatozyten infizieren. Durch die Barriere der toleranzinduzierenden LSEC sind sie von einem direkten Kontakt mit zytotoxischen T-Zellen, und damit der Eliminierung der infizierten Zellen geschützt.

## 2. Fragestellung

Die Leber spielt bei der Induktion der peripheren Toleranz eine entscheidende Rolle. Dabei werden verschiedene Mechanismen für den tolerisierenden Effekt in Erwägung gezogen. Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) sind eine sessile antigenpräsentierende Zellpopulation, die durch die Ausstattung mit MHC Klasse I und II und der Expression von kostimulatorischen Molekülen in der Lage sind Antigene an naive CD4- und CD8 T-Zellen zu präsentieren. Die Interaktion zwischen naiven CD8 T-Zellen und LSEC führt jedoch nicht zu einer Aktivierung, sondern resultiert in einer antigenspezifischen Toleranz der CD8 T-Zellen (Limmer 2000). Der Mechanismus, wie dabei der Kontakt zwischen LSEC und CD8 T-Zelle initiiert wird, war bisher jedoch nicht bekannt, und sollte in dieser Arbeit charakterisiert werden.

Dafür ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Faktoren spielen für die Ausbildung des initialen Kontaktes zwischen LSEC und CD8 T-Zellen eine Rolle?
- Welche Adhäsionsmoleküle sind bei der Interaktion zwischen LSEC und CD8 T-Zellen *in vivo* und *in vitro* beteiligt?
- Welche antigenpräsentierende Zellpopulation der Leber ist für die Retention naiver CD8 T-Zellen verantwortlich?
- Was sind die funktionellen Folgen der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber?
- Wie unterscheiden sich naive von aktivierten CD8 T-Zellen im Adhäsions- und Transmigrationsverhalten in der Leber?

Zur Untersuchung dieser Fragen *in vivo* wurde von der Methode des adoptiven Transfers T-Zellrezeptor transgener CD8 T-Zellen in antigen-injizierte Empfängertiere unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen Gebrauch gemacht. Darüber hinaus wurde die Interaktion zwischen LSEC und CD8 T-Zellen *in vitro* unter statischen Bedingungen und unter definierbaren physiologischen Verhältnissen in einer Parallelfusskammer beobachtet. Mit Hilfe der *intravital* Mikroskopie konnte das Adhäsionsverhalten naiver CD8 T-Zellen in der Leber im lebenden Tier verfolgt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Analysewaagen	,U4100-OD2.2' und ,MC BA 100' (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Belimed
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Bestrahlungsgerät	Biobeam 2000 (MCP-STS, Braunschweig)
Brutschränke	Hera cell, Hera cell 240 (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Cantoll, LSRII (Becton Dickinson, Heidelberg)
Eismaschine	Icematic (Scotsman®, Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien)
Erlenmeyerkolben	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Schott, Mainz)
Gewindeflaschen	100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l (Schott, Mainz)
Injektionspumpe	WPI SP2101WZ (WPI, Aston, UK)
Kamera	F-ViewII CCD (Olympus, Hamburg)
Kühlschränke (+4°C)	economic cooler (Bosch, Stuttgart) Liebherr premium, Liebherr comfort (Liebherr, Biberach)
Kühlschränke (-20°C)	Liebherr comfort (Liebherr, Biberach)
Kühlschränke (-80°C)	Hera freeze (Heraeus, Hanau)
Messkolben	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l (Schott, Mainz)
Messzylinder	Rotilabo 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l (Roth, Karlsruhe)
Mikroskope	DM IL (Leica, Wetzlar) IX81, CKX41 (Olympus, Hamburg) IX81+Fluoview 1000 (Olympus, Hamburg)
Parallelfusskammer	Universitätsklinik Aachen, C. Weber
pH-Meter	pH 523 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim)
Pipetten	0,2-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-100 µl, 30-200 µl, 200-1000 µl (Eppendorf, Hamburg) Multipipette® plus (Eppendorf, Hamburg)
Pipettierhilfe	Matrix Technologies CellMate® (Thermo Scientific, USA)
Präparationsbesteck	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Pumpe	Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company via Novodirect, Kehl/Rhein)

Reinstwasseranlage	NANOpure Diamond, Barnstead (Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen)
Rotoren	#6445 (Heraeus, Hanau)
Schüttelwasserbad	GFL® 1092 (GFL®, Burgwedel)
Siebe, Metall-	Universität Bonn, Abt. Feinmechanik
Sonifikator, Stab-	UW2070/Sonoplus (Bandeln electronic, Berlin)
Vibratom	VT1000 S (Leica, Wetzlar)
Wasserbäder	TW8 (Julabo, Seelbach)
Werkbank, steril	Hera safe (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer ‚improved‘ (La Fontaine über Labotec, Labor-Technik, Göttingen)
Zentrifugen	Elutriator Avanti J-25 I (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof) Multifuge 3s-r, Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21x46 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Einmalröhrchen	PP-Röhrchen 50 ml steril, PP-Röhrchen 15 ml steril (Greiner bio-one, Solingen)
FACS Röhrchen	Polystren 12/75 mm (BD, Heidelberg und Sarstedt, Nümbrecht)
Glaskanülen, heparinisiert	Mikro-HK-Kapillaren (Brand GmbH, Wertheim)
Handschuhe, Einmal-	DermaClean (Ansell, Brüssel, Belgien)
Kanülen	0,4x19 mm 27G (grau), 0,5x25 mm 25G (orange) (BD Microlance, Heidelberg) 0,90x120 mm (TSK-supra, Vertrieb durch Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen)
Messpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	24-, 96- Loch (Nunc, Wiesbaden, bio-one, Solingen, TPP, Trasadingen, Schweiz und Costar/Corning, USA)
Nylonwolle	Kisker GbR (über Labomedic GmbH)
Objektträger	76x26x1 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
OP-Masken	Foliodress®mask (Hartmann, Heidenheim)

Parafilm	Parafilm „M“ <sup>®</sup> (Amerikan National Can TM, Greenwich, CT, USA)
Pasteurpipetten	150 mm, 230 mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	10 cm (greiner bio-one, Solingen)
Pipettenspitzen	Standardtips 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l (greiner bio-one, Solingen)
Polyamidsiebgewebe	,Gaze' 40 $\mu$ m über Labomedic, Bonn
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)
Skalpelle	Feather (Osaka, Japan)
Spritzen	2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml BD Discardit <sup>TM</sup> II (BD, Heidelberg)
Sterilfilter	0,2 $\mu$ m (Schleicher&Schuell, Einbeck und BD, Heidelberg)
Transwell	0,4 $\mu$ m Porengröße (Greiner, Nürtingen)
Zellkulturplatten	150 x 20 mm (Sarstedt, Nümbrecht)

### 3.1.3 Chemikalien und Reagentien

Avertin, 2,2,2-Tribromethanol 97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
BSA-Texas Red	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
CFSE / CFDA-SE (C <sub>29</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>11</sub> , MW=557,47)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DMEM-Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> , MW=46,07)	Applichem, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin (200mM) (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Cambrex, Verviers, Belgien
IMDM Medium	Lonza, Verviers, Belgien
Kollagen R	Serva, Heidelberg
Lymphozytenseparationsmedium	Nycomed Pharma, Unterschleissheim
Mannan	Sigma, Deisenhofen
2-Merkaptoethanol (HS(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH, MW=78,13)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> , MW=65,01)	Sigma, Deisenhofen
Nycodenz	Axis-Shield, Norwegen
Ovalbumin	Serva, Heidelberg
OVA Peptid <sub>257-264</sub> , 80% HPLC rein	Pineda, Berlin
Paraformaldehyd (PFA) (H(-OCH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -OH)	Fluca, Buchs

PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000 U/ml)/	
Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Percoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich
SIINFEKL, siehe OVA Peptid <sub>257-264</sub>	
Streptomycin (10 mg/ml)/	
Penicillin (10.000 U/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Trypanblau	Serva, Heidelberg

### 3.1.4 Allgemeine Lösungen

#### 3.1.4.1 Medien

LSEC Medium	DMEM high Glucose (4500 mg/l) 10 % (v/v) FCS 4 mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1 g/l Streptomycin
T-Zell Medium	RPMI 1640 8 % (v/v) FCS 1 % (v/v) β-Merkaptoethanol 4 mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1 g/l Streptomycin
BM-DC Medium	IMDM 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) β-Merkaptoethanol 4 mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1 g/l Streptomycin 30 % (v/v) GM-CSF Überstand

**3.1.4.2 Puffer**

ACK Lysepuffer	16,58 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ 2 g $\text{KHCO}_3$ 74,4 mg $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 2000 ml $\text{H}_2\text{O}$ pH 7,2-7,4
EDTA (0,5M)	186,1 g EDTA ca. 20 g NaOH 1000 ml $\text{H}_2\text{O}$ pH 7,8-8,0
FACS Puffer	PBS 1 % (v/v) FCS 2 mM EDTA 0,02 % $\text{NaN}_3$
GBSS (Gey's balanced salt solution)	137 mm NaCl 5 mM KCl, 1,6 mM $\text{CaCl}_2$ 0,9 mM $\text{MgCl}_2$ 0,3 mM $\text{MgSO}_4$ 0,2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH7,4) 2,7 mM $\text{NaHCO}_3$ 5,5 mM D(+)-Glukose 50 mM HEPES pH 7,4
MACS Puffer	PBS 1 % (v/v) FCS 2 mM EDTA pH 7,2

PBS (phosphate buffered saline):	80 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l NaHPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 (Fa. Biochrom)
Perfusionspuffer	0,01 g L-Asparaginsäure 0,02 g L-Threonin 0,03 g L-Serin 0,04 g Glycin 0,05 g L-Alanin 0,13 g L-Glutaminsäure 0,13 g L-Glutamin 3,6 g D-(+)-Glucose 3,6 g Fructose 67,4 g Sucrose 0,22 g KCl 0,1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,1 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 2,4 g HEPES 2,0 g NaHCO <sub>3</sub> 1000 ml H <sub>2</sub> O  0,05 % (v/v) Kollagenase
Saponin Puffer	FACS Puffer 0,5 % (w/v) Saponin

### 3.1.5 Antikörper

Folgende Antikörper gegen murine Epitope wurden verwendet. Diese wurden mit einem Fluorochrom (FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC, Alexa 647) oder unkonjugiert eingesetzt.

Antigen	Isotyp	Klon	Anmerkung	Firma
CD3 $\epsilon$	IgG Hamster	145-2C11		BD, eigene Herstellung
CD8 $\alpha$	IgG2a k, Ratte	53-6.7	= Ly-2	BD, eigene Herstellung
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	= Integrin $\alpha$ X Kette	BD
CD16/32	IgG2b k, Ratte	2.4G2	=anti-Fc $\gamma$ R III + II	eigene Herstellung
CD25	IgG2b k, Ratte	3C7	= IL-2 Rezeptor alpha Kette	BD
CD44	IgG2b k, Ratte	IM7	= Pgp-1, Ly-24	BD
CD54	IgG1 k, Hamster	3E2	= ICAM-1	BD
CD62L	IgG2a k, Ratte	MEL-14	= L-Selektin, LECAM-1, Ly-22	BD
CD69	IgG1, Hamster	H1.2F3		BD
CD80	IgG2, Hamster	16-10A1	= B7.1	BD
CD86	IgG2a $\kappa$ , Ratte	GL1	= B7.2	BD
CD102	IgG2a $\kappa$	3C4(m1C2 /4)	= ICAM-2	BD
CD106	IgG2a $\kappa$ , Ratte	429	= VCAM-1	BD
IL-2	IgG2b, Ratte	JES6-5H4		BD
IFN- $\gamma$	IgG1 $\kappa$ , Ratte	XMG1.2		BD
ME-9F1	IgG2a, Ratte	ME-9F1	anti-LSEC	eigene Herstellung
NK1.1	IgG2a k, Maus	PK136	zur Depletion in vivo eingesetzt	eigene Herstellung
V $\alpha$ 2 TCR	IgG2a I, Ratte	B20.1	OT-1 TCR	BD
V $\beta$ 5 TCR	IgG1 k, Maus	MR9-4	OT-1 TCR	BD
DesTCR	IgG, Ratte	Desire		eigene Herstellung
LFA-1 Fab	IgG2b, Ratte	H35.89.9		von A. Hamann, Berlin

H-2K <sup>b</sup>	IgG, Maus	5-F-1	anti-MHC Klasse I, bindet nicht H-2K <sup>bm1</sup>	von M. Hoffmann, Hannover
H-2K <sup>b</sup>	IgG2a κ, Ratte	AF6-88.5	anti-MHC Klasse I	BD
Isotypantikörper	IgG2a κ, Ratte			BD
Isotypantikörper	IgG2b κ, Ratte			BD

### 3.1.6 Weitere Fluorochrome

7-AAD                                      7-Aminoactinomycin D, C<sub>62</sub>H<sub>87</sub>N<sub>13</sub>O<sub>16</sub>, MW=1270,45,  
Molecular Probes, Leiden

CFSE                                        (CFDA-SE), Molecular Probes, Leiden

Hoechst                                    Sigma, Steinheim

Streptavidin                            -FITC (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg)  
   -PE (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg)  
   -APC (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg)

### 3.1.7 Magnetische Kügelchen (MACS Beads)

Murine anti-CD8, anti-CD11c, anti-CD90, anti-ME-9F1 Beads, Miltenyi, Bergisch  
Gladbach

### 3.1.8 Enzyme

Accutase                                  PAA, Pasching

Kollagenase A                            Sigma, Steinheim

### 3.1.9 Inhibitoren

Pertussis Toxin                        *Bordetella pertussis*, Calbiochem, USA

2-BEA                                      2-Bromoethylaminehydrobromide, Sigma, Steinheim

Golgi Plug                                BD Bioscience, Heidelberg

Golgi STOP                                BD Bioscience, Heidelberg

**3.1.10 Zelllinien**

Ag8653	GM-CSF-produzierende Hybridomzelllinie
C57-K <sup>b</sup>	Maus-Fibroblasten-Zelllinie aus C57Bl/6
DC2.4	Murine DC-Zelllinie (Shen et al., 1997)

**3.1.11 Mauslinien**

C57Bl/6:	Inzuchtstamm mit dem MHC Klasse I Haplotyp H2K <sup>b</sup> , aus eigener Zucht.
ICAM-1 <sup>-/-</sup> :	ICAM-1 knockout Stamm auf C57Bl/6 Hintergrund (Xu et al., 1994). Bezogen über Jackson Laboratory (B6.129S4-ICAM-1 <sup>tm1Jcgr/J</sup> ).
OT-1xRag:	CD8 T-Zell transgene Mauslinie. H2K <sup>b</sup> <sup>SIINFEKL</sup> -restringierter V $\alpha$ 2V $\beta$ 5 T-Zellrezeptor, aus eigener Zucht. (Hogquist et al., 1994).
DesTCR:	T-Zellrezeptor transgene Mäuse mit Spezifität für drei endogene Peptide im Kontext des MHC Klasse I Moleküls H-2K <sup>b</sup> (Guimezanes et al., 2001; Schonrich et al., 1991).
B6.C-H2 <sup>bm1</sup> :	Mäuse auf dem C57Bl/6 Hintergrund, eine Punktmutation im MHC Klasse I Molekül H2-K <sup>b</sup> verhindert die Bindung vom OVA-Peptid SIINFEKL.

Alle Versuchstiere wurden im „Haus für Experimentelle Therapie“ (HET) oder IMMEI am Universitätsklinikum Bonn unter SPF (*specific pathogen free*) Konditionen gezüchtet und gehalten.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellisolation

Für sämtliche Versuche wurden Mäuse im Alter von 6-12 Wochen verwendet. Zur Entnahme von Organen wurden die Versuchstiere durch Asphyxiation getötet, der Körper mit 70 % (v/v) Ethanol abgesprüht und anschließend die Leibeshöhle geöffnet.

### 3.2.2 Isolation von Zellen aus der Leber

#### 3.2.2.1 Perfusion der Leber

**Material:** 25 G Kanüle, Pumpe

**Lösungen:** GBSS, Perfusionspuffer, 4 % (w/v) PFA Lösung

**Methode:** Der Peritonealraum des Versuchstieres wurde geöffnet und die Pfortader (*Vena porta*) freigelegt. Die Kanüle wurde in die Pfortader eingeführt und die Leber mit der Perfusionslösung mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/Min. für ca. 10 Sek. perfundiert. Anschließend wurden die *Vena cava* und dann die Gallenblase durchtrennt, die Leber entnommen und in ein Gefäß mit GBSS überführt.

Zur Fixierung der Leber für Gewebeschnitte wurde diese mit 4 % PFA-Lösung perfundiert, anschließend für 45 Min. in 4 % (w/v) PFA fixiert und dann in PBS überführt.

#### 3.2.2.2 Isolation von LSEC über Gegenstromzentrifugation

Durch Gegenstromzentrifugation (Elutriation) lassen sich Zellpopulationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte und Größe voneinander trennen. Das Elutriationssystem besteht aus einer Zentrifuge, einem Rotor, einer Elutriationskammer und einer Pumpe. Das Zellgemisch wird durch die Pumpe über ein Schlauchsystem in die Elutriationskammer geleitet. Hier wirken die Zentrifugalkraft des Rotors, sowie die Strömungsgeschwindigkeit auf die Zellen ein, so dass Zellen von einer bestimmten Größe und Dichte in der Elutriationskammer konzentriert werden. Durch Variation der Fließgeschwindigkeit bei konstanter Zentrifugationsgeschwindigkeit lassen sich unterschiedliche Zellfraktionen sammeln.

- Material:** Sieb (250  $\mu\text{m}$ ), Zentrifuge: J2-MC mit Rotor JE-6B
- Lösungen:** GBSS, GBSS/4 % Kollagenase (w/v), Nycodenz Gradient (30 % w/v), LSEC-Medium
- Methode:** Die mit Kollagenase perfundierten Lebern wurden in eine Petrischale überführt, mit einer gekrümmten Schere das weiche vom fibrösen Gewebe abgestrichen und anschließend im Schüttelwasserbad bei 240 rpm 20 Min. lang in GBSS/4 % Kollagenase bei 37°C verdaut. Die Suspension wurde anschließend durch ein Sieb gedrückt und mit GBSS in zwei Waschschritten gewaschen. Über Dichte-Zentrifugation wurden dann Parenchymzellen (Hepatozyten) von anderen Zellen in der Leber getrennt. Hierfür wurde das Zellgemisch im Verhältnis 1:1,23 in Nycodenz gelöst (dies entspricht einer Dichte von 1,089 g/cm<sup>3</sup>) und bei 1400 x g und 20°C für 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die Interphase abgenommen und in GBSS gewaschen.

Für die Auftrennung der Zellen durch Elutriation wurde die Elutriationszentrifuge gestartet (2500 rpm, 24°C) und die Flussrate der Pumpe auf eine Anfangsgeschwindigkeit von 16 ml/Min. eingestellt. Zur Auftrennung der unterschiedlichen Zellpopulationen wurde die Flussrate dann von 16 ml/Min. (Erythrozyten) auf 22 ml/Min., 28 ml/Min. (portale und periportale LSEC), 32 ml/Min. (Mischfraktion aus LSEC und Kupffer Zellen) und 56 ml/Min. (Kupffer Zellen) erhöht. Die Zellsuspension wurde über einen Bypass in das Schlauchsystem des Elutriators eingeführt und jeweils 100 ml je Flussrate gesammelt. Die gesammelten Zellfraktionen wurden anschließend zentrifugiert, gezählt und in LSEC Medium resuspendiert. Für Ko-Kultur Experimente wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in eine vorbeschichtete 24-Loch Platte ausgesät. Für Versuche in der Parallel-Flußkammer wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen in eine Kollagen-beschichtete 35x10 mm Petrischale gegeben. Die Zellen wurden 24 Std. nach Isolation mit warmen PBS gewaschen und 48 Std. nach der Isolation für Experimente eingesetzt.

### 3.2.2.3 Isolation von LSEC über magnetische Zellseparation (MACS)

**Material:** Sieb (250  $\mu\text{m}$ ), Auto MACS

**Lösungen:** MACS Puffer, anti-LSEC Beads, GBSS, GBSS/4% Kollagenase (w/v), Nycodenz Gradient (30 % w/v), LSEC-Medium

**Methode:** Erfolgte die Isolation von LSEC über anti-LSEC Micro Beads, so wurden die perfundierten Lebern wie in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben behandelt. Nach der Nycodenz Dichte-Zentrifugation wurde dann die Interphase in GBSS gewaschen, in MACS Puffer resuspendiert (200  $\mu\text{l}$  pro Leber) und 24  $\mu\text{l}$  anti-LSEC Beads pro Leber hinzugefügt. Nach 20 Min. Inkubation bei 4°C wurden die Zellen einmal mit MACS Puffer gewaschen und über den Auto MACS mit Hilfe des Programms *Possel* positiv aufgereinigt. Die positive Fraktion wurde anschließend zentrifugiert, in LSEC Medium resuspendiert, gezählt und wie in Abschnitt 3.2.2.2 angegeben kultiviert.

### 3.2.2.4 Isolation von Leber-assoziierten Lymphocyten (LAL)

**Material:** Sieb 250  $\mu\text{m}$

**Lösungen:** GBSS, 40 % Percoll/PBS (v/v), 80 % Percoll/PBS (v/v)

**Methode:** Die Perfusion der Leber erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, jedoch wurden die Lebern anstelle von der Perfusionslösung mit GBSS ohne Kollagenase perfundiert. Die perfundierte Leber wurde durch ein Metallsieb gedrückt, mit GBSS gespült und zentrifugiert (10 Min., 350 x g, 20°C). Die Zellen wurden anschließend in 3 ml 40 % Percollösung (v/v) resuspendiert, mit 3 ml 80 % Percollösung (v/v) unterschichtet und bei 800 x g, 20°C, 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Die oberste Zellschicht (Hepatozyten) wurde abgenommen und verworfen, die Interphase (Lymphocyten) abgenommen und mit GBSS gewaschen.

### 3.2.3 Isolation von primären Zellen aus der Milz

**Material:** Sieb (250  $\mu\text{m}$ )

**Lösungen:** PBS, MACS Puffer

**Methode:** Die Milz wurde nach Abtrennung von Fettgewebe und Blutgefäßen entnommen und in PBS überführt. Mit Hilfe eines Spritzenstempels wurde

die Milz durch ein Sieb gedrückt, mit MACS Puffer gespült und zentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°). Die Zellen wurden dann in 1 ml ACK Lysepuffer resuspendiert, 2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, mit MACS Puffer gewaschen und anschließend zentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°).

Diente die Isolation von Zellen aus der Milz der Gewinnung von CD8 T-Zellen, so wurden diese im folgenden Schritt über magnetische Zellseparation (MACS) oder Nylonwolle angereichert.

Für die Isolation transgener OT-1 CD8 T Zellen aus der Milz wurde den Versuchstieren 48 Std. vor Entnahme der Milz 300 µg anti-NK1.1 Antikörper intra peritoneal (*i.p.*) injiziert, um die Depletion von NK- und NKT Zellen zu erzielen.

#### 3.2.4 Isolation von Zellen aus dem Lymphknoten

**Material:** Sieb (250 µm)

**Lösungen:** PBS

**Methode:** Die inguinalen Lymphknoten wurden mit Hilfe einer gekrümmten Pinzette vom Fettgewebe getrennt und in eine 24-Loch Platte in PBS überführt. Mit einem Spritzenstempel wurden die Lymphknoten zerdrückt und die Zellsuspensionen anschließend filtriert.

#### 3.2.5 Isolation von Zellen aus der Lunge

**Material:** Sieb (250 µm)

**Lösungen:** PBS, Verdaulösung (PBS/0,5% Kollagenase A (w/v)), 40 % Percoll/PBS (v/v), 80 % Percoll/PBS (v/v)

**Methode:** Zur Entnahme der Lunge wurde der Thorax des Tieres mit einer Schere geöffnet, die Lungenflügel von Blutgefäßen und Trachea getrennt und in PBS überführt. Anschließend wurde das Lungengewebe mit einer Schere zerkleinert, in 2 ml Verdaulösung 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, und anschließend mit einem Spritzenstempel durch ein Sieb gedrückt und mit PBS gespült. Für die Isolation von Lymphozyten aus der Lunge wurden die Zellen in 3 ml 40% Percolllösung (v/v) resuspendiert, mit 3 ml 80% Percolllösung (v/v) unterschichtet und bei 800 x g für 20 Min. bei 20°C

ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase (Lymphozyten) wurde entnommen und mit PBS gewaschen. Zur Lyse von Erythrozyten wurden die Zellen in 0,5 ml ACK Puffer resuspendiert, nach 2 Min. die Reaktion mit PBS gestoppt und zentrifugiert (350 g, 10 Min., 20°).

#### 3.2.6 Generierung von aktivierten Lymphozyten

**Material:** Sieb (250  $\mu\text{m}$ ), 27 G Kanüle

**Lösungen:** PBS, Verdaulösung (PBS/0,5% Kollagenase A), MACS Puffer, T-Zell-Medium, Lymphozytenseparationsmedium

**Methode:** Aktivierte OT-1 CD8 T Zellen wurden aus Milzen von OT-1xRAG<sup>-/-</sup> Mäusen generiert. Hierfür wurde die Milz entnommen, in einer Petrischale mit einer 27 G Kanüle Verdaulösung in die Milz injiziert und diese in 2 ml Verdaulösung 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Milz mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Sieb gedrückt, mit MACS Puffer gespült und zentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°). Die Zellen wurden in T-Zell Medium resuspendiert, gezählt und in einer 24-Loch Platte mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/Loch und 0,5 mg/ml OVA ausgesät. Nach 72 Std. wurde 1 ml Medium entnommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. An Tag 7 wurden die Zellen gesammelt und zentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°). Zur Beseitigung von toten Zellen wurden die Zellen in 5 ml T-Zell Medium resuspendiert, mit 2 ml Lymphozytenseparationsmedium unterschichtet und bei 2000 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Die Interphase wurde anschließend entnommen, mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

#### 3.2.7 Generierung von CD11c<sup>+</sup> Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

**Material:** Sieb (250  $\mu\text{m}$ ), 27 G Kanüle

**Lösungen:** PBS, BM-DC Medium

**Methode:** Den Versuchstieren wurden Oberschenkel- (*Femur*) und Unterschenkelknochen (*Tibia*) entnommen und von Muskeln und Sehnen befreit. Die Knochen wurden steril mit einer Schere an beiden Seiten jeweils kurz unterhalb des Gelenks geöffnet und das Knochenmark mit

IMDM Medium mit einer 27 G Kanüle heraus gespült. Die Zellen wurden zur Einzelzellsuspension resuspendiert, anschließend filtriert und die Zellzahl bestimmt. Die Knochenmarksvorläuferzellen wurden in BM-DC Medium resuspendiert und in Petrischalen ausgesät ( $5 \times 10^6/7\text{ml/Schale}$ ). An Tag 3 wurde das Medium ausgetauscht und an Tag 4 die Zellen mit 2 mM EDTA geerntet, gezählt und erneut in einer Konzentration von  $5 \times 10^6/7\text{ml/Schale}$  ausgesät. An Tag 7 wurden die Zellen im Experiment verwendet und hierfür mit 2 mM EDTA von den Platten gelöst, die Zellzahl bestimmt und über magnetische Zellseparation (s. Abschnitt 3.2.8) die CD11c<sup>+</sup> Dendritischen Zellen aufgereinigt.

#### **3.2.8 Isolation von Zellpopulationen über magnetische Zellseparation (MACS)**

Die MACS Technologie ermöglicht eine einzelne Zellpopulation über die Expression von Oberflächenmolekülen von einem Zellgemisch zu trennen. Hierbei werden mit Antikörpern beschichtete magnetische Kügelchen (engl: *Microbeads*) verwendet und mit den Zellen inkubiert. Dabei binden die gegen spezifische membranständige Epitope gerichteten Antikörper an die gezielte Zellpopulation. Danach wird die Zellsuspension auf eine magnetisch geladene Säule gegeben, wodurch die Zellen hängen bleiben, welche die *Microbeads* gebunden haben. Durch die Entfernung des magnetischen Feldes kann diese Population separat von den anderen Zellen gesammelt werden. Die Separation erfolgte am Auto MACS automatisch über das Programm ‚*Posse!*‘. Es wurden CD8 T-Zellen über anti-CD8 Microbeads, CD11c<sup>+</sup> Dendritische Zellen über anti-CD11c Microbeads, LSEC über anti-ME-9F1 Microbeads und T-Zell Vorläuferzellen über anti-CD90 Microbeads isoliert.

**Material:** Auto MACS (Fa. Miltenyi)

**Lösungen:** MACS Puffer

**Methode:** Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $200 \times 10^6$  Zellen/ml in MACS Puffer eingestellt und mit  $12\text{-}24 \mu\text{l}$  Microbeads pro  $50 \times 10^6$  Zellen für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS Puffer gewaschen, in 4 ml MACS Puffer aufgenommen und über den Auto MACS mit Hilfe des Programms ‚*Posse!*‘ sortiert.

### 3.2.9 Isolation von Lymphozyten über Nylonwolle

T-Zellen adsorbieren, im Gegensatz zu Monozyten, Granulozyten und B-Zellen, nicht an Nylonwolle und lassen sich daher über Nylonwolle von anderen Leukozyten isolieren.

**Material:** Nylonwolle, 10 ml Spritze

**Lösungen:** PBS/1 % FCS, T-Zell Medium

**Methode:** In eine mit 0,6 g Nylonwolle gefüllte sterile 10 ml Spritze wurde zum Blockieren von unspezifischen Bindungen PBS/1 % FCS gegeben und bei 37°C für 45 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Milzzellen in T-Zell Medium aufgenommen (eine Milz pro Spritze), auf die Nylonwolle gegeben und für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Die nicht-adhären CD8 T-Zellen wurden mit warmem T-Zell Medium mit dem zweifachen Säulenvolumen herunter gespült, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt.

### 3.2.10 Produktion von GM-CSF

**Material:** Zelllinie Ag 8653, Sterilfilter 0,2 µm

**Lösungen:** BM-DC Medium

**Methode:** Die Zellen der GM-CSF produzierenden Linie Ag 8653 wurden in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 30 ml BM-DC Medium in 150x20 mm Kulturschalen kultiviert. Nach drei Tagen wurde der Überstand gesammelt, bei 1600 rpm für 10 Min. zentrifugiert, dann der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei 3000 rpm nochmals für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dann filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Für die Generierung von Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark wurde dieser Überstand 30% (v/v) mit BM-DC Medium eingesetzt.

### 3.2.11 Zellzahlbestimmung

**Material:** Neubauer Zählkammer

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

**Methode:** Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit der Trypanblau-Lösung gemischt, hiervon 10 µl in die Neubauer Zählkammer gegeben und in 16

kleinen Außenquadraten die lebenden Zellen, d.h. die nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen, gezählt. Daraus ließ sich die Zellzahl folgendermaßen berechnen:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \\ (\text{Kammerfaktor})$$

#### 3.2.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) ermöglicht die Analyse einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Immunfluoreszenzfärbung. Dabei werden die Zellen durch eine Kapillare in einer Hüllflüssigkeit (*sheath 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 hoch sensiblen 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 (FCS, *forward scatter*), Informationen über die Größe der Zelle. Licht, welches in einem Winkel von  $90^\circ$  detektiert wird, erlaubt eine Aussage über die Granularität der Zelle (SSC, *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 den Einsatz bestimmter Filter von den Sensoren detektiert. Die Analyse der Zellgröße, der Zellgranularität und bestimmter fluorchrommarkierter Moleküle erlaubt eine Charakterisierung einzelner Zellen in einer komplexen Zellsuspension.

Zur Analyse der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden folgende Durchflußzytometer verwendet: FACS Calibur, LSR, Canto, Canto II. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo.

#### 3.2.13 Markierung von Oberflächenantigenen

Zur Immunfluoreszenzmarkierung wurden entweder direkt mit einem Fluorochrom gekoppelte oder biotinylierte Antikörper verwendet. Bei biotinylierten Antikörpern erfolgte ein weiterer Färbeschritt mit einem Fluorochrom-Streptavidin Konjugat.

**Material:** FACS Röhren, 96-Loch Platte (Rundboden)

**Lösungen:** FACS Puffer, 4 % PFA

**Methode:** Zur Oberflächenfärbung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1-5 \times 10^6/\text{ml}$  in FACS Puffer resuspendiert und davon jeweils  $100 \mu\text{l}$  in ein FACS Röhren oder in eine 96-Loch Platte zum Färben überführt. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von  $0,5-1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen zugegeben und für 15 Min. bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert.  $\text{Fc}\gamma$  Rezeptoren wurden durch Zugabe von  $10 \mu\text{l}/\text{ml}$  anti-CD16/CD32 Antikörper (2.4G2) blockiert. Wurden biotinylierte Antikörper eingesetzt, so erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe von Streptavidin Konjugaten in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:400 und eine Inkubationszeit von 20 Min. bei  $4^\circ\text{C}$ . Anschließend wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen ( $350 \times g$ , 3 Min.,  $4^\circ\text{C}$ ) und durchflusszytometrisch analysiert. Um tote Zellen auszuschließen wurde wenige Minuten vor der Analyse am Durchflusszytometer der Farbstoff 7-AAD in einer Endkonzentration von  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben. Erfolgte die Analyse erst am darauffolgenden Tag, so wurden die Zellen für 10 Min. in 4 % PFA fixiert und anschließend in FACS Puffer resuspendiert.

#### 3.2.14 Intrazelluläre Färbung von Antigenen

**Material:** 96-Loch Platte (Rundboden)

**Lösungen:** FACS Puffer, Saponin-Puffer, 4 % PFA,

**Methode:** Erfolgte zur Oberflächenfärbung zusätzlich eine Färbung intrazellulärer Antigene, so wurden nach der in Abschnitt 3.2.13 beschriebenen Oberflächenfärbung die Zellen mit 4 % PFA für 10 Min. auf Eis fixiert und anschließend mit FACS Puffer gewaschen. Es folgten ein Waschschrift mit Saponin-Puffer und danach die Permeabilisierung der Zellen in Saponin-Puffer für 10 Min. auf Eis. Anschließend wurden die in Saponin-Puffer gelösten Antikörper zu den Zellen gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Saponin-Puffer wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen und dann durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.2.15 Zellmarkierung mit CFSE

Die Markierung mit CFSE ermöglicht das Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen zu analysieren. Der Farbstoff wird bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzelle weitergegeben und lässt sich im Durchflußzytometer messen (488 nm). Der Farbstoff kann die intakte Zellmembran passieren und wird intrazellulär von Esterasen gespalten. Die dabei entstehenden reaktiven Gruppen binden kovalent an bestimmte Aminosäuren intrazellulärer Proteine.

**Lösungen:** PBS, FCS

**Methode:** Die zu markierenden Zellen wurden auf eine Konzentration von ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Färbung erfolgte in PBS/1  $\mu$ M CFSE (CFSE<sup>hoch</sup>), bzw. PBS/0,1  $\mu$ M CFSE (CFSE<sup>niedrig</sup>) für 8 Min. bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml FCS beendet und die Zellen dann in PBS gewaschen (350 x g, 10 Min., 20°C).

### 3.2.16 *In vitro* Ko-Kultur im Transwell

**Material:** Transwell, 24-Loch Platte

**Lösungen:** T-Zell Medium

**Methode:** Die Interaktion zwischen CD8 T-Zellen und LSEC wurde durch den Einsatz eines Transwells analysiert. Dafür wurden die LSEC in einer 24-Loch Platte kultiviert und 48 Std. nach deren Isolation  $0,2 \cdot 10^6$  DesTCR CD8 T-Zellen in Transwell-Einsätzen auf die LSEC gegeben. Durch die Porengröße von 0,4  $\mu$ m konnten die CD8 T-Zellen nicht zu den LSEC durchdringen und keinen direkten Zellkontakt bilden, sondern standen nur durch den Austausch von löslichen Mediatoren in Kontakt. Nach 24 Std. wurden die LSEC und die CD8 T-Zellen aus der 24-Loch Platte bzw. den Transwell-Einsätzen isoliert, mit Aktivierungsmarkern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.2.17 *In vitro* Adhäsionsanalyse

**Material:** 24-Loch Platte, Kalibrierungskügelchen

**Lösungen:** PBS, T-Zell Medium, 2 mM EDTA, CFSE

**Methode:** Für *in vitro* Adhäsionsversuche wurden LSEC in einer 24-Loch Platte ausgesät und 2 Std. vor Versuchsbeginn mit unterschiedlichen Konzentrationen OVA beladen. Aufgereinigte OT-1 CD8 T-Zellen wurden mit 1  $\mu$ M CFSE markiert und jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Loch dazu gegeben. Nach 4 Std. Inkubation bei 37°C wurden nicht-adhärierende Zellen vorsichtig mit PBS abgewaschen, die verbleibenden adhärierenden Zellen mit 2 mM EDTA gelöst und deren Zellzahl bestimmt. Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte indem eine definierte Anzahl (10 000) FACS Kalibrierungskügelchen (*Beads*) zu jeder Probe zugegeben, die Probe anschließend im Durchflusszytometer gemessen und die Zellzahl folgendermaßen berechnet wurde:

$$\text{Zellen}_{\text{Total}} = (\text{Beads}_{\text{Total}} \times \text{Zellen}_{\text{Probe}}) / \text{Beads}_{\text{Probe}}$$

#### 3.2.18 *In vitro* Video Mikroskopie

**Material:** Mikroskop (IX81)

**Lösungen:** T-Zell Medium

**Methode:** Die Analyse der Migration antigenspezifischer CD8 T Zellen auf LSEC, DC2.4 und C57 wurde an einem inversen Mikroskop (Olympus IX81) durchgeführt und mit einer F-ViewII CCD Kamera mit Hilfe der CellR Software aufgezeichnet. Wie in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben wurden LSEC in einer 24-Loch Platte ausgesät und 2 Std. vor Versuchsbeginn mit 0,5 mg/ml OVA bzw. 1  $\mu$ M SIINFEKL beladen. DC2.4 und C57 wurden 24 Std. vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von  $0,2 \times 10^6$  pro 24-Loch Platte ausgesät und 2 Std. vor Versuchsbeginn mit 1  $\mu$ M SIINFEKL, bzw. 0,5 mg/ml OVA beladen. Jeweils  $0,5 \times 10^6$  aufgereinigte OT-1 CD8 T Zellen wurden in T-Zell Medium pro Loch hinzu gegeben und 10 Min. nach Zugabe der Zellen die Video Aufzeichnung gestartet. Die Aufzeichnung erfolgte alle 10 Sek. über einen Zeitraum von 60 Min. Von den 360 Bildern wurde jedes 10. Bild für die Auswertung verwendet. Diese wurde mit dem Programm CellR TrackIt (Olympus) durchgeführt und die Migrationswege von jeweils 20-30 Zellen pro Film verfolgt. Die Berechnung der zurückgelegten Distanz der einzelnen Zelle und die Länge des Migrationsweges wurden von dem Programm berechnet.

### 3.2.19 *In vitro* Transmigrationsanalyse (Parallelfusskammer)

**Material:** Parallelfusskammer, Mikroskop (IX81)

**Lösungen:** T-Zell Medium

**Methode:** Die Transmigration von naiven und aktivierten OT-1 CD8 T-Zellen auf LSEC wurde unter Flussbedingungen analysiert und an einem inversen Mikroskop (Olympus IX81) mit einer F-ViewII CCD Kamera mit Hilfe der CellR Software aufgezeichnet. Hierfür wurden LSEC in einer 35 x 10mm Petrischale kultiviert und 2 Std. vor Versuchsbeginn mit 0,5 mg/ml OVA beladen. Die CD8 T-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.3 und 3.2.6 generiert und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml und einer Geschwindigkeit von 0,02 ml/Min. mittels einer Injektionspumpe über die LSEC in einer Parallelfusskammer geleitet. Die Aufzeichnung erfolgte alle 10 Sek. über einen Zeitraum von 60 Min. Die Anzahl adhärerender und transmigrierender Zellen wurde bestimmt und der Prozentsatz von transmigrierenden Zellen innerhalb der adhärerenden Zellen berechnet.

### 3.2.20 Generierung von Knochenmarkschimären

**Material:** Bestrahlungsgerät

**Lösungen:** IMDM Medium, MACS Puffer, PBS, anti-CD90 MACS Beads

**Methode:** Für die Generierung von Knochenmarkschimären wurden die Empfängertiere mit einer lethalen Dosis von 9 Gy (=900 Rad) in einer Gammabestrahlungsanlage bestrahlt. Am darauffolgenden Tag wurde von Spendertieren das Knochenmark aus Femur und Tibia (s. Abschnitt 3.2.7) entnommen, T-Zell Vorläuferzellen über anti-CD90 MACS Beads negativ depletiert und  $7-10 \times 10^6$  Zellen *i.v.* in die Empfängertiere injiziert. Nach ca. 6 Wochen wurde das Ausmaß der Rekonstitution in den Empfängertieren analysiert. Hierfür wurde peripheres Blut mit dem Antikörper 5-F-I gefärbt, dieser bindet spezifisch H-2K<sup>b</sup>, jedoch nicht H-2K<sup>bm1</sup>, und durchflusszytometrisch analysiert. Nach 10 Wochen wurden die Chimären für adoptive Transferversuche verwendet.

### 3.2.21 Adoptiver Transfer

**Material:** Kalibrierungskügelchen

**Lösungen:** CFSE

**Methode:** CD8 T-Zellen wurden mit  $1 \mu\text{M}$  (CFSE<sup>hoch</sup>) bzw  $0,1 \mu\text{M}$  (CFSE<sup>niedrig</sup>) CFSE markiert und in C57Bl/6 Empfängertiere injiziert, denen 2 Std. zuvor 2 mg OVA *i.v.* appliziert wurde. Nach 2, 4, und 6 Std. wurden die Leber, die Milz, die Lunge und die inguinalen Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten aus den jeweiligen Organen isoliert. Die Zellsuspensionen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zur Quantifizierung der einzelnen Zellpopulationen wurde eine definierte Menge (10 000) Kalibrierungskügelchen (*Beads*) zu jeder Probe gegeben und die absoluten Zellzahlen wie folgt berechnet:

$$\text{Zellen}_{\text{Total}} = (\text{Beads}_{\text{Total}} \times \text{Zellen}_{\text{Probe}}) / \text{Beads}_{\text{Probe}}$$

Aus den absoluten Zellzahlen wurde dann der Prozentsatz der adoptiv transferierten Zellen (CFSE<sup>+</sup>) von der endogenen CD8 T-Zellpopulation berechnet.

### 3.2.22 Intravital Mikroskopie

**Material:** Fluoreszenzmikroskop

**Lösungen:** Isofluran

**Methode:** Für die intravital Mikroskopie wurden naive OT-1 CD8 T-Zellen wie zuvor beschrieben isoliert und CFSE markiert. Die Empfängertiere erhielten 2 Std. vor Injektion der CD8 T-Zellen 2 mg OVA *i.v.* Zur Visualisierung der antigenspezifischen Adhäsion *in vivo* wurden die Versuchstiere mit Isofluran (1,5 Vol %, 1,5 l/Min. O<sub>2</sub>) betäubt, der Peritonealraum geöffnet und die Leber freigelegt.  $2 \times 10^6$  OT-1 CD8 T-Zellen wurden *i.v.* appliziert und die Zirkulation der Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2500, Leica, Bensheim) und einer Video Kamera aufgezeichnet. Zur Quantifizierung der Adhäsion nach 4 Std. wurden 20 - 30 Lobuli je Versuchstier analysiert und die Anzahl adhätierender Zellen pro Lobulus bestimmt.

### 3.2.23 Konfokale Mikroskopie

**Material:** Vibratom, konfokales Mikroskop

**Lösungen:** OVA-Texas Red, 4 % PFA

**Methode:** Zur Untersuchung der Lokalisation der adoptiv transferierten CD8 T-Zellen *in situ* wurden CFSE markierte naive und aktivierte OT-1 CD8 T-Zellen wie zuvor beschrieben in OVA behandelte Tiere injiziert. Nach 4 Std. wurden im Abstand von 15 Min. zwei Mal 40  $\mu\text{g}$  OVA-Texas Red *i.v.* injiziert und anschließend die Leber mit 4 % PFA perfundiert und fixiert. Mit einem Skalpell wurde ein Teil der Leber entnommen und mit einem Vibratom (Leica VT1000 S) Schnitte mit einer Dicke von 80  $\mu\text{m}$  angefertigt. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Mikroskop (IX81/Fluoview 1000, Olympus).

### 3.2.24 Restimulation von T Zellen

**Material:** 96-Loch Platte

**Lösungen:** T-Zell Medium, Golgi plug, Golgi Stop

**Methode:** Zur Analyse des funktionellen Phänotyps wurden die Lymphozyten aus Leber und Milz isoliert und antigenspezifisch auf CD11c<sup>+</sup> Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark restimuliert. Hierfür wurden CD11c<sup>+</sup> DC 24 Std. vor Versuchsbeginn mit OVA (0,5 mg/ml) beladen und jeweils  $0,1 \times 10^6$  CD11c<sup>+</sup> DC mit  $0,3 \times 10^6$  Lymphozyten in einer 96-Loch Platte in Anwesenheit von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Golgi Plug und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Golgi Stop für 5 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen extra- und intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

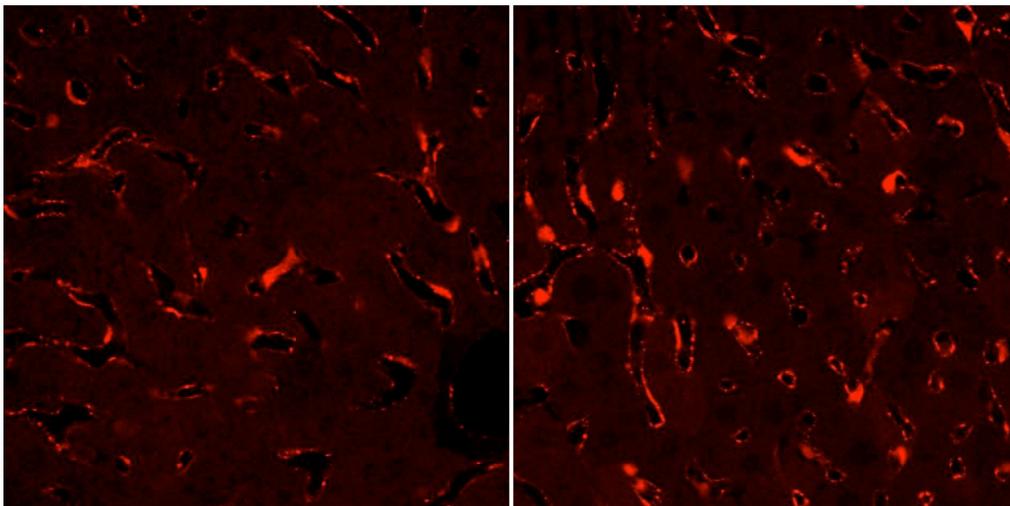
### 3.2.25 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt mit einer Gruppengröße von drei Versuchstieren. Die Fehlerabweichungen sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben (SEM). Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 LSEC nehmen lösliche Antigene aus dem Blut auf

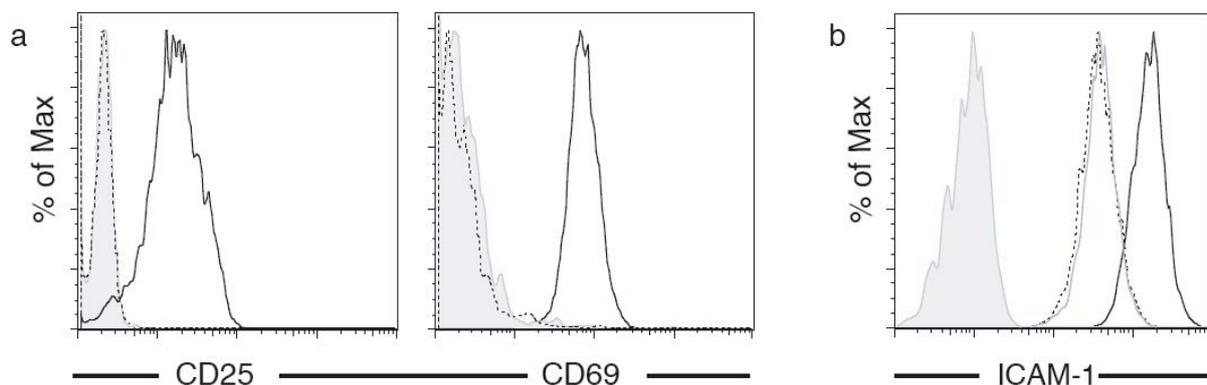
Nährstoffreiches Blut aus dem Darm tritt über die Pfortader in die Leber ein, verteilt sich dann auf ein Netzwerk zahlreicher Sinusoide und durchströmt die Leber mit einer geringen Geschwindigkeit. Dadurch wird ein intensiver Stoffaustausch zwischen dem Blut und den Zellen in der Leber ermöglicht. Um zu untersuchen, welche der unterschiedlichen Zellpopulationen in der Leber *in vivo* in der Lage sind lösliche Antigene aufzunehmen, wurde C57Bl/6 Mäusen fluoreszent markiertes Ovalbumin injiziert. Durch die konfokale Mikroskopie von Leberschnitten war sichtbar, dass innerhalb von Minuten nach der systemischen Applikation des löslichen Antigens, dieses in den Zellen zu finden ist, welche die hepatischen Sinusoide umgeben, während im Parenchym der Leber keine Aufnahme des Antigens zu sehen ist (Abb. 4.1). Diese dünne Zellschicht, welche die hepatischen Sinusoide auskleidet, bilden die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC), die sich durch eine hohe Antigenaufnahme auszeichnen.



**Abbildung 4.1: Aufnahme von löslichem Antigen in der Leber.** C57Bl/6 Mäusen wurde 40  $\mu\text{g}$  OVA-Texas Red-markiertes Ovalbumin injiziert. Nach 15 Min. wurden die Lebern fixiert und entnommen, Leberschnitte angefertigt, und diese im konfokalen Mikroskop analysiert.

## 4.2 Die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC führt zu einer antigenspezifischen Aktivierung naiver CD8 T-Zellen

Nach der Beobachtung dass sinusoidale Endothelzellen effizient Antigen aufnehmen (Abb. 4.1) stellte sich die Frage, ob diese auch in der Lage sind das Antigen auf MHC Klasse I an CD8 T-Zellen zu präsentieren. Hierfür wurden LSEC aus C57Bl/6 Mäusen isoliert und mit naiven transgenen CD8 T-Zellen in Anwesenheit des Antigens inkubiert. Dabei wurden die CD8 T-Zellen entweder mit direktem Zell-Zell Kontakt auf den LSEC, oder in einem Transwell ohne Kontakt zu LSEC kultiviert. Anhand der verstärkten Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 war zu sehen, dass die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC zu einer Aktivierung der naiven CD8 T-Zellen führte (Abb. 4.2a). Diese Aktivierung beruht auf direkter Zell-Zell Interaktion zwischen LSEC und CD8 T-Zelle, da T-Zellen, welche in einem Transwell ohne Kontakt zur LSEC kultiviert wurden, keine Aktivierung in Form von einer erhöhten Expression von CD25 und CD69 aufwiesen (Abb. 4.2a).



**Abbildung 4.2: Expression von Aktivierungsmarkern nach der Ko-Kultur naiver CD8 T-Zellen mit LSEC.** (a, b) LSEC wurden aus C57Bl/6 Mäusen isoliert und mit antigenspezifischen CD8 T-Zellen mit direktem Zell-Zell Kontakt (schwarze Linie), in einem Transwell ohne Kontakt zur LSEC (gestrichelte Linie) oder (b) ohne CD8 T-Zellen (graue Linie) kultiviert. Nach 24 Std. wurde (a) die Expression von CD69 und CD25 auf den CD8 T-Zellen, bzw. (b) die Expression von ICAM-1 auf LSEC durchflusszytometrisch analysiert. Isotypkontrollen sind durch graue gefüllte Histogramme dargestellt.

Interessanterweise führte die Interaktion zwischen LSEC und CD8 T-Zellen auch auf Seite der Endothelzelle zu einer Aktivierung. Hier war eine verstärkte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 im Falle einer direkten Interaktion mit den CD8 T-Zellen zu

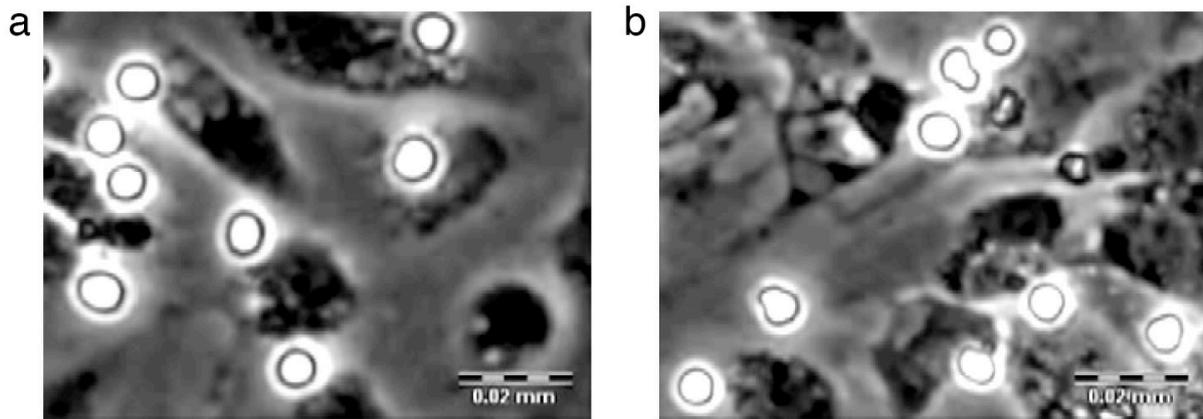
beobachten (Abb. 4.2b). Fehlte hingegen der Zell-Zell Kontakt, so wurde ICAM-1 im gleichen Maße wie im Ruhezustand, d.h. in Abwesenheit von CD8 T-Zellen, exprimiert.

LSEC sind also in der Lage effizient lösliches Antigen aufzunehmen und naiven CD8 T-Zellen zu präsentieren. Die Interaktion zwischen CD8 T-Zellen und Endothelzellen führt dann zu einer gegenseitigen Aktivierung in Abhängigkeit von Zell-Zell Kontakt.

### **4.3 Antigen-spezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen auf kreuzpräsentierenden LSEC**

Trifft eine naive T-Zelle in sekundären lymphatischen Organen auf eine professionelle antigenpräsentierende Zelle mit ihrem Antigen, so stoppt sie ihre Migration und bildet einen Kontakt zur dendritischen Zelle (Bousoo and Robey, 2003). Dabei bestimmt die Dauer der Interaktion die nachfolgende Funktion der T-Zelle. So scheinen lange und stabile Kontakte zwischen T-Zelle und APC zu einer Aktivierung der T-Zelle beizutragen, während kurze serielle Interaktionen zur Toleranz der T-Zelle führen (Hugues et al., 2004).

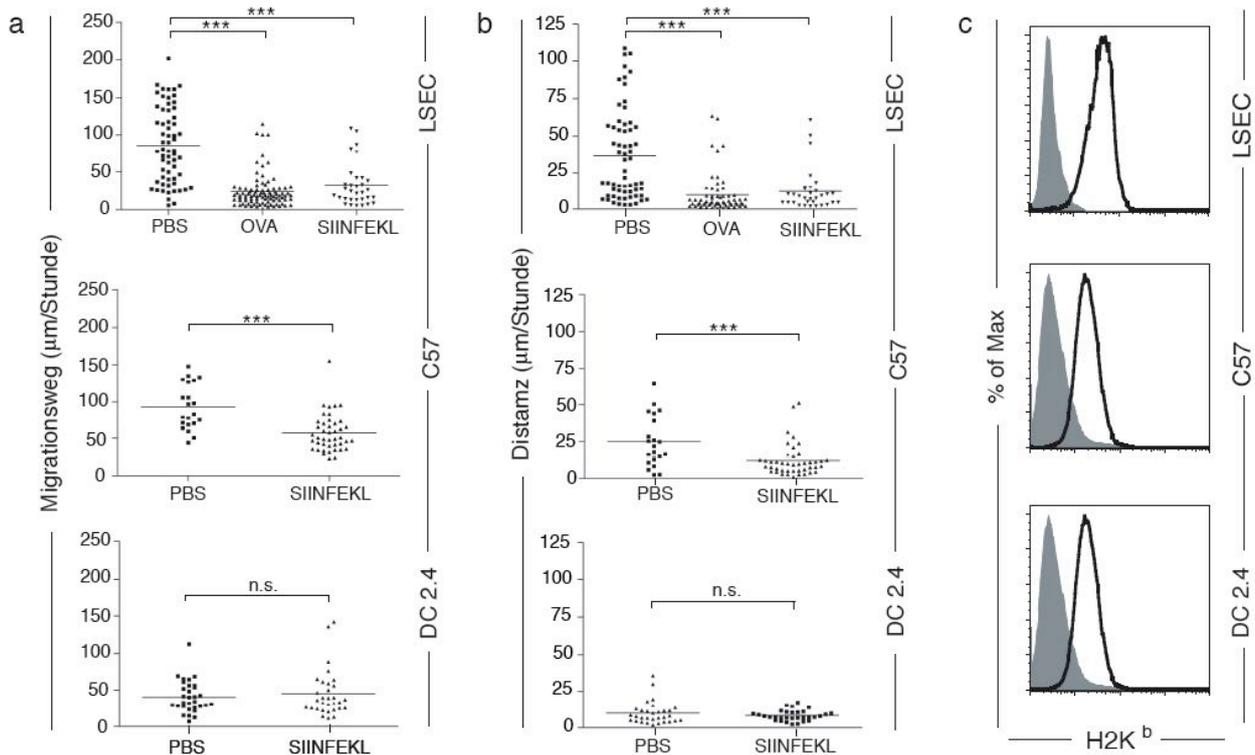
LSEC sind ebenfalls in der Lage lösliches Antigen effizient aufzunehmen und naiven CD8 T-Zellen zu präsentieren (Abb. 4.1 und 4.2). Die Visualisierung der Interaktion zwischen naiven CD8 T-Zellen und LSEC *in vitro* mit einem Lebend-Zell-Mikroskop zeigte, dass LSEC auch einen Migrations-Stopp naiver CD8 T-Zellen induzieren, sobald Antigen von den LSEC präsentiert wird. Hierfür wurden antigen-spezifische OT-1 CD8 T-Zellen mit LSEC in Anwesenheit von Ovalbumin, dem OVA-Peptid SIINFEKL, oder ohne Antigen ko-kultiviert und 60 Min. lang gefilmt. Sobald OVA, bzw. SIINFEKL von den LSEC präsentiert wurde, stoppte die Migration der CD8 T-Zellen und sie schienen an den LSEC festzukleben. Dabei bewahrten die CD8 T-Zellen ein hohes Maß an Bewegung, sie formten Zellausläufer in unterschiedliche Richtungen, jedoch legten sie keine Distanz zurück sondern verblieben auf derselben Stelle (Film a). Hingegen zeigten naive CD8 T-Zellen in Abwesenheit des Antigenes eine hohe Mobilität auf LSEC (Film b).



**Film (a) und (b): Lebend-Zell Mikroskopie der Migration naiver CD8 T-Zellen auf kreuzpräsentierenden LSEC.** Naive OT-1 CD8 T-Zellen wurden isoliert, zu OVA-beladenen (Film a), bzw. PBS-beladenen (Film b) LSEC gegeben und 10 Min. nach Zugabe der Zellen die Videoaufnahme gestartet. Die Aufzeichnung erfolgte alle 10 Sek. über einen Zeitraum von 60 Min., von den 360 Bildern wurde jedes 10. Bild für die Auswertung verwendet.

Die Auswertung der Filme ergab, dass die Länge des Migrationsweges und die zurückgelegte Distanz der einzelnen CD8 T-Zellen stark reduziert waren, sobald Antigen von den LSEC präsentiert wurde (Abb. 4.3a und 4.3b). Zum Vergleich der dynamischen Interaktion zwischen CD8 T-Zellen und LSEC mit der Interaktion zwischen Fibroblasten, bzw. Dendritischen Zellen und CD8 T-Zellen, wurden die Fibroblastenzelllinie C57, bzw. die DC-Zelllinie DC2.4 mit dem OVA Peptid SIINFEEKL beladen, da diese Zellen nicht über die Fähigkeit der Kreuzpräsentation verfügen. Hierbei wiesen CD8 T-Zellen auf den Fibroblasten ebenfalls eine Reduktion des Migrationsweges und der Distanz auf, sobald Antigen in Form von SIINFEEKL präsentiert wurde. Der Effekt war jedoch weniger stark als auf LSEC (Abb. 4.3a und 4.3b). Die Länge des Migrationsweges und die zurückgelegte Distanz von CD8 T-Zellen auf DC2.4 sind unabhängig von der Präsentation des Antigens relativ niedrig (Abb. 4.3a und 4.3b). Dabei spielte die unebene Beschaffenheit der Zelllinie DC2.4 *in vitro* eine Rolle, da die CD8 T-Zellen nicht in der Lage waren, in dieser zweidimensionalen Ebene über die hohen Zellkörper der Dendritischen Zellen hinwegzuwandern. Um die Interaktion zwischen CD8 T-Zellen und LSEC mit der von CD8 T-Zellen und Dendritischen Zellen zu vergleichen, sollten für die Dendritischen Zellen dreidimensionale Migrationsbedingungen gewählt werden, wie z.B. ein Kollagengel, um die physiologischen Bedingungen der T-Zell-DC Interaktion im Lymphknoten zu imitieren.

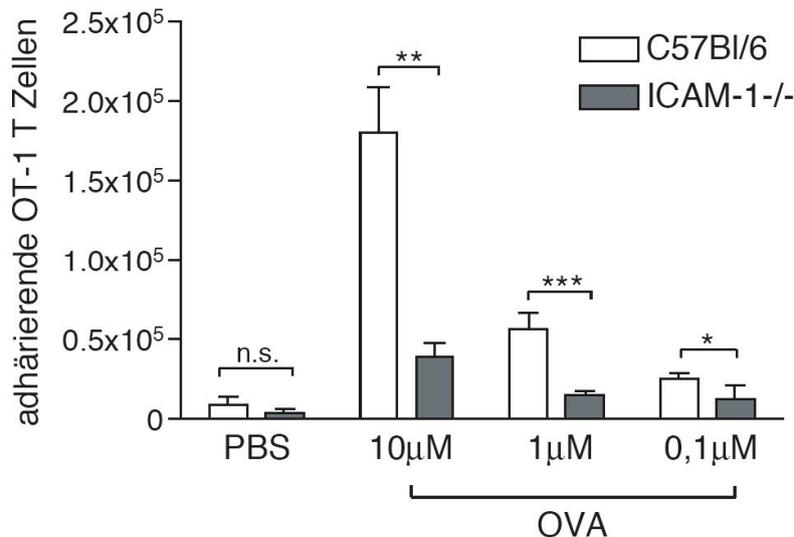
Die deutliche Reduktion der Länge und der Distanz der Migrationsstrecke, als auch der dynamische Phänotyp mit der Bildung von Zellausläufern der CD8 T-Zellen ist spezifisch für die Interaktion mit LSEC und konnte bei keiner der verglichenen Zelltypen beobachtet werden, obwohl alle untersuchten antigenpräsentierenden Zellen vergleichbare Mengen an H2-K<sup>b</sup> exprimierten (Abb. 4.3c).



**Abbildung 4.3: Migration naiver CD8 T-Zellen auf kreuzpräsentierenden LSEC. (a,b)** Naive OT-1 CD8 T-Zellen wurden in Anwesenheit von 0,5 mg/ml OVA, 1 µM SIINFEKL, oder ohne Antigen auf LSEC, DC2.4 und C57 kultiviert und für 60 Min. gefilmt. Die Länge des Migrationsweges und die zurückgelegte Distanz der einzelnen Zellen wurden mit Hilfe des CellR Programms (Olympus) ermittelt. **(c)** Durchflusszytometrische Analyse der Expression von H2-K<sup>b</sup> auf LSEC, C57 und DC2.4. Die Werte sind +/- SEM (Standard Error of the Mean, Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001).

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Migrations-Stopp der CD8 T-Zellen auf antigenpräsentierenden LSEC (Film b) zu einer erhöhten Adhäsion führt, wurden naive OT-1 CD8 T-Zellen mit OVA-beladenen LSEC ko-kultiviert und nach vier Stunden die adhärennten CD8 T-Zellen quantifiziert. Es war eine deutlich erhöhte Anzahl an adhärennten CD8 T-Zellen auf OVA-präsentierenden LSEC zu beobachten, dabei

korrelierte die Anzahl an adhärierenden Zellen direkt mit der Menge an präsentiertem Antigen (Abb. 4.4). Des Weiteren ist das Adhäsionsmolekül ICAM-1 an der antigenspezifischen Interaktion beteiligt, da bei der Kultivierung naiver CD8 T-Zellen auf antigen-beladenen LSEC von ICAM-1<sup>-/-</sup> Tieren eine deutliche Reduktion an adhärierenden CD8 T-Zellen zu sehen ist (Abb. 4.4). ICAM-1 scheint demnach die antigenspezifische Interaktion zwischen LSEC und naiver CD8 T-Zelle zu stabilisieren.

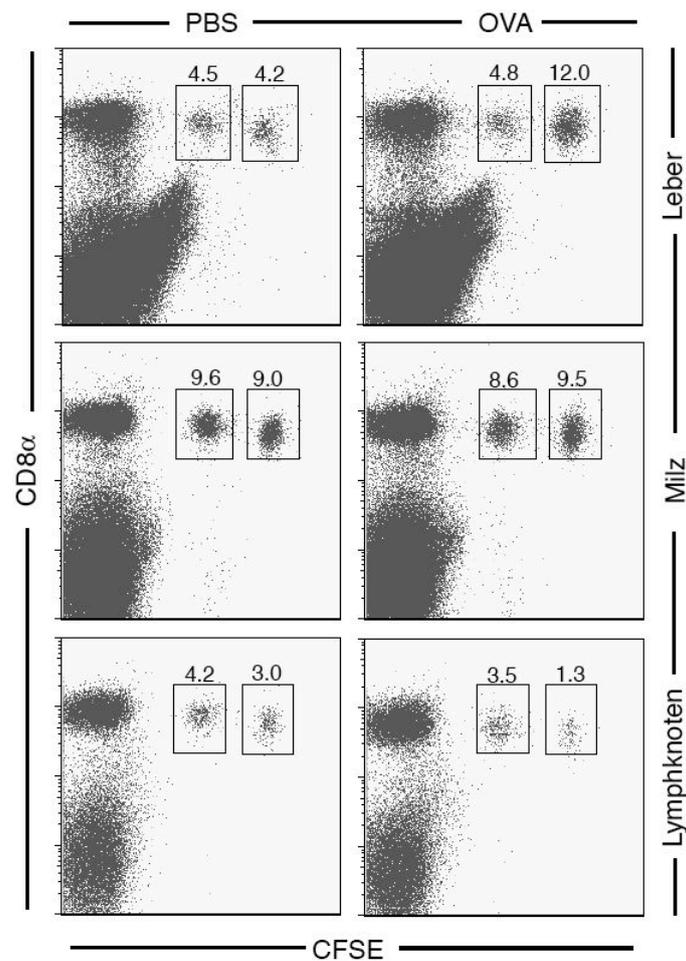


**Abbildung 4.4: Adhäsionsanalyse naiver CD8 T-Zellen auf kreuzpräsentierenden LSEC.** Naive OT-1 CD8 T-Zellen wurden auf wildtyp oder ICAM-1<sup>-/-</sup> LSEC kultiviert. Nach 4 Std. wurden nicht adhärierende Zellen abgespült und adhärierende Zellen mit 2 mM EDTA gelöst. Die Quantifizierung adhärrender Zellen erfolgte im Durchflusszytometer nach Zugabe von Kalibrierungsbeads zu jeder Probe und der Berechnung nach folgender Formel:  $Zellen_{Total} = (Beads_{Total} \times Zellen_{Probe}) / Beads_{Probe}$ . Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

#### 4.4 Die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen *in vivo* führt zu einer antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber

Mit der Beobachtung dass lösliches Antigen *in vivo* präferentiell von sinusoidalen Zellen in der Leber aufgenommen wurde (Abb. 4.1) und dass die Präsentation dieses Antigens zu einer verstärkten Adhäsion naiver CD8 T-Zellen auf LSEC *in vitro* führte (Abb. 4.4) stellte sich die Frage, wie sich antigenspezifische CD8 T-Zellen verhalten, wenn sie auf ihr Antigen auf LSEC *in vivo* treffen. Hierfür wurden C57Bl/6 Empfängermäusen OVA injiziert und zwei Stunden später CFSE-markierte antigenspezifische OT-1 CD8 T-Zellen

(CFSE<sup>hoch</sup>) zusammen mit wildtyp CD8 T-Zellen (CFSE<sup>niedrig</sup>) adoptiv transferiert. Nach vier Stunden war ein deutlicher Anstieg der antigenspezifischen CD8 T-Zellen (CFSE<sup>hoch</sup>) in der Leber von OVA-injizierten Tieren zu beobachten (Abb. 4.5). In der Milz hingegen waren die CFSE<sup>hoch</sup> und CFSE<sup>niedrig</sup> Zellen in nahezu gleichen Proportionen verteilt. Lediglich im Lymphknoten der OVA-behandelten Tiere war ein geringerer Anteil an antigenspezifischen (CFSE<sup>hoch</sup>) Zellen zu finden, was mit einer erhöhten Retention dieser Zellen in der Leber zu erklären ist.

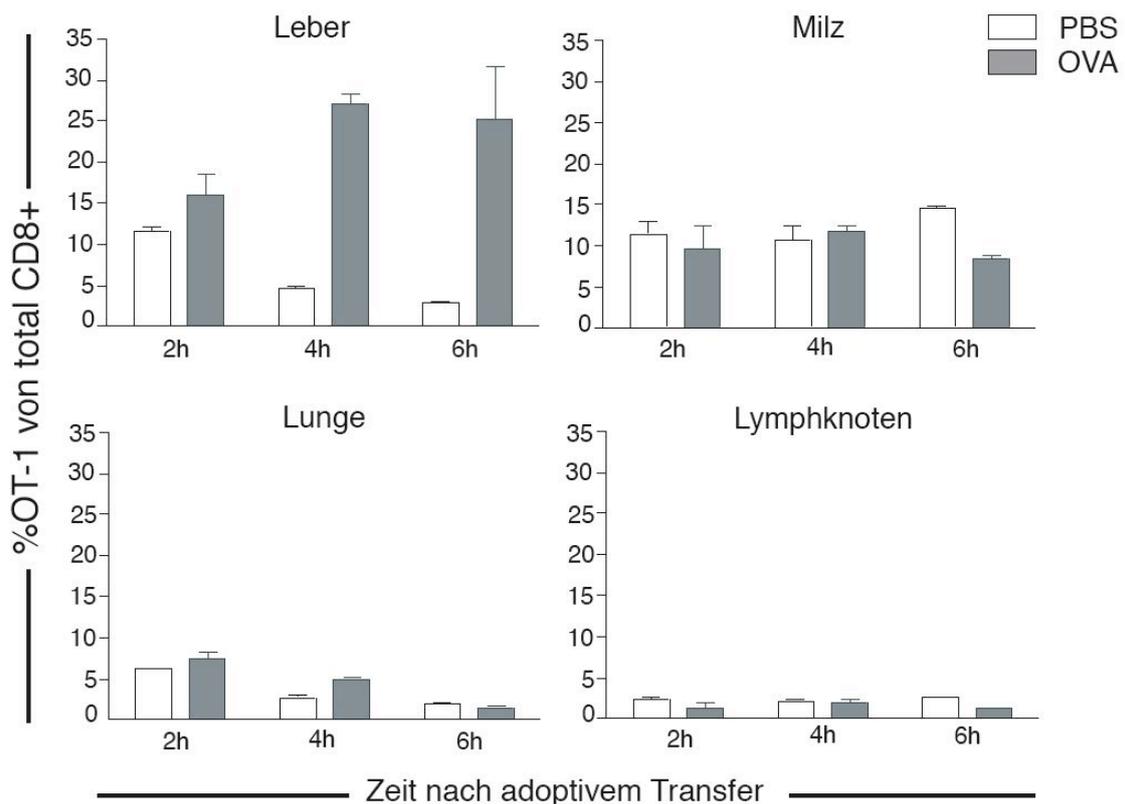


**Abbildung 4.5: Adoptiver Transfer von antigenspezifischen OT-1 CD8 T-Zellen und wildtyp CD8 T-Zellen *in vivo*.** Naive OT-1 CD8 T-Zellen (CFSE<sup>hoch</sup>) und naive wildtyp CD8 T-Zellen (CFSE<sup>niedrig</sup>) wurden im gleichen Verhältnis in C57Bl/6 injiziert, denen 2 Std. zuvor 2 mg OVA, bzw. PBS injiziert wurde. Nach 4 Std. wurden aus den einzelnen Organen die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil CFSE<sup>hoch</sup>, bzw. CFSE<sup>niedrig</sup> Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen ist angegeben.

In Abwesenheit von Antigen verteilten sich die antigenspezifischen und wildtyp CD8 T-Zellen in gleichem Maße auf die verschiedenen Organe (Abb. 4.5). Die schnelle

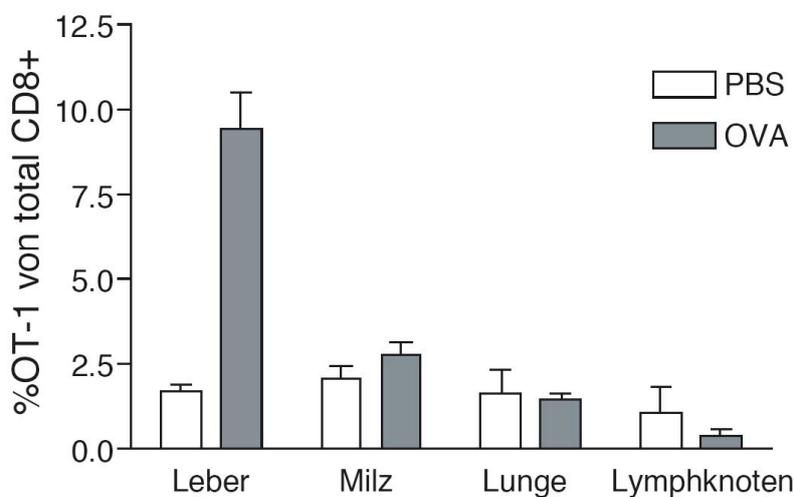
Aufnahme und Präsentation des Antigens und die darauffolgende Adhäsion von naiven CD8 T-Zellen in der Leber scheinen demnach die langsamere Antigenaufnahme und dadurch verzögerte Adhäsion der CD8 T-Zellen im Lymphknoten und der Milz zu übertreffen

Betrachtet man die Kinetik der antigenspezifischen Akkumulation naiver OT-1 CD8 T-Zellen in der Leber, so war bereits zwei Stunden nach dem adoptivem Transfer eine vermehrte Adhäsion in OVA-injizierten Tieren zu beobachten und diese nahm nach vier und sechs Stunden weiter zu (Abb. 4.6). Weder in den lymphoiden Organen Milz und Lymphknoten, noch in der Lunge war eine antigenspezifische Retention naiver CD8 T-Zellen zu diesen Zeitpunkten zu sehen, was vermuten lässt, dass die Aufnahme und die Kreuzpräsentation von Antigen in der Leber gegenüber den sekundären lymphatischen Organen dominierte.



**Abbildung 4.6: Kinetik der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber.** Naive OT-1 CD8 T-Zellen wurden in C57Bl/6 Empfängermäuse adoptiv transferiert, denen 2 Std. zuvor 2 mg OVA bzw. PBS injiziert wurde. Nach 2, 4 und 6 Std. wurden aus den einzelnen Organen die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil OT-1 T-Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen ist gezeigt.

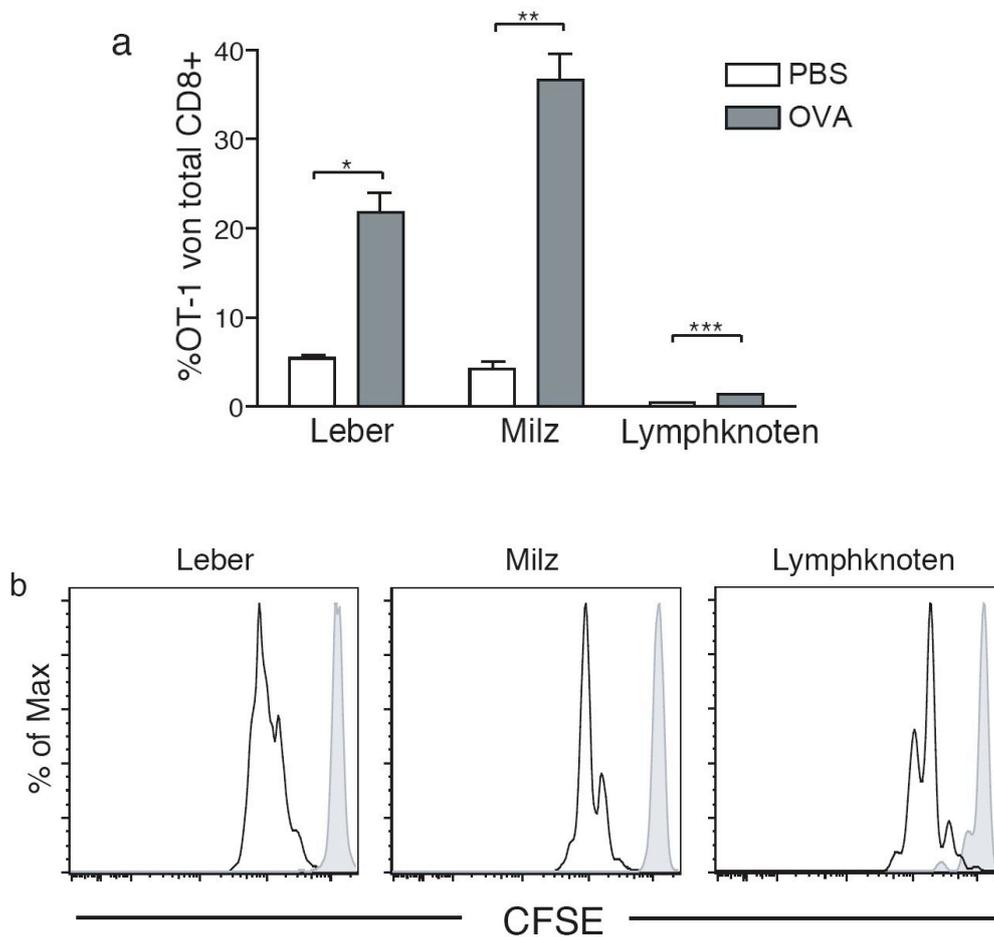
Der adoptive Transfer naiver CD8 T-Zellen über einen längeren Zeitraum sollte die Frage klären, wie lange die naiven CD8 T-Zellen in der Leber adhäreren. Dabei zeigten OVA-behandelte Tiere auch noch 24 Std. (Abb. 4.7) und 48 Std. (Abb. 4.8a) nach dem adoptivem Transfer eine erhöhte Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber. Allerdings war zum Zeitpunkt von 48 Std. nach dem adoptiven Transfer zusätzlich eine verstärkte Adhäsion der CD8 T-Zellen auch in der Milz und im Lymphknoten zu sehen und anhand der CFSE-Verdünnung war erkennbar, dass sich bereits proliferierte CD8 T-Zellen in diesen drei Organen befanden (Abb. 4.8b).



**Abbildung 4.7: Adoptiver Transfer naiver CD8 T-Zellen über 24 Std.** Naive CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen wurden in C57Bl/6 Empfängermäuse adoptiv transferiert, denen 2 Std. zuvor 2 mg OVA bzw. PBS injiziert wurde. Nach 24 Std. wurden aus den einzelnen Organen die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil OT-1 T-Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen ist gezeigt.

Die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen *in vivo* führt demnach zu einer innerhalb weniger Stunden eintretenden antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber, welche bis zu 48 Std. zu beobachten ist und schließlich in der Proliferation dieser Zellen resultiert. Zu frühen Zeitpunkten dominiert hierbei die Retention in der Leber, was mit einer sehr schnellen Aufnahme und Präsentation des Antigens zu erklären ist. Zum späteren Zeitpunkt von 48 Std. ist eine erhöhte Akkumulation naiver CD8 T-Zellen auch in der Milz und im Lymphknoten zu sehen, wobei ungeklärt bleibt, ob diese Adhäsion naiver CD8 T-Zellen durch die verspätete Präsentation von Antigen in den sekundären

lymphatischen Organen bedingt ist, oder ob in der Leber stimulierte Zellen auswandern und in die Milz und den Lymphknoten migrieren.

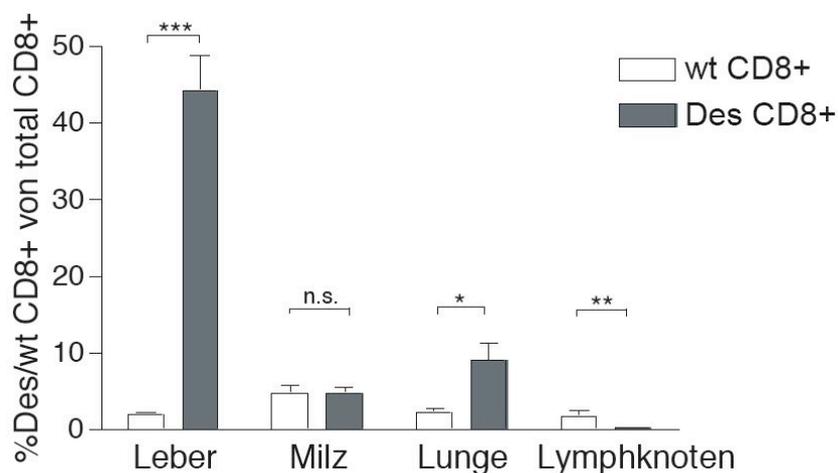


**Abbildung 4.8: Adoptiver Transfer naiver CD8 T-Zellen über 48 Std.** Naive CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen wurden in C57Bl/6 Empfängermäuse adoptiv transferiert, denen 2 Std. zuvor 2 mg OVA bzw. PBS injiziert wurde. Nach 48 Std. wurden aus den einzelnen Organen die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(a)** Der Anteil OT-1 CD8 T-Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen und **(b)** das Proliferationsprofil der CFSE<sup>+</sup> Zellen von einem OVA-behandelten (schwarze Linie) und einem PBS-behandelten (grau, gefülltes Histogramm) Tier sind repräsentativ gezeigt. Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

#### 4.5 Die Präsentation von endogenem Antigen resultiert ebenfalls in einer hepatischen Akkumulation naiver CD8 T-Zellen

Die Aufnahme und Kreuzpräsentation von löslichem Antigen findet in der Leber sehr rapide statt und übertrifft die Antigenpräsentation in sekundären lymphatischen Organen, was zu einer erhöhten Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber führt (Abb. 4.6). Um zu untersuchen, ob eine vermehrte Adhäsion naiver CD8 T-Zellen auch unabhängig von der schnellen präferentiellen Antigenaufnahme in der Leber auftritt, wurde ein System gewählt, in dem die CD8 T-Zellen ein endogen exprimiertes Antigen erkennen.

DesTCR transgene CD8 T-Zellen sind spezifisch für mit endogenem Peptid beladenes H-2K<sup>b</sup> und wurden zusammen mit differentiell CFSE-markierten wildtyp CD8 T-Zellen adoptiv in H-2K<sup>b</sup> exprimierende C57Bl/6 Mäuse transferiert. Nach vier Stunden war eine starke Akkumulation der antigenspezifischen DesTCR CD8 T-Zellen in der Leber und zu einem geringeren Ausmaß auch in der Lunge zu sehen (Abb. 4.9). In der Milz waren beide CD8 T-Zell Populationen zu gleichen Anteilen zu finden, während im Lymphknoten ein geringerer Teil an DesTCR CD8 T-Zellen vorhanden war, was wiederum mit der erhöhten Retention dieser Zellen in der Leber zu erklären ist.



**Abbildung 4.9: Adoptiver Transfer von antigenspezifischen DesTCR CD8 T-Zellen und wildtyp CD8 T-Zellen *in vivo*.** Naive wildtyp CD8 T-Zellen (CFSE<sup>hoch</sup>) und naive H-2K<sup>b</sup>-spezifische DesTCR CD8 T-Zellen (CFSE<sup>niedrig</sup>) wurden im gleichen Verhältnis in C57Bl/6 injiziert. Nach 4 Std. wurden aus den einzelnen Organen die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil CFSE<sup>hoch</sup> bzw. CFSE<sup>niedrig</sup> Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen ist gezeigt. Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\*p $\leq$  0.05, \*\*p $\leq$  0.01, \*\*\*p $\leq$  0.001).

Folglich akkumulieren naive CD8 T-Zellen präferentiell in der Leber, selbst wenn das Antigen ubiquitär in allen Organen exprimiert wird. Jedoch lässt die ubiquitäre Präsentation von Antigen keine Aussage darüber zu welche Zellen in der Leber für die Retention der CD8 T-Zellen verantwortlich sind, da auch Zellen welche nicht in der Lage sind lösliches Antigen kreuzzupräsentieren für die Adhäsion von DesTCR CD8 T-Zellen in Frage kommen.

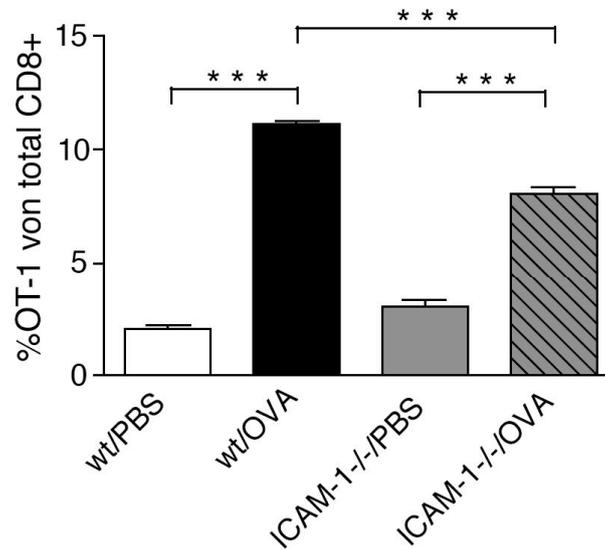
#### **4.6 ICAM-1 trägt zur antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber bei**

Die Zell-Zell Interaktion zwischen T-Zelle und APC beruht auf der Ausbildung einer immunologischen Synapse, in der Adhäsionsmoleküle und T-Zellrezeptorkomplex in charakteristischen Regionen, den so genannten SMACs<sup>33</sup> angeordnet sind (Grakoui et al., 1999). In den verschiedenen Regionen von T-Zellrezeptor und Adhäsionsmolekülen werden Signale generiert, die gemeinsam zur T-Zell Aktivierung beitragen (Dustin, 2001). Die Bindung des T-Zellrezeptors an MHC Klasse I ist ausschlaggebend für die antigenspezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber, da in Abwesenheit dieser spezifischen Interaktion keine vermehrte intrahepatische Akkumulation naiver CD8 T-Zellen auftrat (Abb. 4.5 und 4.9). Um die Beteiligung von Adhäsionsmolekülen an der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber zu charakterisieren, wurden mit Hilfe blockierender Antikörper, spezifischer Inhibitoren und genetischer knockout Tiere verschiedene Moleküle untersucht.

ICAM-1 wurde bei der antigenspezifischen Interaktion zwischen CD8 T-Zelle und LSEC hochreguliert (Abb. 4.2) und die Ko-Kultur *in vitro* ergab eine deutliche Reduktion der adhärenenden CD8 T-Zellen auf ICAM-1<sup>-/-</sup> LSEC im Vergleich zu wildtyp LSEC (Abb. 4.4), wodurch ICAM-1 einen potentiellen Kandidaten für die Beteiligung an der Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber darstellt. Der adoptive Transfer naiver OT-1 CD8 T-Zellen in ICAM-1<sup>-/-</sup> Tiere zeigte ebenfalls eine Reduktion der antigenspezifischen Adhäsion im Vergleich zum Transfer in C57Bl/6 Empfängertiere, jedoch umfasste hier die Reduktion im Gegensatz zur Situation *in vitro* nur ca. 30% (Abb. 4.10). Da keine komplette Inhibition der Retention naiver CD8 T-Zellen auftrat, wies diese Reduktion der antigenspezifischen Akkumulation lediglich auf eine Beteiligung von ICAM-1 bei der Interaktion hin. Es war aber ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl naiver CD8 T-

<sup>33</sup> engl.: supramolecular activation complex.

Zellen in den Lebern der ICAM-1<sup>-/-</sup> Tiere zu sehen sobald Antigen präsentiert wurde, was eine Beteiligung weiterer Moleküle an der Adhäsion vermuten ließ.



**Abbildung 4.10: Adoptiver Transfer naiver OT-1 CD8 T-Zellen in ICAM-1<sup>-/-</sup> Empfängermause.**

Naive OT-1 CD8 T-Zellen wurden in ICAM-1<sup>-/-</sup> bzw. C57Bl/6 Mäuse adoptiv transferiert, denen 2 Std. zuvor 2 mg OVA bzw. PBS injiziert wurde. Nach 48 Std. wurden aus der Leber die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil OT-1 T-Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen ist gezeigt. Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\*p $\leq$  0.05, \*\*p $\leq$  0.01, \*\*\*p $\leq$  0.001).

Neben ICAM-1 wurde auch VCAM-1 (CD106) bei der antigenspezifischen Interaktion mit naiven CD8 T-Zellen hochreguliert. Jedoch ergaben Versuche mit blockierenden Antikörpern gegenüber VCAM-1 weder alleine, noch in Kombination mit ICAM-1 Antikörpern eine Beteiligung dieses Moleküls an der Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber (Tab. 4.1).

Cytohesine sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für kleine ADP-Ribosylierungsfaktoren und spielen bei der Adhäsion von Zellen eine entscheidende Rolle (Geiger et al., 2000; Kolanus, 2007). Cytohesin-1 ist ein spezifischer Interaktionspartner der  $\beta$ 2-Untereinheit (CD18) des Intergrins LFA-1 (Kolanus et al., 1996), und die Interaktion von Cytohesin-1 mit CD18 reguliert die Affinität von LFA-1 gegenüber seinem Liganden ICAM-1. Mit Hilfe des Inhibitors von Cytohesinen 20H3

sollte deren Beteiligung an der antigenspezifischen Adhäsion in der Leber überprüft werden. Jedoch führte die Blockade von Cytohesinen durch 20H3 weder zu einer Reduktion der Adhäsion naiver CD8 T-Zellen auf LSEC *in vitro*, noch zu einer reduzierten Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber *in vivo* (Tab. 4.1).

Ziel Molekül	Inhibitor/Knockout	Versuch	Effekt
ICAM-1	Antikörper	<i>in vitro</i> Adhäsion	-
ICAM-1	ICAM-1 <sup>-/-</sup>	Adoptiver Transfer	Reduktion ca. 30%
VCAM-1	Antikörper	Adoptiver Transfer	-
ICAM-1+VCAM	Antikörper	Adoptiver Transfer	-
ICAM-2	Antikörper	<i>in vitro</i> Adhäsion	-
L-SIGN (ICAM-2 auf CD8)	Antikörper	Adoptiver Transfer	-
LFA-1	Antikörper(Fab)	Adoptiver Transfer	-
Cytohesine	20H3	<i>in vitro</i> Adhäsion	-
Cytohesine	20H3	Adoptiver Transfer	-
VAP-1/SSAO	2-BEA	Adoptiver Transfer	-
Mannoserezeptor	Mannan	<i>in vitro</i> Migration	-
Mannoserezeptor	Mannan	Adoptiver Transfer	-
Chemokin Rezeptoren	PTX	<i>in vitro</i> Adhäsion	-
Chemokin Rezeptoren	PTX	Adoptiver Transfer	-

**Tabelle 4.1: Effekte der Inhibition unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle auf die intrahepatische antigenspezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen.** Durch den Einsatz von genetischen knockout Tieren, blockierenden Antikörpern und Inhibitoren wurde die Beteiligung verschiedener Moleküle an der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Angegeben sind das untersuchte Molekül, der eingesetzte Inhibitor, die Versuchsbedingungen und der Effekt auf die antigenspezifische Adhäsion der CD8 T-Zellen.

Des Weiteren wurde der Beitrag von LFA-1 an der Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber durch blockierende anti-LFA-1 Fab-Fragmente, als auch durch blockierende Antikörper gegen ICAM-2, einem weiteren von LSEC exprimierten Interaktionspartner für LFA-1, überprüft. Doch weder der Einsatz dieser Antikörper, noch die Vorbehandlung der CD8 T-Zellen mit anti-ICAM-2 Antikörpern, was dessen Bindung an das

Adhäsionsmolekül L-SIGN auf der LSEC verhindert, endete in einer Reduktion der antigenspezifischen Adhäsion (Tab. 4.1).

VAP-1<sup>34</sup> ist eine Aminooxidase, die Adhäsion und Transmigration von Lymphozyten auf humanen LSEC vermittelt (Lalor et al., 2002). Doch auch deren Inhibition mittels des chemischen Inhibitors 2-BEA<sup>35</sup> konnte keine Beteiligung dieses Moleküls bei der intrahepatischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen im murinen System nachweisen (Tab. 4.1).

Ferner wird der Mannoserezeptor von LSEC exprimiert und spielt als Ligand von L-Selektin auf Lymphozyten eine Rolle bei der Adhäsion an Endothelien (Irjala et al., 2001). Durch lösliches Mannan lässt sich der Rezeptor blockieren. Jedoch weder die Migration *in vitro*, noch die Adhäsion *in vivo* ließen sich durch Zugabe von Mannan beeinflussen und ermöglichte daher keine Aussage über die Beteiligung des Mannoserezeptors an der antigenspezifischen Adhäsion.

Chemokine spielen insofern eine Rolle bei der Adhäsion, als dass sie an der Aktivierung der Integrine beteiligt sind (Shamri et al., 2005) und außerdem die Migration von T-Zellen leiten (Schaerli and Moser, 2005). Chemokin Rezeptoren gehören zur Familie der Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren und sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt. Pertussis Toxin (PTX) verhindert die Wechselwirkung zwischen G-Protein und Rezeptor, wodurch der Einfluss der Chemokine auf die Adhäsion in der Leber untersucht werden konnte. Doch auch eine Vorbehandlung der naiven CD8 T-Zellen mit PTX führte weder zu einer Reduktion der antigenspezifischen Adhäsion *in vitro*, noch zu einer reduzierten Adhäsion naiver CD8 T-Zellen *in vivo*.

Die intrahepatische antigenspezifische Adhäsion wurde von keinem der hier getesteten Moleküle ausschließlich vermittelt, lediglich ICAM-1 wies eine Beteiligung an der Retention naiver CD8 T-Zellen auf. Demnach scheint die Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und MHC Klasse I der ausschlaggebende Faktor für die Adhäsion zu sein, was mit der Beobachtung einhergeht dass allein die Stimulation des T-Zellrezeptors zu einem Migrations-Stopp der T-Zelle führt (Dustin et al., 1997).

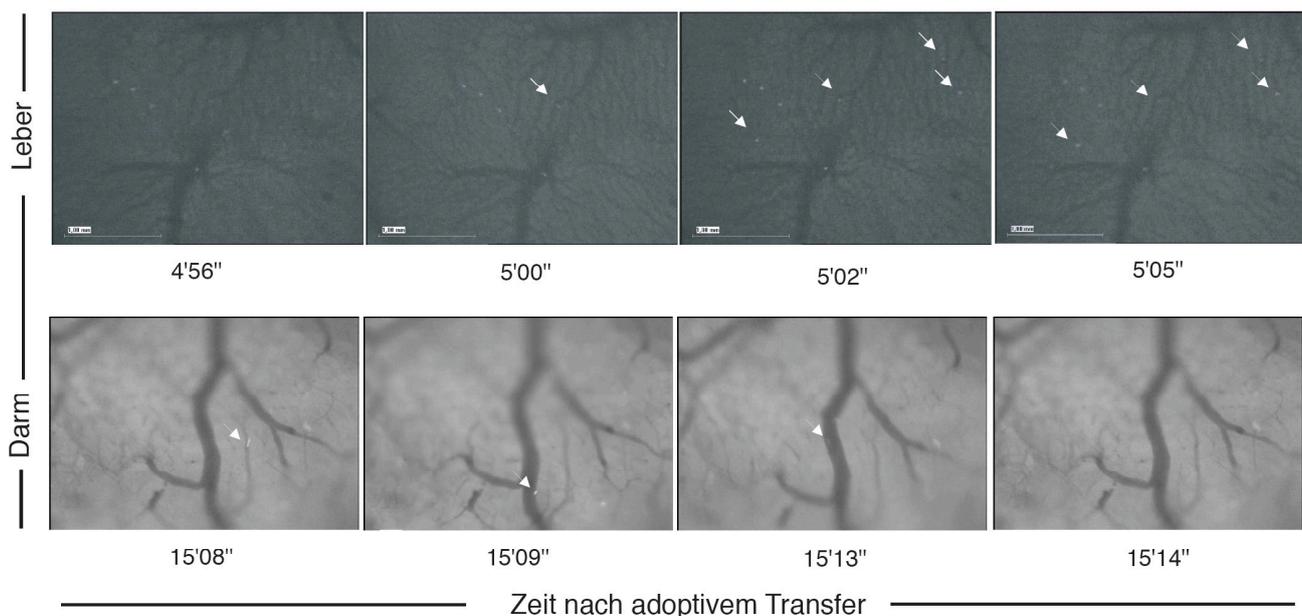
---

<sup>34</sup> *engl.*: vascular adhesion protein-1.

<sup>35</sup> 2-Bromoethylaminehydrobromid.

#### 4.7 Naive CD8 T-Zellen adhäreren unmittelbar im periportalen Bereich der Leber, keine Adhäsion naiver CD8 T-Zellen im Darm

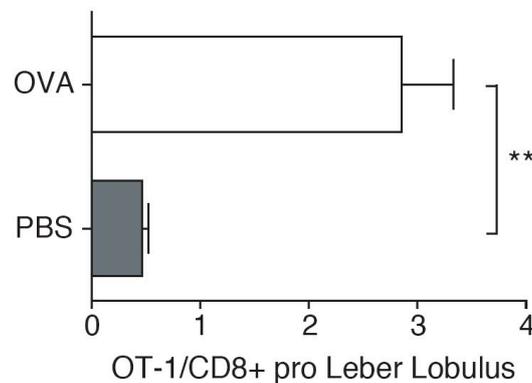
Eine erhöhte antigenspezifische Adhäsion in der Leber wurde schon in einem kurzen Zeitraum von nur zwei Stunden nach adoptivem Transfer der CD8 T-Zellen beobachtet (Abb. 4.6). Um diese schnell eintretende Adhäsion ohne maßgebliche Beteiligung von Adhäsionsmolekülen (Tab. 4.1) zu visualisieren und um auszuschließen, dass dieser beobachteten Adhäsion eine vorherige Aktivierung in einem anderen Organ vorausging, wurde die Retention in der Leber direkt im lebenden Tier mit Hilfe der *intravital* Mikroskopie verfolgt. Naive CFSE-markierte CD8 T-Zellen wurden in die OVA-behandelte Maus injiziert und waren innerhalb weniger Minuten in der Leber sichtbar (Abb. 4.11). Die Adhäsion dieser Zellen erfolgte ohne vorheriges Rollen am Endothel und fand bevorzugt im periportalen Bereich des Leber Lobulus statt (Abb. 4.11).



**Abbildung 4.11:** : *Intravital* mikroskopische Analyse der Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in Leber und Darm. Naive CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen wurden adoptiv in OVA-behandelte C57Bl/6 Mäuse transferiert und deren Verteilung innerhalb weniger Min. mittels *intravital* Mikroskopie visualisiert. Einzelbilder mit Angabe des Zeitpunktes nach adoptivem Transfer sind gezeigt. Die weißen Pfeile weisen auf neu adhätierende CFSE+ Zellen in der Leber, bzw. passierende CFSE+ Zellen im Darm hin.

Im Darm desselben Tieres waren die transferierten Zellen ebenfalls aufzufinden, jedoch passierten diese den Darm mit dem Blutstrom und es konnte keine Adhäsion dieser Zellen in den Gefäßen beobachtet werden. Die Lunge und die Milz konnten auf Grund ihrer Nähe zum Zwerchfell und der daraus resultierenden unruhigen Bildgebung nicht visualisiert werden, weshalb in diesem Versuch der Darm als Vergleichsorgan gewählt wurde.

Die Auszählung adhätierender Zellen pro Lobulus vier Stunden nach adoptivem Transfer zeigte ebenfalls eine signifikant erhöhte Retention naiver CD8 T-Zellen in den Lebern OVA-injizierten Tiere (Abb. 4.12) und eine deutliche Lokalisation der Zellen im periportal Bereich.

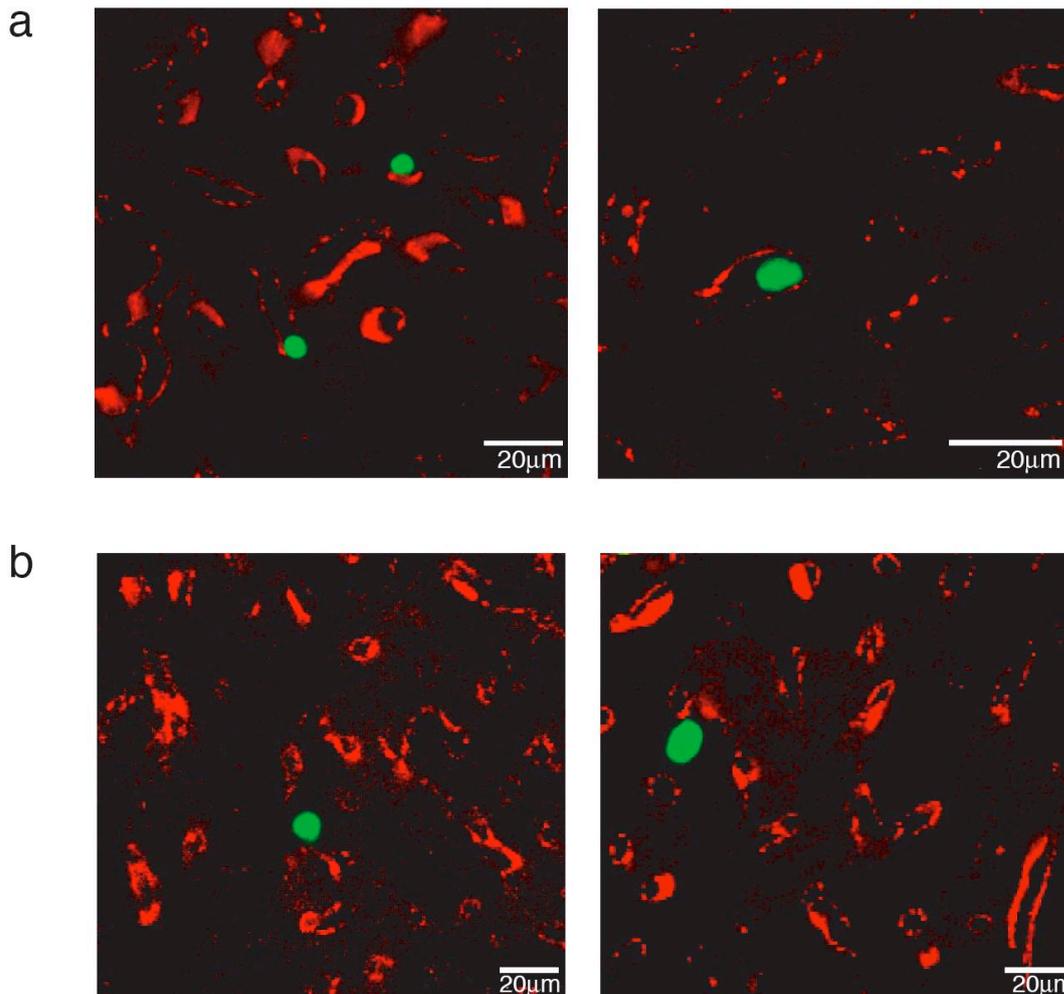


**Abbildung 4.12: *Intravital* mikroskopische Analyse der Adhäsion naiver T-Zellen 4 Std. nach adoptivem Transfer.** Naive CFSE-markierte OT-1 T-Zellen wurden adoptiv in OVA-, bzw. PBS-behandelte C57Bl/6 Mäuse transferiert und deren Adhäsion vier Stunden später mittels *intravital* Mikroskopie analysiert. Die Anzahl fest adhätierender CFSE+ Zellen pro Leberlobulus ist gezeigt. Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

#### 4.8 Naive und aktivierte CD8 T-Zellen unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und ihrem Adhäsionsverhalten in der Leber

Der Kontakt zwischen aktivierter T-Zelle und Endothel führt für gewöhnlich zur Transmigration und Extravasation dieser Zellen ins unterliegende Gewebe (Ley et al., 2007; Sancho et al., 1999). Um das Transmigrationsverhalten von naiven und aktivierten CD8 T-Zellen in der Leber zu untersuchen, wurden Leberschnitte von OVA-behandelten

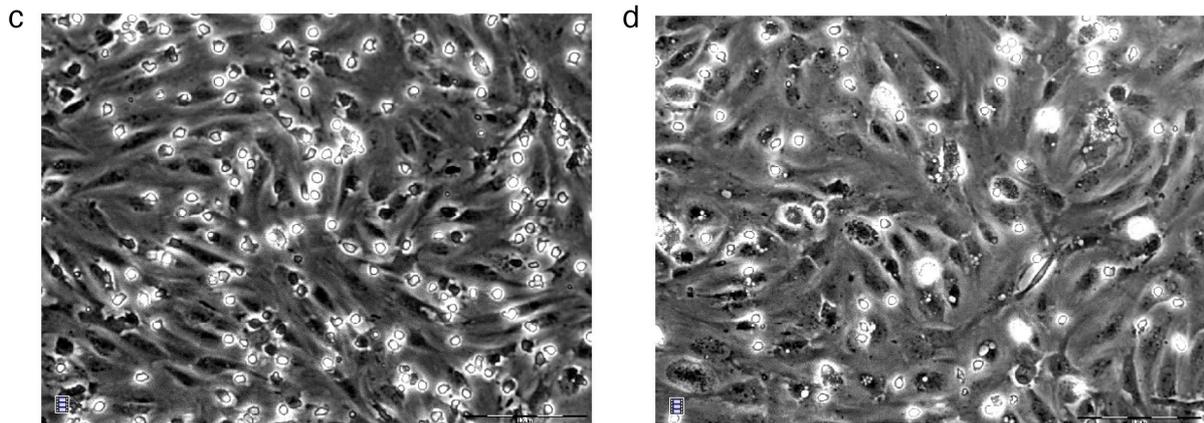
Mäusen, die naive CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen erhielten mit solchen verglichen, denen aktivierte CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen injiziert wurden. Naive CD8 T-Zellen wiesen dabei im Vergleich zu aktivierten CD8 T-Zellen eine unterschiedliche Lokalisation auf: während naive CD8 T-Zellen überwiegend in den Sinusoiden adhärten (Abb. 4.13a), transmigrierten aktivierte CD8 T-Zellen über die Endothelschicht und akkumulierten im Parenchym der Leber (Abb. 4.13b).



**Abbildung 4.13: Intrahepatische Lokalisation naiver und aktivierter antigenspezifischer CD8 T-Zellen.** In OVA-behandelte C57Bl/6 Empfängermäuse wurden (a) naive oder (b) aktivierte CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen adoptiv transferiert. Nach 4 Std. wurden 40 µg OVA-TxRed *i.v.* appliziert, die Lebern fixiert und Leberschnitte im konfokalen Mikroskop analysiert.

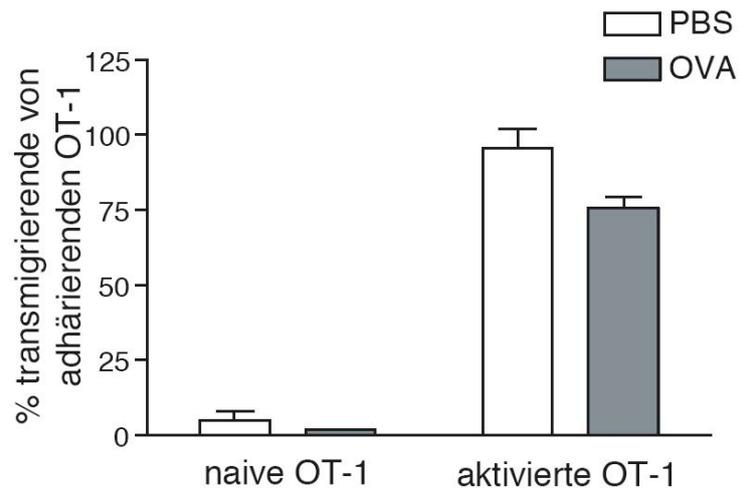
Das Transmigrationsverhalten naiver CD8 T-Zellen auf LSEC wurde darüber hinaus mit Experimenten in einer Parallel-Flusskammer analysiert. Hierbei wurden aktivierte, bzw.

naive CD8 T-Zellen unter physiologischen Blutflussgeschwindigkeiten der Leber über LSEC geleitet, somit die Situation in den Sinusoiden *in vivo* nachgeahmt und die Transmigration über einen Zeitraum von 60 Min. beobachtet und gefilmt. Es zeigte sich hierbei erneut, dass aktivierte CD8 T-Zellen unter die Endothelschicht transmigrierten (Film c), während naive CD8 T-Zellen auf der Oberfläche der LSEC adhärten (Film d).



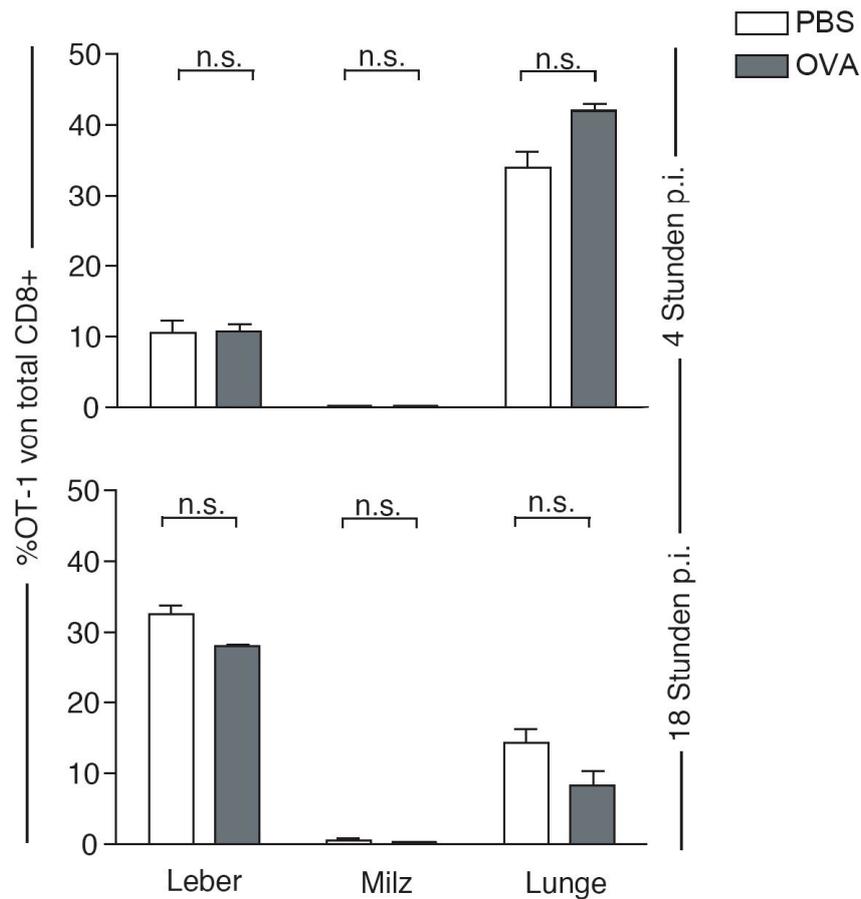
**Film (c) und (d): Lebend-Zell Mikroskopie der Transmigration von aktivierten und naiven CD8 T-Zellen auf kreuzpräsentierenden LSEC.** Aktivierte (Film c) bzw. naive (Film d) OT-1 CD8 T-Zellen wurden mit 0,02 ml/Min. über OVA-beladene LSEC in einer Parallelflusskammer geleitet, und wenige Min. nach Zugabe der CD8 T-Zellen die Videoaufnahme gestartet. Die Aufzeichnung erfolgte alle 10 Sek. über einen Zeitraum von 60 Min. Transmigrierende Zellen erscheinen dunkel unter der Endothelschicht, während nicht-transmigrierte Zellen hell auf der Oberfläche der LSEC sichtbar sind.

Die Anzahl transmigrierender CD8 T-Zellen innerhalb der adhärrierenden CD8 T-Zellen wurde ermittelt und ergab eine nahezu 100%ige Transmigrationsrate der aktivierten CD8 T-Zellen, während nur ein geringer Teil der naiven CD8 T-Zellen transmigrierten (Abb. 4.14). Dabei war die Transmigrationsrate unabhängig von der Präsentation des Antigens, aktivierte CD8 T-Zellen transmigrierten in gleichem Maße unter OVA-beladene LSEC wie unter PBS-behandelte LSEC (Abb. 4.14).



**Abbildung 4.14: Analyse der Transmigration naiver und aktivierter CD8 T-Zellen auf LSEC in einer Parallelfusskammer.** LSEC wurden in einer Parallelfusskammer mit 0,5 mg/ml OVA oder in Abwesenheit von Antigen kultiviert. Naive bzw. aktivierte OT-1 CD8 T-Zellen wurden mit 0,02 ml/Min. über die LSEC geleitet, für 60 Min. gefilmt und die Anzahl adhärerender und transmigrierender Zellen ermittelt. Dargestellt ist der Prozentsatz transmigrierender Zellen innerhalb der adhärerenden Zellen.

Von Mehal et al. wurde bereits gezeigt, dass das spezifische Mikromilieu in der Leber zu einer Akkumulation aktivierter CD8 T-Zellen führt (Mehal et al., 1999). Nach dem beobachteten Unterschied im Transmigrationsverhalten naiver und aktivierter antigenspezifischer CD8 T-Zellen in der Leber (Abb. 4.14) sollte nun das Adhäsionsverhalten aktivierter CD8 T-Zellen untersucht werden. Interessanterweise ergab der adoptive Transfer aktivierter CD8 T-Zellen hierbei ebenfalls einen Unterschied zu den naiven CD8 T-Zellen in der Leber, da aktivierte CD8 T-Zellen im Vergleich zu naiven CD8 T-Zellen unabhängig vom Antigen in der Leber adhärten und in gleichem Umfang in OVA-injizierten und in PBS-behandelten Tieren akkumulierten (Abb. 4.6 und 4.15). Die Adhäsion aktivierter CD8 T-Zellen in der Leber nahm nach vier bis 18 Stunden zu. Auch in der Lunge waren aktivierte CD8 T-Zellen in hoher Anzahl zu finden, während keine Akkumulation dieser Zellen in der Milz zu sehen war.

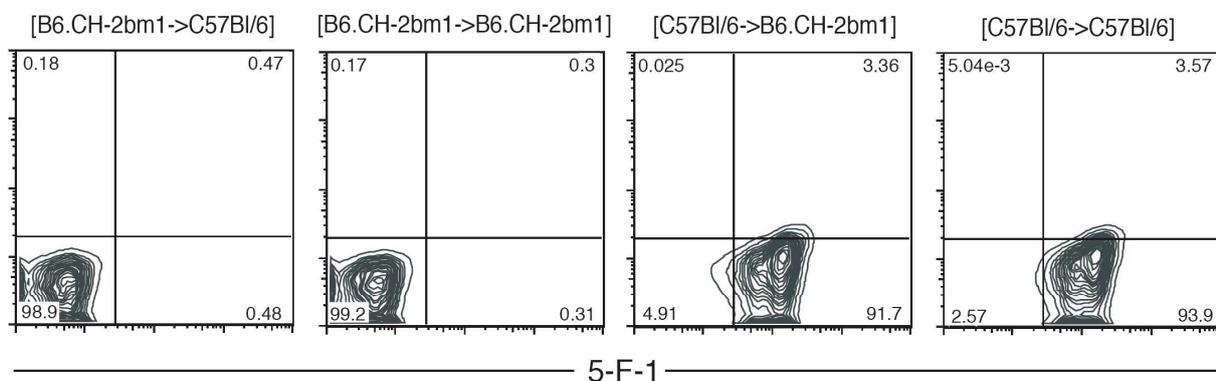


**Abbildung 4.15: Adoptiver Transfer aktivierter OT-1 CD8 T-Zellen.** Aktivierte OT-1 CD8 T-Zellen wurden in OVA-, bzw. PBS-behandelte C57Bl/6 Mäuse adoptiv transferiert. Nach 4 und nach 18 Std. wurden Lymphozyten aus der Leber, Milz und Lunge isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  gefärbt, und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Anteil OT-1 CD8 T-Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen. Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

#### 4.9 LSEC sind die entscheidende Zellpopulation für die antigenspezifische Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber

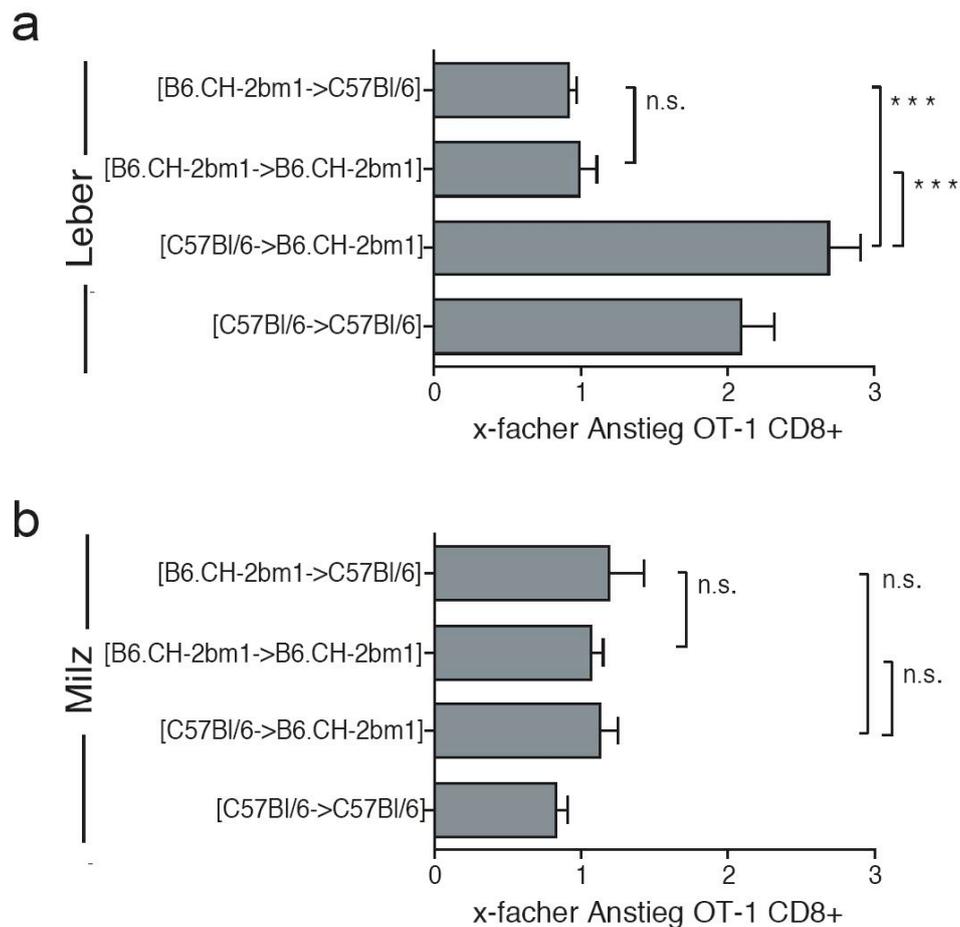
Naive CD8 T-Zellen akkumulieren innerhalb weniger Stunden antigenspezifisch in der Leber (Abb. 4.6). Um zu untersuchen, ob hierbei neben LSEC weitere antigenpräsentierende Zellen, d.h. myeloide knochenmarksabhängige Immunzellen eine Rolle spielen, wurden Knochenmarkschimären aus C57Bl/6 und B6.CH-2<sup>bm1</sup> Mäusen generiert. B6.CH-2<sup>bm1</sup> Mäuse tragen eine Punktmutation im MHC Klasse I Molekül (H2-K<sup>b</sup>), so dass das OVA Peptid SIINFEKL nicht binden und somit nicht präsentiert werden

kann. In den Chimären waren entweder organ-sässige und nicht knochenmarksabhängige Zellen in der Lage das Antigen zu präsentieren ([B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> C57Bl/6]), oder aber knochenmarksabhängige Zellen konnten das Antigen präsentieren, aber nicht organ-sässige Zellen ([C57Bl/6 -> B6.CH-2<sup>bm1</sup>]). Zur Kontrolle wurden [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> B6.CH-2<sup>bm1</sup>] und [C57Bl/6 -> C57Bl/6] Chimären generiert, in denen jeweils alle Zellen, bzw. keine Zellpopulation das OVA Peptid präsentieren konnte. Die Rekonstitution des Knochenmarks wurde mit Hilfe des Antikörpers 5-F-1 überprüft, der an wildtyp C57Bl/6 H-2K<sup>b</sup> bindet, jedoch nicht an die mutierte Form H-2<sup>bm1</sup>. Die Färbung von peripherem Blut ergab eine >95%ige Rekonstitution der chimären Tiere nach 6 bis 8 Wochen (Abb. 4.16).



**Abbildung 4.16: Rekonstitution der Knochenmarkschimären.** [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> C57Bl/6], [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> B6.CH-2<sup>bm1</sup>], [C57Bl/6 -> B6.CH-2<sup>bm1</sup>] und [C57Bl/6 -> C57Bl/6] Knochenmarkschimären wurden generiert, 6-8 Wochen später peripheres Blut mit dem wildtyp- H2-K<sup>b</sup> spezifischen Antikörper 5-F-1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse von vier Beispieltieren sind gezeigt.

Eine erhöhte Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber nach adoptivem Transfer konnte nur in OVA-injizierten [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> C57Bl/6] und nicht in [C57Bl/6 -> B6.CH-2<sup>bm1</sup>] Chimären beobachtet werden (Abb. 4.17a). Dies bedeutet, dass organ-residente und nicht knochenmarksabhängige antigenpräsentierende Zellen bei der Retention naiver CD8 T-Zellen involviert sind. Es war keine erhöhte Retention naiver CD8 T-Zellen in den Milzen OVA-injizierter Tiere zu sehen (Abb. 4.17b), was wiederum mit der rapiden Antigenaufnahme in der Leber zu begründen ist, die vermutlich über die Antigenpräsentation in sekundären lymphatischen Organen dominierte (Abb. 4.1).



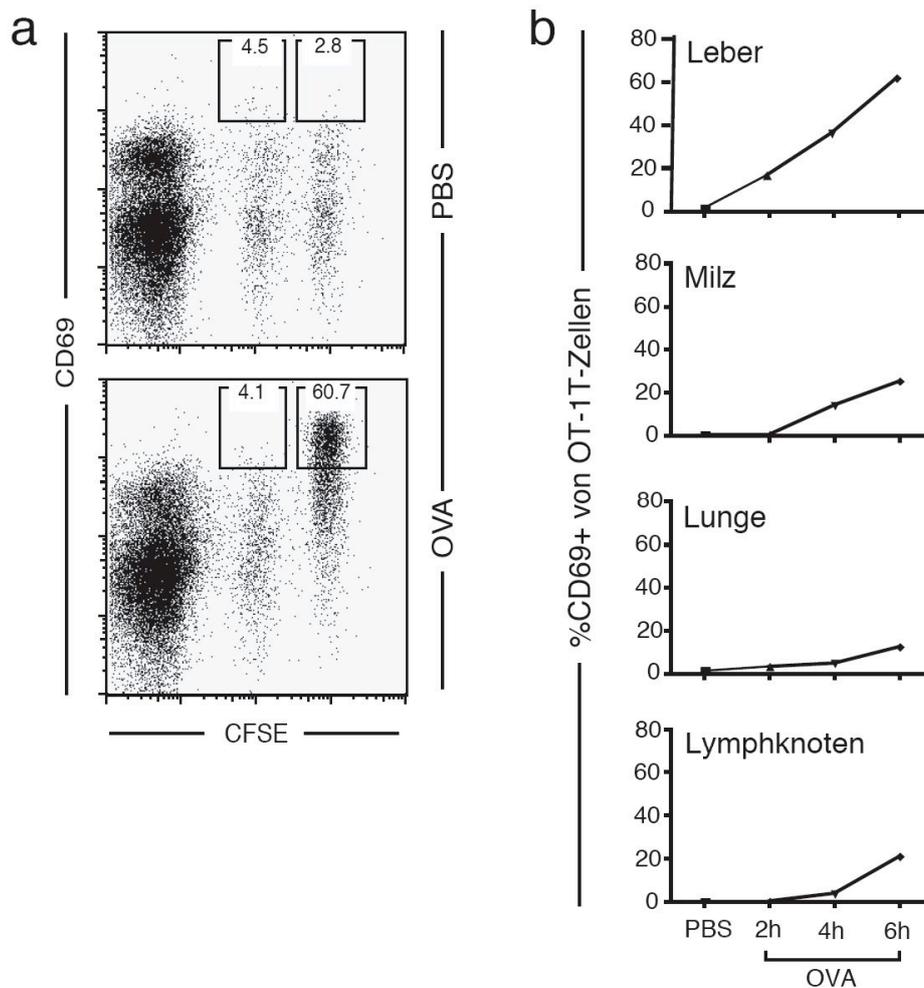
**Abbildung 4.17: Adoptiver Transfer naiver OT-1 CD8 T-Zellen in Knochenmarkschimären.** Naive OT-1 CD8 T-Zellen wurden in [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> C57Bl/6], [B6.CH-2<sup>bm1</sup>-> B6.CH-2<sup>bm1</sup>], [C57Bl/6 ->B6.CH-2<sup>bm1</sup>] und [C57Bl/6 -> C57Bl/6] adoptiv transferiert, denen 2 Std. zuvor 2 mg OVA bzw. PBS injiziert wurde. Nach 4 Std. wurden aus den einzelnen Organen die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anstieg OT-1 T-Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen in OVA-behandelten Tieren gegenüber PBS-injizierten Tieren in **(a)** Leber und **(b)** Milz ist dargestellt. Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

Die Beobachtung, dass knochenmarksabhängige Zellen wie Dendritische Zellen oder Kupffer Zellen offensichtlich nicht an der antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber beteiligt sind (Abb. 4.17a) und die Gegebenheit, dass weitere organresidente Zellen wie Hepatozyten nicht in der Lage sind lösliches Antigen kreuzpräsentieren (Limmer et al., 2000), lässt die Schlussfolgerung zu, dass nur

organ-residente LSEC das lösliche Antigen aufnehmen und kreuzpräsentieren und somit für die Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber verantwortlich sind.

#### **4.10 Die funktionellen Konsequenzen der antigenspezifische Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber**

Um die funktionellen Folgen der antigenspezifischen Akkumulation naiver CD8 T-Zellen in der Leber zu untersuchen, wurde der Aktivierungsgrad der adhätierenden CD8 T-Zellen überprüft. Die Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber führte zu einer antigenspezifischen Aktivierung der CD8 T-Zellen *in situ*, was durch eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 in den Lebern OVA-injizierter Tiere vier Stunden nach adoptivem Transfer zu sehen war (Abb. 4.18a). Hingegen wiesen sowohl wildtyp CD8 T-Zellen in OVA-behandelten Mäusen, als auch antigenspezifische OT-1 CD8 T-Zellen in unbehandelten Tieren keine erhöhte Expression von CD69 auf (Abb. 4.18a). Darüber hinaus war die spezifische Hochregulation von CD69 auf OT-1 CD8 T-Zellen zunächst nur in der Leber sichtbar und erst zu späteren Zeitpunkten in der Milz, der Lunge und dem Lymphknoten (Abb. 4.18b). Somit fand die initiale Stimulation der CD8 T-Zellen in der Leber statt und eine erhöhte Adhäsion durch eine vorhergehende Stimulation in den peripheren Organen und folgende Re-Zirkulation und Adhäsion in der Leber ließ sich ausschließen.



**Abbildung 4.18: Kinetik der Expression von CD69 auf adoptiv transferierten naiven CD8 T-Zellen *in vivo*.** Naive OT-1 T-Zellen (CFSE<sup>hoch</sup>) und wildtyp CD8 T-Zellen (CFSE<sup>niedrig</sup>) wurden im gleichen Verhältnis in C57Bl/6 Mäuse adoptiv transferiert, denen zuvor 2mg OVA, bzw. PBS injiziert wurde. Nach (a) 4 Std. bzw. (b) 2, 4 und 6 Std. wurden aus den einzelnen Organen die Lymphozyten isoliert, mit anti-CD8 $\alpha$  und anti-CD69 Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Prozentsatz (a) CD69 positiver Zellen innerhalb der CFSE<sup>hoch</sup> und CFSE<sup>niedrig</sup> Zellen in der Leber, bzw. (b) der CD69 positiven Zellen innerhalb der OT-1 CD8 T-Zellen in den unterschiedlichen Organen ist gezeigt.

Um die der initialen Stimulation in der Leber folgende Form der CD8 T-Zell Immunantwort zu charakterisieren, wurden [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> C57Bl/6] chimäre Tiere verwendet. Da in diesen Tieren die Antigenpräsentation auf LSEC in der Leber reduziert ist, lässt sich jegliche Stimulation der naiven CD8 T-Zellen durch knochenmarksabhängige antigenpräsentierende Zellen in der Leber oder anderen Organen ausschließen. Naive CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen wurden in [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> C57Bl/6] Chimären adoptiv transferiert, welche systemisch OVA *i.p.* erhielten,

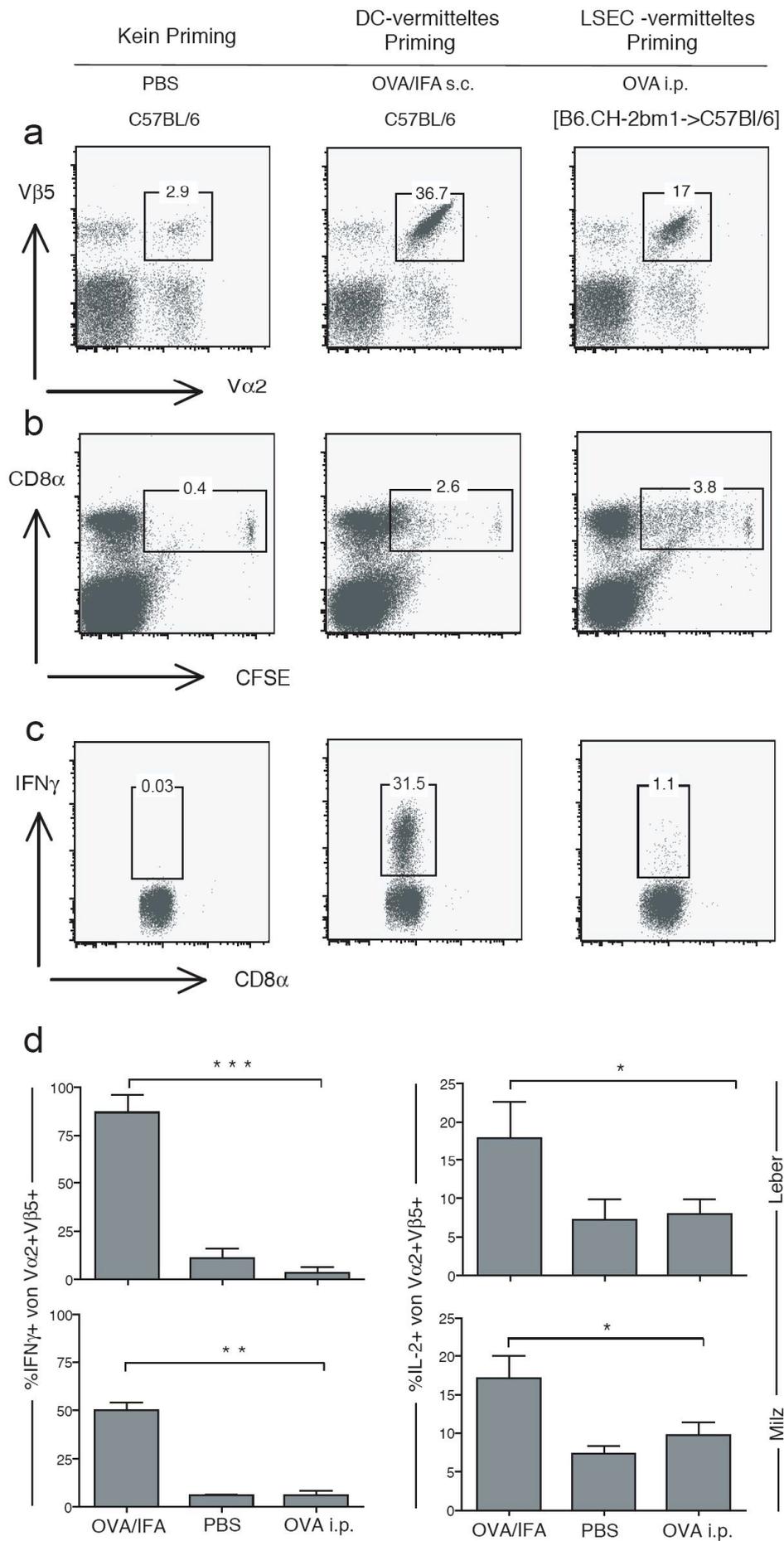
und in C57Bl/6 Mäuse, denen OVA unter aktivierenden Bedingungen (OVA/IFA<sup>36</sup>) appliziert wurde. Somit konnte das Ergebnis der CD8 T-Zell Stimulation durch LSEC mit der Aktivierung von CD8 T-Zellen durch Dendritische Zellen verglichen werden. Als Kontrolle wurden naive CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen in C57Bl/6 Mäuse in Abwesenheit des Antigens und somit unter naiven Bedingungen adoptiv transferiert.

Anhand der T-Zellrezeptor Färbung  $V\alpha 2V\beta 5$  und des CFSE-Profiles zeigte sich an Tag 4 nach adoptivem Transfer eine starke Expansion (Abb. 19a) und ebenso Proliferation (Abb. 4.19b) der DC- und LSEC-aktivierten OT-1 CD8 T-Zellen, während OT-1 Zellen in Abwesenheit vom Antigen weder expandierten noch proliferierten (Abb. 4.19a und 4.19b). Organ-residente LSEC sind demnach in der Lage, naive CD8 T-Zellen zu stimulieren und zu expandieren, wenn auch zu einem geringeren Maße als professionelle APC in OVA/IFA-injizierten Tieren. Die Isolation und nachfolgende antigenspezifische Restimulation durch OVA-beladene BM-DC<sup>37</sup> dieser Zellen ergab eine starke Produktion von IFN- $\gamma$  von den Zellen, die durch DC aktiviert wurden. Während durch LSEC aktivierte OT-1 CD8 T-Zellen, wie auch in Abwesenheit von Antigen transferierte OT-1 CD8 T-Zellen, keine Produktion von IFN- $\gamma$  aufwiesen (Abb. 4.19c). Dies bedeutet, dass naive OT-1 CD8 T-Zellen zwar durch organ-residente LSEC proliferierten und expandierten, aber letztendlich ein toleranter Phänotyp induziert wurde.

Eine genauere Analyse der  $V\alpha 2^+V\beta 5^+$  OT-1 CD8 T-Zellen zeigte, dass eine Aktivierung durch DC durch die Applikation von OVA/IFA zu einer IFN- $\gamma$ -Produktion von 85% der OT-1 Zellen und einer IL-2-Produktion von 18% der OT-1 Zellen in der Leber nach einer Restimulation *ex vivo* führt (Abb. 4.19d). Im Gegensatz dazu machten IFN- $\gamma$ - und IL-2-produzierende OT-1 Zellen nach antigenspezifischer Restimulation weniger als 10% der OT-1 Zellen aus, wenn die Stimulation durch organ-residente LSEC *in vivo* stattgefunden hat. LSEC-stimulierte CD8 T-Zellen, welche in die Milz migriert waren, wiesen ebenfalls eine reduzierte Fähigkeit zur Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-2 auf, was für eine hohe Stabilität des durch LSEC induzierten toleranten Phänotyps spricht (Abb. 4.19d).

<sup>36</sup> *engl.*: incomplete Freund's adjuvans.

<sup>37</sup> *engl.*: bone marrow-derived dendritic cells.



**Abbildung 4.19: Funktionelle Analyse der intrahepatisch adhärierenden CD8 T-Zellen.** In C57Bl/6 Mäuse und [B6.CH-2<sup>bm1</sup> -> C57Bl/6] Knochenmarkschimären wurden naive CFSE-markierte OT-1 CD8 T-Zellen adoptiv transferiert. Einen Tag später erhielten C57Bl/6 Mäuse OVA/IFA bzw. PBS, während den Knochenmarkschimären OVA *i.p.* appliziert wurde. Nach 4 Tagen wurden die Lymphozyten aus der Leber und der Milz isoliert, **(a,b)** mit CD8 $\alpha$ , V $\alpha$ 2, und V $\beta$ 5 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert oder **(c,d)** mit SIINFEKL-beladenen CD11c<sup>+</sup> BM-DC restimuliert, nach 5 Std. mit CD8 $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$  gefärbt und die intrazelluläre Zytokinproduktion durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist in **(a)** der Prozentsatz V $\alpha$ 2<sup>+</sup>V $\beta$ 5<sup>+</sup> OT-1 CD8 T-Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> Zellen, in **(b)** der Prozentsatz proliferierter CFSE<sup>+</sup> CD8 T-Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> Zellen und in **(c)** der Prozentsatz IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> Zellen. **(d)** Dargestellt ist der berechnete Prozentsatz IFN- $\gamma$  und IL-2<sup>+</sup> Zellen innerhalb der V $\alpha$ 2V $\beta$ 5<sup>+</sup> Zellen in Leber und Milz. Die Werte sind +/- SEM angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\*p $\leq$  0.05, \*\*p $\leq$  0.01, \*\*\*p $\leq$ 0.001).

Demzufolge führt die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC in der Leber zu einer antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen, welche letztendlich in der Expansion und einer stabilen Toleranzinduktion der CD8 T-Zellen resultiert.

## 5. Diskussion

Die Leber spielt bei der Induktion der peripheren Toleranz eine entscheidende Rolle. Dazu tragen die Eliminierung aktivierter T-Zellen und die aktive Tolerisierung von naiven T-Zellen bei (Bertolino et al., 1998; Huang et al., 1994; Thomson et al., 2002). Die sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) der Leber sind dabei von großer Bedeutung, da die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC zu einer Toleranz der CD8 T-Zellen führt (Limmer et al., 2000). Die Induktion von Toleranz beinhaltet den physischen Kontakt zwischen kreuzpräsentierenden LSEC und naiven CD8 T-Zellen, doch wie der Kontakt zwischen LSEC und naiver CD8 T-Zelle aus dem Blutstrom heraus zustande kommt war bisher ungeklärt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch LSEC zu einer antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber führt, auf die eine Stimulation *in situ* folgt und die letztendlich zur Toleranz der CD8 T-Zellen führt. Diese CD8 T-Zell Toleranz ist nicht durch eine klonale Deletion gekennzeichnet wie es für immature oder nicht-professionelle APC beschrieben ist (Probst et al., 2005), sondern folgt im Anschluss an eine Expansion der antigenspezifischen CD8 T-Zellen. Die toleranten Zellen weisen einen stabilen Phänotyp auf, der auch noch nach dem Verlassen der Leber zu beobachten ist.

Somit wurde hier erstmals der initiale Schritt der Toleranzinduktion in der Leber, nämlich die durch LSEC vermittelte antigenspezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen, charakterisiert.

### 5.1 Naive CD8 T-Zellen adhärieren antigenspezifisch auf kreuzpräsentierenden LSEC

Die Endothelzellen in der Leber haben die Aufgabe das Blut von einer großen Anzahl physiologischer und körperfremder Abfallstoffe, wie z.B. Polysacchariden, Proteinen, intrazellulären Makroproteinen und bakteriellen Produkten, zu bereinigen (Seternes et al., 2002; Smedsrod et al., 1990). Diese Produkte werden täglich in großen Mengen vom Körper abgegeben und effizient durch LSEC aufgenommen und degradiert. Durch die Injektion von fluoreszent markiertem Ovalbumin konnte gezeigt werden, dass auch dieses präferentiell in den Sinusoiden der Leber aufgenommen wird (4.1, Abb. 4.1). Die Aufnahme von Ovalbumin geschieht in LSEC durch rezeptorvermittelte Endozytose über

den Mannoserezeptor (Magnusson and Berg, 1989). Dieser ist in sehr hoher Anzahl auf LSEC exprimiert und erklärt die schnelle und effiziente Aufnahme von Ovalbumin aus dem Blut.

Ferner führte die Kreuzpräsentation dieses Antigens zu einer Stimulation und Adhäsion naiver CD8 T-Zellen auf LSEC. Dabei ist die Stimulation abhängig von einem direktem Zell-Zell Kontakt zwischen LSEC und CD8 T-Zellen. Die Anzahl adhärerender CD8 T-Zellen wird durch die Dosis an kreuzpräsentiertem Antigen bestimmt (4.2, 4.3). Die naiven CD8 T-Zellen waren *in vitro* in der Abwesenheit von Antigen sehr mobil und bewegten sich stetig auf den Endothelzellen. Sobald Antigen präsentiert wurde, stoppten die CD8 T-Zellen ihre Migration und die adhärerenden CD8 T-Zellen zeigten durch die Bildung von Zellausläufern einen einzigartigen Phänotyp, der bei der Interaktion mit der DC Zelllinie DC2.4 und der Fibroblastenzelllinie C57 nicht zu beobachten war. Der Migrations-Stopp wurde hierbei allein durch das T-Zellrezeptor Signal initiiert und dann durch die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 stabilisiert. Im Gegensatz zum Multistep Modell der Adhäsion und Extravasation von aktivierten T-Zellen an Endothelien konnte hier die Adhäsion naiver CD8 T-Zellen an Endothelien gezeigt werden, ohne eine maßgebliche Beteiligung von Adhäsionsmolekülen oder eine vorhergehende Aktivierung der CD8 T-Zellen.

LSEC stellen also eine einzigartige Zellpopulation in der Leber dar, die effizient große Mengen an löslichem Antigen aufnimmt und in der Lage ist, dieses mit der Folge dass naive CD8 T-Zellen antigenspezifisch adhären und stimuliert werden, kreuzzupräsentieren.

## **5.2 Die Präsentation von löslichem Antigen führt zu einer antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber**

Auch *in vivo* zeigte sich eine Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in den Sinusoiden, da adoptiv transferierte CD8 T-Zellen antigenspezifisch in der Leber akkumulierten. Fehlte jedoch die antigenspezifische Interaktion wie z.B. nach dem Transfer von wildtyp CD8 T-Zellen oder durch die Injektion antigenspezifischer CD8 T-Zellen in PBS-behandelte Mäuse, so blieb die erhöhte Retention der CD8 T-Zellen aus (4.4). Somit ließ sich ein Nebeneffekt durch die Applikation von Ovalbumin, wie z.B. eine Kontamination mit LPS und eine dadurch induzierte Aktivierung von CD8 T-Zellen (Tough et al., 1997) oder eine

durch die Aufreinigung und den adoptiven Transfer bedingte unspezifische Aktivierung, mit folgender erhöhter Adhäsion der CD8 T-Zellen, ausschließen.

Eine selektive Retention von antigenspezifischen CD8 T-Zellen, und nicht die unspezifische Retention aller CD8 T-Zellen, ist eine wichtige Voraussetzung für eine spezifische Regulation der Immunantwort und gewährleistet eine Tolerisierung ausschließlich der antigenspezifischen T-Zellen, was von großer Bedeutung für den Erhalt eines intakten Immunsystems ist.

Die antigenspezifische Adhäsion, als Folge der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen, war ausschließlich in der Leber und keinem der anderen untersuchten Organe wie der Lunge, dem Darm, der Milz oder den Lymphknoten zu beobachten, trotz der Präsenz professioneller antigenpräsentierender Zellen in allen untersuchten Organen (Abb. 4.6, Abb. 4.11). Die bevorzugte Adhäsion in der Leber ist mit der schnellen Antigenaufnahme durch die sinusoidalen Endothelzellen zu erklären. Innerhalb weniger Minuten waren in den die Sinusoide umgebenden Zellen das Antigen zu finden, was die Antigenaufnahme in den sekundären lymphoiden Organen übertraf. Diese, durch die rapide Antigenaufnahme bedingte, schnell auftretende Retention antigenspezifischer CD8 T-Zellen stellt einen möglichen weiteren Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion dar, da die in der Leber adhärierenden Zellen daran gehindert werden in lymphatische Gewebe zu wandern, und somit vor einer Aktivierung in sekundären lymphoiden Organen bewahrt werden. Es findet eine Kompartimentalisierung statt, in der die antigenspezifischen T-Zellen räumlich von den Immunität induzierenden Orten getrennt werden.

Dieser mögliche Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion geht mit den Befunden von Bertolino et. al einher, dass in der Leber Toleranz induziert wird, während in sekundären lymphoiden Organen Immunität entsteht (Bowen et al., 2004). Es wurde dabei gezeigt, dass beim adoptiven Transfer von H-2K<sup>b</sup>-spezifischen DesTCR CD8 T-Zellen in Met-K<sup>b</sup> Mäuse, welche H-2K<sup>b</sup> unter dem Metallothionein Promotor auf Hepatozyten und vermutlich weiteren antigenpräsentierenden Zellen im Lymphknoten exprimieren, die Empfängermäuse Hepatitis entwickeln. Dabei findet die Aktivierung der T-Zellen in der Leber und den Lymphknoten statt (Bertolino et al., 2001). Wird die CD8 T-Zell Aktivierung in den Lymphknoten durch den Einsatz von anti-CD62L Antikörper verhindert, so bleibt die Entwicklung der Hepatitis aus. Ebenso wird beim adoptiven

Transfer von DesTCR in Alb-K<sup>b</sup> Empfängermäuse, welche H-2K<sup>b</sup> unter dem Albumin Promotor ausschließlich in der Leber exprimieren, keine Hepatitis entwickelt. Somit ist die Aktivierung der CD8 T-Zellen im Lymphknoten ausschlaggebend für die Entwicklung einer Immunreaktion. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten System der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen auf LSEC und der daraus folgenden Retention und Expansion naiver CD8 T-Zellen, verwendeten Bertolino et al. endogen auf Hepatozyten und nicht auf LSEC exprimiertes Antigen, was zu einer reduzierten Lebensdauer der CD8 T-Zellen führte (Bowen et al., 2004).

Die Retention antigenspezifischer CD8 T-Zellen in der Leber war schon innerhalb weniger Stunden zu beobachten. Allerdings ist keine Aussage darüber möglich, ob die erhöhte Retention durch eine strikte Adhäsion zu erklären ist und diese Zellen tatsächlich über mehrere Stunden in der Leber verweilen, oder ob lediglich eine erhöhte Interaktionszeit der antigenspezifischen Zellen in den Sinusoiden beim Passieren der Leber und eine folgende Re-Zirkulation die beobachtete Akkumulation der Zellen erklärt. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen. So könnte der Einsatz von FTY720, was durch die Inhibition des Sphingosin-1-Phosphat Rezeptors den Austritt von Lymphozyten aus den Lymphknoten verhindert (Mandala et al., 2002), Klarheit verschaffen. Die Behandlung mit dieser Substanz würde nur dann eine erhöhte intrahepatische Retention naiver CD8 T-Zellen zeigen, wenn die Zellen permanent in der Leber verweilen. Eine Re-Zirkulation der CD8 T-Zellen, und damit das Passieren der Lymphknoten, wäre nicht möglich. In diesem Fall würde die erhöhte antigenspezifische Adhäsion ausbleiben. Die in den Filmen der antigenspezifischen Interaktion zwischen naiven CD8 T-Zellen und LSEC beobachtete strikte Adhäsion der CD8 T-Zellen auf einer einzigen Endothelzelle über den Zeitraum von einer Stunde *in vitro* sprechen jedoch gegen eine Re-Zirkulation der Zellen und weisen auch *in vivo* auf eine feste Interaktion der CD8 T-Zellen mit LSEC in der Leber hin.

Für die volle Aktivierung naiver CD8 T-Zellen wird ein Zeitraum von ca. 40 Std. benötigt, in dem die T-Zellen den Signalen von Antigen, Kostimulation und dem Signal 3 ausgesetzt sind (Curtsinger et al., 2003a). Während dieser Zeit wird überwiegend ein stabiler Kontakt zur T-Zelle gebildet. Zur Induktion von Toleranz hingegen, scheinen kurze und sequentielle Kontakte mit verschiedenen Dendritischen Zellen von Bedeutung zu sein (Hugues et al., 2006; Hugues et al., 2004). Wie lange der Kontakt zwischen T-Zellen und tolerisierenden Dendritischen Zellen bedarf um eine Toleranz zu induzieren,

ist nicht bekannt. Betrachtet man die Kinetik der Toleranzinduktion durch LSEC *in vitro*, so führt eine definierte Interaktionszeit von 24 bis 48 Stunden zu einem toleranten Phänotyp, während kürzere Inkubationszeiten auf LSEC in der Aktivierung der CD8 T-Zellen resultiert (unpublizierte Daten von Martina Berg). Der von der CD8 T-Zelle benötigte Zeitraum für den Erhalt toleranzinduzierender Signale durch LSEC *in vivo* ist jedoch nicht bekannt. Auch lässt sich über die Verweildauer der CD8 T-Zellen in der Leber keine Aussage machen. Nach 24 und 48 Stunden war noch eine deutlich erhöhte Retention der antigenspezifischen CD8 T-Zellen in der Leber zu beobachten (Abb. 4.7, Abb. 4.8). Vermutlich hält die antigenspezifische Adhäsion so lange an, wie das Antigen durch LSEC präsentiert wird. Ist das Antigen aus dem System beseitigt, kann die Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und MHC Klasse I nicht mehr stattfinden und die Zelle zirkuliert weiter. Darüber hinaus könnten inflammatorische Zytokine die Interaktion zwischen Endothelien und T-Zellen beeinflussen. So wurde für CD4 T-Zellen gezeigt, dass das Stopp-Signal, welches durch die Präsentation von Antigen auf Endothelien verursacht wurde, durch IFN- $\gamma$  umgekehrt wird und die Zellen in der Lage sind zu transmigrieren (Tay et al., 2003).

48 Stunden nach dem adoptivem Transfer naiver CD8 T-Zellen konnten bereits proliferierte Zellen in der Leber beobachtet werden (Abb. 4.8). Die Sinusoide haben einen Durchmesser von ca. 7-10  $\mu\text{m}$ , so dass eine T-Zelle nur stark gedrängt passieren kann. Ob die Proliferation dieser Zellen innerhalb der Sinusoide stattfand, was vermutlich in einem temporären Verschluss des Sinusoids resultieren würde, oder ob die Zellen ihr stimulierendes Signal in der Leber erhielten, dann im Lymphknoten oder der Milz die Zellteilung durchliefen und wieder in der Leber adhärirten, bleibt auch ungeklärt und ließe sich ebenfalls durch eine Inhibition der Emigration der CD8 T-Zellen aus dem Lymphknoten mit Hilfe der Verbindung FTY720 klären. Eine weitere Methode um den Ort der Proliferation zu analysieren wäre die Blockade von L-Selektin (CD62L), was den Eintritt naiver CD8 T-Zellen in die Lymphknoten vermittelt (Girard and Springer, 1995). Durch den Einsatz blockierender anti-CD62L Antikörper kann dies verhindert werden (Dawson et al., 1992; Lepault et al., 1994) und somit die Proliferation in den Lymphknoten ausgeschlossen werden. Um die Rolle der Milz als Ort der Proliferation zu überprüfen, könnte die Methode der Splenektomie verwendet werden.

### 5.3 Die intrahepatische Retention naiver CD8 T-Zellen ist bedingt durch die Kreuzpräsentation von Antigen durch die sinusoidalen Endothelzellen (LSEC)

Die Präsentation von löslichem Antigen durch LSEC *in vitro* führt zu einer antigenspezifischen Adhäsion naiver T-Zellen. Es wurde untersucht, ob LSEC auch *in vivo* die alleinige Zellpopulation ist, welche für die Retention naiver CD8 T-Zellen verantwortlich ist.

Neben LSEC sind in der Leber weitere antigenpräsentierende Zellpopulationen potentiell in der Lage mit naiven T-Zellen zu interagieren. So ist beschrieben, dass Hepatozyten naive T-Zellen aktivieren (Bertolino et al., 1998). Jedoch fehlt ihnen die Fähigkeit lösliches Antigen kreuzzupräsentieren (Limmer et al., 2000), sie spielen daher bei der antigenspezifischen Adhäsion als Folge der Kreuzpräsentation von Antigen keine Rolle. Leber-residente myeloide antigenpräsentierende Zellen, wie Kupffer Zellen und Dendritische Zellen, sind aber in der Lage das lösliche Antigen aufzunehmen und an CD8 T-Zellen zu präsentieren. Um deren Rolle bei der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber zu charakterisieren, wurde von Knochenmarkschimären Gebrauch gemacht, in denen entweder knochenmarksabhängige myeloide Zellen, oder organ-residente Zellen durch eine Punktmutation im MHC Klasse I Molekül außer Stande waren das Antigen zu präsentieren.

Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Adhäsion naiver CD8 T-Zellen nur in den Tieren, in denen organ-residente Zellen das Antigen präsentieren konnten und nicht in solchen, in denen die Antigenpräsentation auf myeloide antigenpräsentierende Zellen beschränkt war (Abb. 4.17).

Eine weitere Zellpopulation der Leber, die in der Lage ist naive CD8 T-Zellen zu aktivieren, sind die im Dissé'schen Raum sitzenden Ito Zellen (Winau et al., 2007). Die Fähigkeit dieser Zellen zur T-Zell Aktivierung wurde allerdings nur durch die Präsentation von Peptid untersucht. Da diese Zellen in unserer Beobachtung so gut wie kein Antigen aufnahmen (unpublizierte Daten von Anna Schurich), wurde die Beteiligung von Ito Zellen an der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen nicht weiter untersucht.

Demnach sind LSEC die entscheidende Zellpopulation für die antigenspezifische Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber, welche sowohl durch ihre effiziente und

schnelle Antigenaufnahme, als auch durch ihre Lokalisation in den Sinusoiden und dem direkten Kontakt zu passierenden Lymphozyten, gute Voraussetzungen hierfür besitzen.

#### **5.4 Nur ICAM-1 ist von den untersuchten Molekülen an der antigenspezifischen Adhäsion in der Leber beteiligt**

Bei der Aktivierung von T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen bilden sich an der Kontaktzone besonders organisierte Strukturen aus, die so genannte immunologische Synapse. Sie enthält Rezeptoren, Signaltransduktionsmoleküle und vor allem Adhäsionsmoleküle (Dustin, 2001). Ebenso ruft die Interaktion zwischen T-Zellen und Endothelien eine spezifische Formation hervor, in der die Endothelzelle eine kelchartige, so genannte ‚*docking structure*‘ formt, in der Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 angeordnet sind (Barreiro et al., 2002; Carman and Springer, 2004; Choi et al., 2004). Ob sich bei der Interaktion zwischen CD8 T-Zellen und LSEC ebenfalls solche charakteristischen Strukturen bilden wird noch untersucht. Welche Rolle Adhäsionsmoleküle bei der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber spielen, wurde mit Hilfe von Inhibitoren und blockierenden Antikörpern in dieser Arbeit geprüft.

Da ICAM-1 konstitutiv auf LSEC exprimiert wird und bei der antigenspezifischen Interaktion mit CD8 T-Zellen weiter hoch reguliert wird, wurde dessen Funktion bei der antigen-spezifischen Adhäsion in Folge der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen untersucht. Beim adoptiven Transfer von OT-1 CD8 T-Zellen in ICAM-1<sup>-/-</sup> Empfängertiere konnte im Vergleich zum adoptiven Transfer naiver OT-1 CD8 T-Zellen in wildtyp Empfängertiere jedoch nur eine Reduktion der antigenspezifischen Adhäsion um ca. 30 % beobachtet werden (Abb. 4.10). Demnach scheint ICAM-1 bei der Interaktion lediglich eine geringe stabilisierende Funktion auszuüben, da auch in Abwesenheit von ICAM-1 eine signifikant erhöhte Retention naiver CD8 T-Zellen in den Lebern OVA-behandelter Tiere zu beobachten war. Die *in vitro* Adhäsionsanalyse zeigte ebenfalls dass ICAM-1 bei der antigenspezifischen Adhäsion eine Rolle spielt. Allerdings kam hier ICAM-1 eine größere Bedeutung zu, da eine wesentliche Reduktion der Anzahl adhärrierender CD8 T-Zellen auf ICAM-1<sup>-/-</sup> LSEC, im Vergleich zu wildtyp LSEC, *in vitro* zu beobachten war (Abb. 4.4). Diese Diskrepanz zwischen der Beteiligung von ICAM-1 an der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen *in vivo* und der *in vitro* ist vermutlich durch die unterschiedlich einwirkenden Scherkräfte zu erklären. Bei der

Adhäsionsanalyse *in vitro* wurden die nicht adhätierenden Zellen mit PBS weggespült und somit die Zellen sehr starken Scherkräften ausgesetzt. Hierbei schien ICAM-1 wichtig für die Stabilisierung der Adhäsion zu sein. Dagegen spielte ICAM-1 bei den niedrigen Scherkräften innerhalb der Sinusoide *in vivo* eine geringere Rolle.

Betrachtet man die beim so genannten Multistep Modell der Extravasation von T-Zellen ins Gewebe involvierten Moleküle, so vermitteln im ersten Schritt vor allem Selektine das Rollen am Endothel (Patel et al., 2002). Diese sind jedoch für die Rekrutierung von Leukozyten in der Mikrovaskulatur der Leber nicht essentiell (Wong et al., 1997) und sind daher bei der antigenspezifischen Interaktion zwischen CD8 T-Zellen und LSEC nicht von Bedeutung.

Chemokine, die mit der apikalen Seite des Endothels assoziiert sind, spielen im nächsten Schritt der Extravasation eine Rolle, da sie rapide die Affinität von Integrinen erhöhen, was zum Arrest und zur Extravasation der T-Zellen ins Gewebe führt. Der Einsatz von Pertussis Toxin hemmt die Signalweiterleitung des Chemokinrezeptors und ermöglichte den Einfluss von Chemokinen auf die intrahepatische Adhäsion der CD8 T-Zellen zu analysieren. Trotz diesem fehlenden so genannten ‚*inside-out signalling*‘ der CD8 T-Zellen, wurde eine erhöhte Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber beobachtet. Somit konnte auch der Familie der Chemokine keine Beteiligung an der antigenspezifischen Adhäsion zugesprochen werden.

Im nächsten Schritt des Multistep Modells ist die Familie der Integrine beteiligt. Neben ICAM-1 sind ICAM-2 und VCAM-1 von LSEC exprimierte Integrine. Deren Funktion bei der intrahepatischen Adhäsion wurde durch den Einsatz blockierender Antikörper getestet, doch weder die Blockade von VCAM-1, noch von ICAM-2 resultierten in einer Reduktion der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber und diesen Molekülen konnte keine Beteiligung an der antigenspezifischen Retention nachgewiesen werden.

Als ein Regulator des ‚*inside-out signalling*‘ von  $\beta$ 2-Integrinen wurde Cytohesin-1 identifiziert. Dieses Molekül ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor für kleine ADP-Ribosylierungsfaktoren und reguliert durch die Interaktion mit CD18 die Affinität von LFA-1 gegenüber seinem Liganden ICAM-1 (Geiger et al., 2000). Mit Hilfe des Inhibitors 20H3 wurde die Gruppe der Cytohesine blockiert, wodurch die Konformationsänderung und somit die Affinitätssteigerung von LFA-1 inhibiert war. Doch auch hier zeigte der Einsatz

des Inhibitors keine Wirkung auf die antigenspezifische Adhäsion naiver T-Zellen, welche sich demnach unabhängig vom Affinitätsstatus von LFA-1 abspielt.

Die Aminooxidase VAP-1 spielt bei der Adhäsion von Leukozyten im humanen System eine wesentliche Rolle (Lalor et al., 2002), doch lässt sich dieser Befund nicht auf das murine System übertragen, als dass VAP-1 hier in nur sehr geringem Maß in der Leber exprimiert wird (Bonder et al., 2005). Diese geringe Expression erklärt den ausbleibenden Effekt der Blockade von VAP-1 auf die antigenspezifische Adhäsion in der Leber. Auch die Inhibition des Mannoserezeptors, welcher für die hohe Kapazität der Antigenaufnahme verantwortlich ist und als Ligand von L-Selektin (CD62L) auf Lymphozyten eine Rolle bei der Adhäsion an Endothelien spielt (Irrjala et al., 2001), zeigte keine Beteiligung dieses Rezeptors bei der intrahepatischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen.

Demnach konnte den hier untersuchten Molekülen keine Rolle bei der intrahepatischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen nachgewiesen werden, lediglich ICAM-1 schien eine stabilisierende Funktion bei der Interaktion zu übernehmen.

Die Bilder der *intravital* Mikroskopie ermöglichten eine direkte Visualisierung der adhärierenden CD8 T-Zellen in den Sinusoiden. Dabei war auffällig, dass der Adhäsion in der Leber kein Rollen vorausging wie es für die Extravasation von Leukozyten ins Gewebe typisch ist (Butcher, 1991; Springer, 1994), sondern die Zellen hielten abrupt an und bildeten einen festen, lang anhaltenden Kontakt im Sinusoid aus (Abb.4.11). Diese Beobachtung korreliert mit dem Fehlen von Selektinen auf LSEC, da diese Moleküle das Rollen von Leukozyten auf dem Endothel vermitteln.

Somit bleibt als wichtigster Faktor für die intrahepatische antigenspezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen die Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und MHC Klasse I. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Modell von Dustin et al., dass die initiale T-Zellrezeptor Stimulation ein Stopp-Signal einleitet, dass für die Bildung eines weiteren Kontaktes essentiell ist (Dustin et al., 1997). Die ohnehin enge Interaktion zwischen LSEC und T-Zellen innerhalb der Sinusoide erklärt vermutlich, dass es keiner weiteren Stabilisierung bedarf und dieser Kontakt schon ohne die Beteiligung von Adhäsionsmolekülen beständig ist. Diese alleinige Abhängigkeit von der Interaktion zwischen MHC Klasse I und T-Zellrezeptor und die daraus resultierende weniger starken Adhäsion ist eventuell wichtig, um die Verstopfung der engen Sinusoide durch fest adhärierende T-Zellen zu

vermeiden. Im Gegensatz dazu sind die Interaktionen zwischen Dendritischen Zellen und T-Zellen im lymphatischen Gewebe von chemotaktischen Signalen und Adhäsionsmolekülen abhängig, was auch in der Abwesenheit von spezifischem Antigen zu einer lang andauernden physikalischen Interaktion führt (Mempel et al., 2004).

### **5.5 Bei der ubiquitären Expression von endogenem Antigen führt das Zusammenspiel unterschiedlicher hepatischer Zelltypen zu einer starken Retention naiver CD8 T-Zellen**

Die antigenspezifische Adhäsion wurde neben der Präsentation von löslichem Antigen auch durch die Erkennung von endogen exprimierten Antigen hervorgerufen. So zeigten H-2K<sup>b</sup>-spezifische DesTCR CD8 T-Zellen eine erhöhte Adhäsion in der Leber von Mäusen mit ubiquitärer H-2K<sup>b</sup>-Expression (Abb. 4.9). Diese Daten gehen mit denen von Bertolino et al. veröffentlichten Daten einher, in denen ebenfalls eine erhöhte antigenspezifische Adhäsion von DesTCR CD8 T-Zellen in Mäusen beobachtet wurde, die H-2K<sup>b</sup> als Transgen unter dem MHC Klasse I Promotor exprimierten (Bertolino et al., 2005). Da das Antigen in diesen Untersuchungen jedoch ubiquitär exprimiert wurde, können auch Hepatozyten, Kupffer Zellen, Ito Zellen und Dendritische Zellen für die Retention verantwortlich gewesen sein. Darüber hinaus sind naive CD8 T-Zellen sind in der Lage Ausläufer zu bilden, welche durch die so genannten Fenestrae in den LSEC hindurch Kontakt zu den unterliegenden Hepatozyten bilden können (Warren et al., 2006). Es ist also im Falle der ubiquitären Expression von endogenem Antigen keine Differenzierung der antigenpräsentierenden Zellpopulation in der Leber möglich, welche die Retention naiver CD8 T-Zellen bedingt.

Bei den Beobachtungen der antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen von Bertolino et al. im allogenen System, konnte eine entscheidende Rolle für die Interaktion von ICAM-1 und LFA-1 für die Adhäsion der Zellen in der Leber gezeigt werden (Bertolino et al., 2005). Diese Daten stehen im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit beobachteten geringen Beitrag von ICAM-1 bei der, durch die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen bedingten, antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen. Da die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von löslichem Antigen nur wenigen Zellpopulationen in der Leber besitzen, spielen bei der Retention alloreaktiver T-Zellen vermutlich andere Mechanismen eine Rolle. Hierbei kommen weitere Zellpopulationen für die Interaktion mit CD8 T-Zellen in Frage, die vermutlich den Kontakt über eine ICAM-1-LFA-1

Interaktion stabilisieren. Diese Beteiligung weiterer Zellpopulationen im allogenen System erklärt auch die weit höhere Akkumulation naiver CD8 T-Zellen in der Leber, welche die Retention naiver CD8 T-Zellen beim adoptiven Transfer mit löslichem Antigen um nahezu 50 % übersteigt.

Der T-Zellrezeptor von DesTCR CD8 T-Zellen unterscheidet sich in seiner Affinität vom OT-1 T-Zellrezeptor, was auch einen Unterschied für den Mechanismus der antigenspezifischen Retention bedeuten könnte. So würde die niedrig affine Interaktion zwischen DesTCR und H-2K<sup>b</sup> durch ICAM-1 unterstützt, während der hoch affine OT-1 T-Zellrezeptor keiner Adhäsionsmoleküle bedarf.

Es bleibt unklar, ob die adhärierenden CD8 T-Zellen im allogenen System ebenfalls expandieren und nach einer Aktivierung *in situ* ein toleranter Phänotyp induziert wird, oder ob ein unterschiedliches Programm durch andere antigenpräsentierende Zellpopulationen in der Leber als LSEC, wie z.B durch Hepatozyten, induziert wird, das zur Deletion der T-Zellen führt, so wie es bereits für Hepatozyten beschrieben wurde (Bertolino et al., 1998). Man könnte erwägen, dass durch die verschiedenen antigenpräsentierenden Zellpopulationen in der Leber differentielle Programme in den T-Zellen induziert werden. So ist für die Toleranzinduktion bei Lebertransplantationen beschrieben, dass die alloreaktiven CD8 T-Zellen, welche ihr Antigen ubiquitär exprimiert antreffen, in Apoptose gehen (Benseler et al., 2007). Im Gegensatz dazu löst durch LSEC kreuzpräsentiertes Antigen vermutlich ein Überlebenssignal in den CD8 T-Zellen aus, denn es wurde hier eine Expansion der CD8 T-Zellen in Folge der Interaktion mit LSEC beobachtet.

### **5.6 LSEC stellen mit der Fähigkeit zur Kreuzpräsentation und der Retention naiver CD8 T-Zellen eine einzigartige Endothelzellpopulation dar**

Neben den LSEC in der Leber verfügen die Endothelien in einer Reihe von anderen Organen, wie z.B. der Niere, dem Herzen, der Haut und dem Darm, ebenfalls über die Expression von MHC Klasse I und II (Haraldsen et al., 1998; Lohse et al., 1996; McDouall et al., 1997; Muczynski et al., 2003; Vora et al., 1994). Darüber hinaus besitzen einige dieser Endothelien die Merkmale von professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie die Fähigkeit zur Aufnahme und Prozessierung von Antigen (Bagai et al., 2005; Greening et al., 2003) sowie die Expression von

kostimulatorischen Molekülen (Grewal and Flavell, 1998; Khayyamian et al., 2002; Kreisel et al., 2002; Marelli-Berg et al., 2000; Rodig et al., 2003), was eine Voraussetzung für die T-Zell-Aktivierung ist. Die Adhäsion von CD8 T-Zellen auf LSEC unterscheidet sich aber in verschiedenen Aspekten von den in diesen Arbeiten beschriebenen Interaktionen zwischen T-Zellen und Endothelzellen. Die meisten Studien befassen sich mit der Frage, ob die Präsentation von Antigen durch Endothelien zu einer Interaktion mit aktivierten Effektor CD8 T-Zellen führen würde (Marelli-Berg et al., 2000), aber nicht mit der Retention von naiven CD8 T-Zellen. Die in diesen Modellen verwendeten Endothelzellen benötigten eine vorherige Stimulation durch proinflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ , um Moleküle zu exprimieren, welche die Adhäsion der aktivierten CD8 T-Zellen unterstützen. Außerdem wurden endogen als Transgen exprimierte Antigene oder als lösliches Peptid applizierte Antigene untersucht, und nicht die Beteiligung von Endothelzellen an der Immunantwort gegenüber löslichem Antigen. Im Gegensatz dazu stellen die hier verwendeten LSEC eine einzigartige Endothelzellpopulation dar, die keine Stimulation durch proinflammatorische Zytokine benötigt um als kreuzpräsentierende Zellen zu funktionieren, und die Adhäsion naiver CD8 T-Zellen zur Folge hat.

### **5.7 Naive und aktivierte CD8 T-Zellen unterscheiden sich in ihrem Adhäsions- und Transmigrationsverhalten auf LSEC**

In Arbeiten von Mehal et al. wurde gezeigt, dass die Perfusion der Leber mit einer Mixtur aus aktivierten und naiven Lymphozyten zu einer selektiven Retention aktivierter CD8 T-Zellen führt, welche dort in Apoptose gehen (Mehal et al., 1999). Ob die Apoptose die Ursache oder die Konsequenz der Retention ist, wird diskutiert. So besagt die ‚*Killing Field*‘ Hypothese dass die Apoptose von CD8 T-Zellen in der Leber eine Folge der in intrahepatischen Adhäsion ist. Dagegen mutmaßt die ‚*Graveyard*‘ Hypothese dass apoptotische Zellen in der Leber akkumulieren und dort sterben (Crispe et al., 2000). In dieser Arbeit konnte beim adoptiven Transfer von aktivierten CD8 T-Zellen ein interessanter Unterschied zwischen naiven und aktivierten CD8 T-Zellen bei der intrahepatischen Adhäsion beobachtet werden. Während naive CD8 T-Zellen nur in Anwesenheit des Antigens adhärirten, zeigten aktivierte CD8 T-Zellen unabhängig von der Präsentation des Antigens eine erhöhte Retention in der Leber (Abb. 4.15). Die vermehrte Adhäsion von aktivierten CD8 T-Zellen ist mit der differentiellen Expression

von Adhäsionsmolekülen zu erklären. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen wird von aktivierten Zellen ein größeres Spektrum von Molekülen exprimiert, welche die Interaktion mit Endothelien erhöhen (Crispe et al., 2000).

Auch in der Transmigration unterschieden sich aktivierte von naiven CD8 T-Zellen. Während naive CD8 T-Zellen in den Sinusoiden verweilen, transmigrierten aktivierte CD8 T-Zellen ins Parenchym der Leber (Abb. 4.13). Dieses mit der Aktivierung veränderte Transmigrationsverhalten geht mit den wechselnden Funktionen der T-Zellen einher. Aktivierte CD8 T-Zellen haben die Aufgabe Pathogene im Gewebe zu eliminieren und müssen dafür zum Ort der Infektion im Gewebe vordringen. Naive CD8 T-Zellen hingegen patrouillieren durch den Körper, um im Falle einer Infektion in den sekundären lymphatischen Organen aktiviert zu werden. Der Unterschied im Transmigrationsverhalten ist vermutlich ebenfalls durch die differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen bedingt.

Das Transmigrationsverhalten wurde in dieser Arbeit nach einer Stunde *in vitro*, bzw. nach vier Stunden *in vivo* untersucht. So bleibt offen, ob naive CD8 T-Zellen, welche zu einem frühen Zeitpunkt in den Sinusoiden verweilen, möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. nach ihrer Aktivierung und der Toleranzinduktion *in situ*, in das Gewebe einwandern können. Die Tolerisierung naiver CD8 T-Zellen durch LSEC *in vitro* resultiert in einer hohen Expression von CD44 und CD62L, während CD25 auf den CD8 T-Zellen herunterreguliert wird (Diehl et al., 2007). Diese Zusammensetzung der Oberflächenmolekülen unterscheidet sich von den auf naiven und aktivierten CD8 T-Zellen exprimierten Molekülen, welche  $CD25^{\text{niedrig}}CD44^{\text{niedrig}}CD62L^{\text{hoch}}$  bzw.  $CD25^{\text{hoch}}CD44^{\text{hoch}}CD62L^{\text{niedrig}}$  sind. So behalten LSEC-tolerisierte CD8 T-Zellen durch die Expression von CD62L die Fähigkeit in Lymphknoten einzutreten, wozu aktivierte CD8 T-Zellen nicht in der Lage sind. Darüber hinaus trägt die Expression von CD44 zur Extravasation in inflammatorisches Gewebe bei (DeGrendele et al., 1997). Diese Daten lassen vermuten, dass nach dem Erhalt toleranzinduzierender Signale in den Sinusoiden, die toleranten CD8 T-Zellen sowohl, wie naive CD8 T-Zellen, lymphoide Organe durchwandern können, als auch, wie aktivierte CD8 T-Zellen, die Fähigkeit besitzen in Gewebe einzuwandern.

### 5.8 Die intrahepatische Retention resultiert in einer Expansion und Toleranzinduktion der naiven CD8 T-Zellen

Betrachtet man die funktionellen Folgen der antigenspezifischen Interaktion zwischen naiven CD8 T-Zellen und LSEC in der Leber, so findet eine Stimulation der CD8 T-Zellen *in situ* statt. Diese ist bereits wenige Stunden nach dem adoptiven Transfer durch eine vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf den antigenspezifischen CD8 T-Zellen zu beobachten (Abb. 4.18). Eine der Anergie vorausgehende temporäre Aktivierung mit Effektorfunktionen wurde schon für CD4 T-Zellen gezeigt (Huang et al., 2003). Auf die Stimulation der antigenspezifischen CD8 T-Zellen folgt dann die Proliferation der CD8 T-Zellen und eine deutliche Expansion der Population nach wenigen Tagen. Diese expandierten CD8 T-Zellen weisen einen toleranten Phänotyp auf, denn sie reagieren, im Vergleich zu DC-aktivierten CD8 T-Zellen, nicht mit der Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  auf eine antigenspezifische Re-Stimulation (Abb. 4.19).

Neben dem toleranten Phänotyp, d.h. dem Ausbleiben der Produktion von Effektorzytokinen nach einem Stimulus, exprimieren LSEC-stimulierte CD8 T-Zellen anti-apoptotisches Bcl-2 (Diehl et al., 2007). Dieses verhindert die Apoptose und Deletion von Zellen (Davey et al., 2002) und geht mit der in dieser Arbeit gezeigten LSEC-induzierten Toleranz einher, da sie nicht in einer klonalen Deletion der CD8 T-Zellen resultiert, sondern sogar eine Expansion der Population veranlasst. Dies steht im Kontrast zu der durch immature Dendritische Zellen und Hepatozyten vermittelten deletionalen T-Zell Toleranz (Bertolino et al., 1998; Probst et al., 2005). Des Weiteren ist dieser tolerante Phänotyp nicht nur in der Leber, d.h. am Ort der Stimulation und Toleranzinduktion zu finden, sondern auch bereits emigrierte und im Lymphknoten und der Milz lokalisierte CD8 T-Zellen fehlte die Fähigkeit zur Produktion von Effektorzytokinen nach einer antigenspezifischen Restimulation.

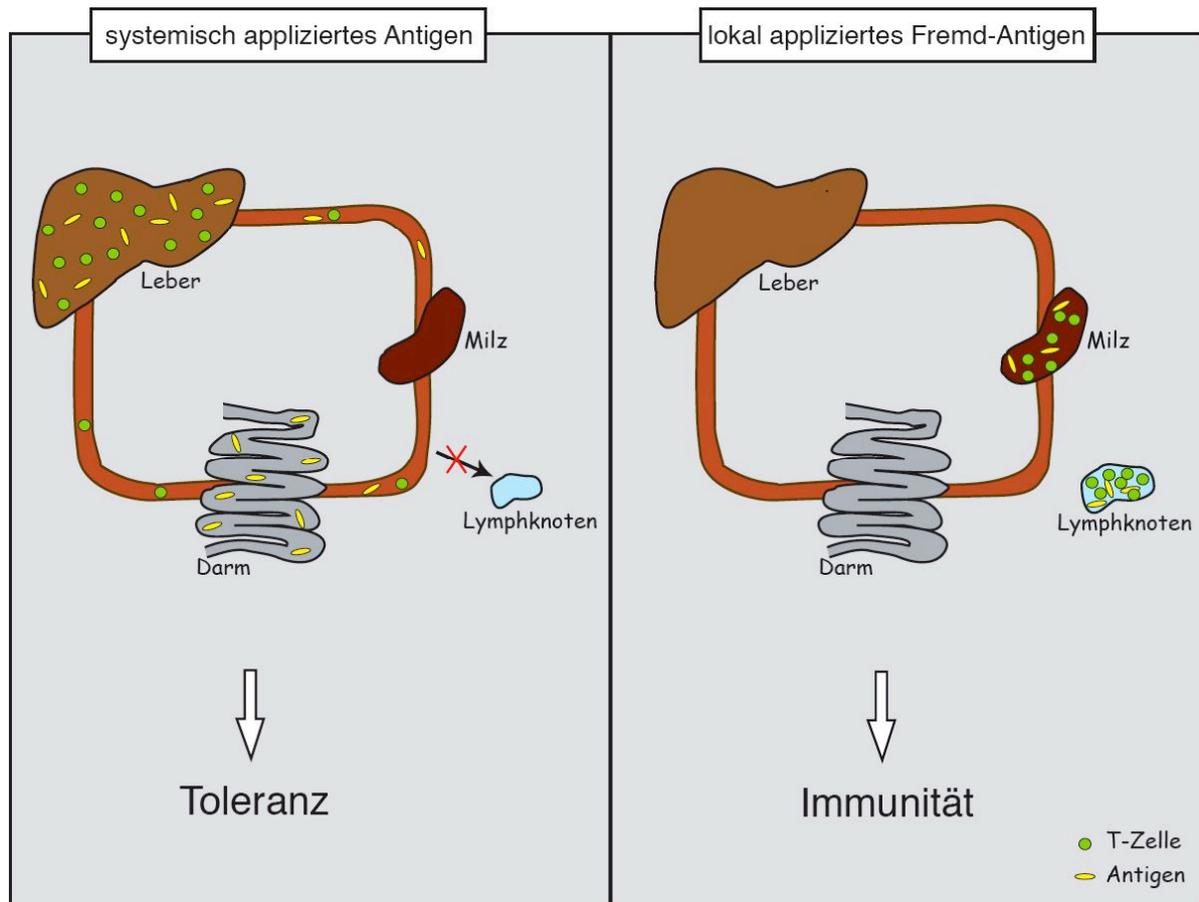
LSEC-tolerisierte CD8 T-Zellen könnten eine regulatorische Funktion besitzen. Verschiedene Gruppen zeigten im humanen System eine regulatorische Funktion und die Expression von FoxP3 von CD8 T-Zellen (Bisikirska et al., 2005; Cosmi et al., 2003; Elrefaei et al., 2006). Ob diese Funktion auch auf LSEC-tolerisiert murine CD8 T-Zellen zutrifft bedarf weiterer Untersuchungen.

### **5.9 Die intrahepatische Retention naiver CD8 T-Zellen als Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion**

Die Induktion der peripheren Toleranz von CD8 T-Zellen gegenüber körpereigener Antigene wird auf die Interaktion mit tolerogenen Dendritischen Zellen im lymphatischen Gewebe und auf die klonale Deletion der tolerisierten T-Zellen zurückgeführt (Lee et al., 2007; Pooley et al., 2001; Probst et al., 2005). CD8 T-Zell Toleranz gegenüber löslichen zirkulierenden Antigenen wird ebenfalls in der Peripherie induziert (Liblau et al., 1996), wobei unklar ist welche Kompartimente und welche antigenpräsentierenden Zellen an diesem Prozess beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass systemisch appliziertes Antigen präferentiell in den Sinusoiden der Leber aufgenommen wird. Die darauf folgende Kreuzpräsentation des Antigens durch LSEC führte zu einer schnellen antigenspezifischen Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber, aber nicht in anderen lymphatischen Organen. Die lokale Applikation von Antigen in Kombination mit einem als körperfremd erkannten Stimulus hingegen, resultierte in einer Immunität auslösenden Aktivierung der CD8 T-Zellen.

Diese Ergebnisse der selektiven Retention in der Leber ergeben ein Modell für einen weiteren Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion, in dem die schnelle antigenspezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen an kreuzpräsentierende LSEC in der Leber mit der Antigenpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen konkurriert. Somit wird eine Interaktion der naiven CD8 T-Zellen mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen in lymphoiden Organen wie der Milz und dem Lymphknoten verhindert, was die Induktion der CD8 T-Zell Toleranz sicherstellt (Abb. 5.1).

Letztendlich führt die Retention in der Leber zur Tolerisierung der naiven CD8 T-Zellen, aber anstelle einer klonalen Deletion zu unterlaufen expandierten die CD8 T-Zellen während der LSEC-vermittelten Toleranzinduktion *in vivo*. Es wurde hier erstmalig die antigenspezifische Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber als initialer Schritt der Toleranzinduktion gegenüber löslichen Antigenen gezeigt.



**Abbildung 5.1: Bedeutung der selektiven Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber für die periphere Toleranzinduktion.** Systemisch appliziertes Antigen wird präferentiell von LSEC in der Leber aufgenommen und resultiert in einer antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen, wodurch deren Aktivierung in sekundären lymphoiden Organen verhindert wird. Lokal appliziertes Fremd-Antigen wird von Dendritischen Zellen im Gewebe aufgenommen und im proximalen Lymphknoten und der Milz naiven CD8 T-Zellen präsentiert, was zu einer Aktivierung der CD8 T-Zellen und einer Immunreaktion führt.

Diese durch LSEC vermittelte Immunregulation ist als ein zusätzlicher Mechanismus neben der peripheren Toleranzinduktion durch tolerogene Dendritische Zellen von Bedeutung, da hierbei eine CD8 T-Zell Toleranz gegenüber zirkulierender löslicher Antigene induziert wird, zu denen tolerogene Dendritische Zellen eventuell keinen Zugang haben. Genauso wird die Toleranzinduktion durch Dendritische Zellen ergänzend benötigt, da LSEC keinen Zugang zu lokal vorhandenen partikulären Antigenen besitzen. Nur das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen der peripheren Toleranz ermöglichen einen Schutz gegenüber autoreaktiven CD8 T-Zellen.

Die LSEC-vermittelte CD8 T-Zell Toleranz können sich Pathogene zu nutze machen. So werden z.B. bei einer Infektion durch Hepatitis B und C große Mengen an viralen Antigenen von infizierten Hepatozyten abgegeben, deren Kreuzpräsentation durch LSEC zu einer Tolerisierung der CD8 T-Zellen führen könnte und in einer persistierenden Infektion enden würde. Das Verständnis der Mechanismen der peripheren CD8 T-Zell Toleranzinduktion trägt zur Aufklärung dieser patho-physiologischen Prinzipien bei, die der Toleranz gegenüber systemisch vorhandenen Antigenen unterliegen und kann zur Verbesserung der Manipulation der Immunantwort bei der Immuntherapie von Bedeutung sein.

## 6. Referenzen

- Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1998). Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* *282*, 1338-1341.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* *298*, 1395-1401.
- Bagai, R., Valujskikh, A., Canaday, D.H., Bailey, E., Lalli, P.N., Harding, C.V., and Heeger, P.S. (2005). Mouse endothelial cells cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via a TAP1- and proteasome-dependent pathway. *J Immunol* *174*, 7711-7715.
- 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.
- Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Serrador, J.M., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Furthmayr, H., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol* *157*, 1233-1245.
- 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.
- Baumhater, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D., and Lasky, L.A. (1993). Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* *262*, 436-438.
- Benseler, V., McCaughan, G.W., Schlitt, H.J., Bishop, G.A., Bowen, D.G., and Bertolino, P. (2007). The liver: a special case in transplantation tolerance. *Semin Liver Dis* *27*, 194-213.
- Berg, E.L., Yoshino, T., Rott, L.S., Robinson, M.K., Warnock, R.A., Kishimoto, T.K., Picker, L.J., and Butcher, E.C. (1991). The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* *174*, 1461-1466.
- Bernuau, D., Legres, L., Lamri, Y., Giuily, N., Fey, G., and Feldmann, G. (1989). Heterogeneous lobular distribution of hepatocytes expressing acute-phase genes during the acute inflammatory reaction. *J Exp Med* *170*, 349-354.
- Bertolino, P., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Fazekas de St Groth, B. (2001). Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol* *166*, 5430-5438.
- Bertolino, P., Schrage, A., Bowen, D.G., Klugewitz, K., Ghani, S., Eulenburg, K., Holz, L., Hogg, N., McCaughan, G.W., and Hamann, A. (2005). Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice. *Hepatology* *42*, 1063-1071.
- Bertolino, P., Trescol-Biemont, M.C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* *28*, 221-236.
- Bevilacqua, M.P., and Nelson, R.M. (1993). Selectins. *J Clin Invest* *91*, 379-387.
- Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J.A., and Herold, K.C. (2005). TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* *115*, 2904-2913.

- Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 72, 441-455.
- Bogers, W.M., Stad, R.K., Janssen, D.J., van Rooijen, N., van Es, L.A., and Daha, M.R. (1991). Kupffer cell depletion in vivo results in preferential elimination of IgG aggregates and immune complexes via specific Fc receptors on rat liver endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 86, 328-333.
- Bonder, C.S., Norman, M.U., Swain, M.G., Zbytnuik, L.D., Yamanouchi, J., Santamaria, P., Ajuebor, M., Salmi, M., Jalkanen, S., and Kubes, P. (2005). Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* 23, 153-163.
- Bousoo, P., and Robey, E. (2003). Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* 4, 579-585.
- Bowen, D.G., Zen, M., Holz, L., Davis, T., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2004). The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 114, 701-712.
- Breiner, K.M., Schaller, H., and Knolle, P.A. (2001). Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology* 34, 803-808.
- Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.
- Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davis, D.R., Millard, P.R., Herbertson, B.M., Binns, R.M., and Davies, D.A. (1969). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223, 472-476.
- Cantor, H.M., and Dumont, A.E. (1967). Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* 215, 744-745.
- 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.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167, 377-388.
- Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9, 10-16.
- Choi, J., Enis, D.R., Koh, K.P., Shiao, S.L., and Pober, J.S. (2004). T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 22, 683-709.
- Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarlasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., *et al.* (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 102, 4107-4114.
- Crispe, I.N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 51-62
- 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.
- Crispe, I.N., and Mehal, W.Z. (1996). Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today* 17, 522-525.
- 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.
- Cyster, J.G. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* *286*, 2098-2102.
- Davey, G.M., Kurts, C., Miller, J.F., Bouillet, P., Strasser, A., Brooks, A.G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* *196*, 947-955.
- Dawson, J., Sedgwick, A.D., Edwards, J.C., and Lees, P. (1992). The monoclonal antibody MEL-14 can block lymphocyte migration into a site of chronic inflammation. *Eur J Immunol* *22*, 1647-1650.
- De Creus, A., Abe, M., Lau, A.H., Hackstein, H., Raimondi, G., and Thomson, A.W. (2005). Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol* *174*, 2037-2045.
- DeGrendele, H.C., Estess, P., and Siegelman, M.H. (1997). Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* *278*, 672-675.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* *2*, 1032-1039.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* *373*, 438-441.
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., and Knolle, P.A. (2007). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8(+) T cell tolerance.
- Diesselhoff-den Dulk, M.M., Crofton, R.W., and van Furth, R. (1979). Origin and kinetics of Kupffer cells during an acute inflammatory response. *Immunology* *37*, 7-14.
- Dustin, M.L. (2001). Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *Journal of clinical immunology* *21*, 258-263.
- Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A., and Unanue, E.R. (1997). Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3909-3913.
- Elrefaei, M., Barugahare, B., Ssali, F., Mugenyi, P., and Cao, H. (2006). HIV-specific IL-10-positive CD8+ T cells are increased in advanced disease and are associated with decreased HIV-specific cytotoxicity. *J Immunol* *176*, 1274-1280.
- Fey, G.H., and Gaudie, J. (1990). The acute phase response of the liver in inflammation. *Prog Liver Dis* *9*, 89-116.
- Filice, G.A. (1988). Antimicrobial properties of Kupffer cells. *Infect Immun* *56*, 1430-1435.
- Fraser, R., Dobbs, B.R., and Rogers, G.W. (1995). Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* *21*, 863-874.

- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* *200*, 1039-1049.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* *21*, 311-335.
- Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K.S., and Kolanus, W. (2000). Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *The EMBO journal* *19*, 2525-2536.
- Girard, J.P., and Springer, T.A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* *16*, 449-457.
- Goddard, S., Youster, J., Morgan, E., and Adams, D.H. (2004). Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol* *164*, 511-519.
- Godfrey, D.I., and Kronenberg, M. (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* *114*, 1379-1388.
- Good, M.F. (1995). Development of immunity to malaria may not be an entirely active process. *Parasite Immunol* *17*, 55-59.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* *285*, 221-227.
- Greening, J.E., Tree, T.I., Kotowicz, K.T., van Halteren, A.G., Roep, B.O., Klein, N.J., and Peakman, M. (2003). Processing and presentation of the islet autoantigen GAD by vascular endothelial cells promotes transmigration of autoreactive T-cells. *Diabetes* *52*, 717-725.
- Grewal, I.S., and Flavell, R.A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* *16*, 111-135.
- 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.
- Guimezanes, A., Barrett-Wilt, G.A., Gulden-Thompson, P., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F., and Schmitt-Verhulst, A.M. (2001). Identification of endogenous peptides recognized by in vivo or in vitro generated alloreactive cytotoxic T lymphocytes: distinct characteristics correlated with CD8 dependence. *Eur J Immunol* *31*, 421-432.
- Haraldsen, G., Sollid, L.M., Bakke, O., Farstad, I.N., Kvale, D., Molberg, Norstein, J., Stang, E., and Brandtzaeg, P. (1998). Major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by human intestinal endothelial cells. *Gastroenterology* *114*, 649-656.
- Heath, W.R., Kurts, C., Miller, J.F., and Carbone, F.R. (1998). Cross-tolerance: a pathway for inducing tolerance to peripheral tissue antigens. *J Exp Med* *187*, 1549-1553.
- Hogg, N., Laschinger, M., Giles, K., and McDowall, A. (2003). T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci* *116*, 4695-4705.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Huang, C.T., Huso, D.L., Lu, Z., Wang, T., Zhou, G., Kennedy, E.P., Drake, C.G., Morgan, D.J., Sherman, L.A., Higgins, A.D., *et al.* (2003). CD4+ T cells pass through an effector phase during the process of in vivo tolerance induction. *J Immunol* *170*, 3945-3953.

- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* *191*, 435-444.
- 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.
- Hugues, S., Boissonnas, A., Amigorena, S., and Fetler, L. (2006). The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. *Curr Opin Immunol* *18*, 491-495.
- Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F., and Amigorena, S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* *5*, 1235-1242.
- Irie, S., Kishimoto, T., and Tavassoli, M. (1988). Desialation of transferrin by rat liver endothelium. *J Clin Invest* *82*, 508-513.
- Irjala, H., Johansson, E.L., Grenman, R., Alanen, K., Salmi, M., and Jalkanen, S. (2001). Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J Exp Med* *194*, 1033-1042.
- Janeway, C.A., Jr. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* *3*, 1167-1171.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* *165*, 302-319.
- Johnston, B., and Butcher, E.C. (2002). Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* *14*, 83-92.
- 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.
- Kanta, J., Dooley, S., Delvoux, B., Breuer, S., D'Amico, T., and Gressner, A.M. (2002). Tropoelastin expression is up-regulated during activation of hepatic stellate cells and in the livers of CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. *Liver* *22*, 220-227.
- Kempka, G., and Kolb-Bachofen, V. (1988). Binding, uptake, and transcytosis of ligands for mannose-specific receptors in rat liver: an electron microscopic study. *Exp Cell Res* *176*, 38-48.
- Khayyamian, S., Hutloff, A., Buchner, K., Grafe, M., Henn, V., Kroczeck, R.A., and Mages, H.W. (2002). ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6198-6203.
- Kim, C.H., and Broxmeyer, H.E. (1999). Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* *65*, 6-15.
- Klas, C., Debatin, K.M., Jonker, R.R., and Krammer, P.H. (1993). Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* *5*, 625-630.
- Klein, I., Cornejo, J.C., Polakos, N.K., John, B., Wuensch, S.A., Topham, D.J., Pierce, R.H., and Crispe, I.N. (2007). Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* *110*, 4077-4085.
- Klugewitz, K., Adams, D.H., Emoto, M., Eulenburg, K., and Hamann, A. (2004). The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends Immunol* *25*, 590-594.
- 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 medical weekly* *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.
- Knolle, P.A., Uhrig, A., Protzer, U., Trippler, M., Duchmann, R., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Gerken, G. (1998). Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* *27*, 93-99.
- Kolanus, W. (2007). Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunol Rev* *218*, 102-113.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., and Seed, B. (1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* *86*, 233-242.
- Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schafer, J., Roos, P., Hulsmann, D., and Kolb, H. (1984). GalNAc/Gal-specific rat liver lectins: their role in cellular recognition. *Biol Cell* *51*, 219-226.
- 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.
- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Balsara, K.R., Riha, M., Gelman, A.E., Popma, S.H., Szeto, W.Y., Turka, L.A., and Rosengard, B.R. (2002). Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol* *169*, 6154-6161.
- 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.
- Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., and Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* *12*, 1145-1155.
- Kurts, C., Heath, W.R., Carbone, F.R., Allison, J., Miller, J.F., and Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* *184*, 923-930.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* *186*, 239-245.
- Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (1998). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* *188*, 409-414.
- Lalor, P.F., Edwards, S., McNab, G., Salmi, M., Jalkanen, S., and Adams, D.H. (2002). Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* *169*, 983-992.
- Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W.J., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S.R., and Rosen, S.D. (1992). An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* *69*, 927-938.
- Lee, J.W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J.E., Cheng, A.C., Yonekura, A.R., Heath, J.K., and Turley, S.J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* *8*, 181-190.

- Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353**, 858-861.
- Lepault, F., Gagnerault, M.C., Faveeuw, C., and Boitard, C. (1994). Recirculation, phenotype and functions of lymphocytes in mice treated with monoclonal antibody MEL-14. *Eur J Immunol* **24**, 3106-3112.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-689.
- Liblau, R.S., Tisch, R., Shokat, K., Yang, X., Dumont, N., Goodnow, C.C., and McDevitt, H.O. (1996). Intravenous injection of soluble antigen induces thymic and peripheral T-cells apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3031-3036.
- 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.
- Liu, G.Y., Fairchild, P.J., Smith, R.M., Prowle, J.R., Kioussis, D., and Wraith, D.C. (1995). Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* **3**, 407-415.
- 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.
- 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.
- Magnusson, S., and Berg, T. (1989). Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells. *The Biochemical journal* **257**, 651-656.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* **2**, 816-822.
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.J., Card, D., Keohane, C., *et al.* (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **296**, 346-349.
- Marelli-Berg, F.M., Scott, D., Bartok, I., Peek, E., Dyson, J., and Lechler, R.I. (2000). Activated murine endothelial cells have reduced immunogenicity for CD8+ T cells: a mechanism of immunoregulation? *J Immunol* **165**, 4182-4189.
- Mathis, D., and Benoist, C. (2004). Back to central tolerance. *Immunity* **20**, 509-516.
- Matsuno, K., and Ezaki, T. (2000). Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph. *Int Rev Cytol* **197**, 83-136.
- McDouall, R.M., Batten, P., McCormack, A., Yacoub, M.H., and Rose, M.L. (1997). MHC class II expression on human heart microvascular endothelial cells: exquisite sensitivity to interferon-gamma and natural killer cells. *Transplantation* **64**, 1175-1180.

- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D.F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* *84*, 92-99.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* *1*, 135-145.
- Mehal, W.Z., Juedes, A.E., and Crispe, I.N. (1999). Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* *163*, 3202-3210.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* *427*, 154-159.
- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., and McEver, R.P. (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* *118*, 445-456.
- Moore, M.W., Carbone, F.R., and Bevan, M.J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* *54*, 777-785.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* *3*, 331-341.
- Muczynski, K.A., Ekle, D.M., Coder, D.M., and Anderson, S.K. (2003). Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *Journal of the American Society of Nephrology* *14*, 1336-1348.
- O'Connell, P.J., Morelli, A.E., Logar, A.J., and Thomson, A.W. (2000). Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 alpha+ lymphoid-related dendritic cells. *J Immunol* *165*, 795-803.
- Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* *65*, 305-317.
- Oldstone, M.B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., and Lewicki, H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* *65*, 319-331.
- Patel, K.D., Cuvelier, S.L., and Wiehler, S. (2002). Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* *14*, 73-81.
- 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.
- 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.
- Pruvot, F.R., Navarro, F., Janin, A., Labalette, M., Masy, E., Lecomte-Houcke, M., Gambiez, L., Copin, M.C., and Dessaint, J.P. (1995). Characterization, quantification, and localization of passenger T lymphocytes and NK cells in human liver before transplantation. *Transpl Int* *8*, 273-279.
- Radvanyi, L.G., Mills, G.B., and Miller, R.G. (1993). Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. *J Immunol* *150*, 5704-5715.
- Rehermann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C., and Chisari, F.V. (1996). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* *2*, 1104-1108.

- Rock, K.L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* *249*, 918-921.
- Rodig, N., Ryan, T., Allen, J.A., Pang, H., Grabie, N., Chernova, T., Greenfield, E.A., Liang, S.C., Sharpe, A.H., Lichtman, A.H., and Freeman, G.J. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol* *33*, 3117-3126.
- Roland, C.R., Mangino, M.J., Duffy, B.F., and Flye, M.W. (1993). Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation* *55*, 1151-1158.
- Roland, C.R., Walp, L., Stack, R.M., and Flye, M.W. (1994). Outcome of Kupffer cell antigen presentation to a cloned murine Th1 lymphocyte depends on the inducibility of nitric oxide synthase by IFN-gamma. *J Immunol* *153*, 5453-5464.
- Sadlack, B., Lohler, J., Schorle, H., Klebb, G., Haber, H., Sickel, E., Noelle, R.J., and Horak, I. (1995). Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* *25*, 3053-3059.
- Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* *101*, 455-458.
- Sancho, D., Yanez-Mo, M., Tejedor, R., and Sanchez-Madrid, F. (1999). Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. *Blood* *93*, 886-896.
- Schaerli, P., and Moser, B. (2005). Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunologic research* *31*, 57-74.
- Schlepper-Schafer, J., Hulsmann, D., Djovkar, A., Meyer, H.E., Herbertz, L., Kolb, H., and Kolb-Bachofen, V. (1986). Endocytosis via galactose receptors in vivo. Ligand size directs uptake by hepatocytes and/or liver macrophages. *Exp Cell Res* *165*, 494-506.
- Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* *65*, 293-304.
- 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. (2005). Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* *6*, 327-330.
- Seternes, T., Sorensen, K., and Smedsrod, B. (2002). Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 7594-7597.
- Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J.M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M.K., Staunton, D.E., von Andrian, U.H., and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* *6*, 497-506.
- 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.
- Shepard, J.L., and Zon, L.I. (2000). Developmental derivation of embryonic and adult macrophages. *Curr Opin Hematol* *7*, 3-8.

- Shi, J., Fujieda, H., Kokubo, Y., and Wake, K. (1996). Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology* 24, 1256-1263.
- Singer, G.G., and Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, 365-371.
- Smedsrod, B., De Bleser, P.J., Braet, F., Loviseti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., and Geerts, A. (1994). Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 35, 1509-1516.
- Smedsrod, B., Pertoft, H., Gustafson, S., and Laurent, T.C. (1990). Scavenger functions of the liver endothelial cell. *The Biochemical journal* 266, 313-327.
- Spengler, U., Lechmann, M., Irrgang, B., Dumoulin, F.L., and Sauerbruch, T. (1996). Immune responses in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 24, 20-25.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Stegmaier, M., Blanks, J.E., Borges, E., and Vestweber, D. (1997). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of mouse bone marrow-derived mast cells on P-selectin but not efficiently on E-selectin. *Eur J Immunol* 27, 1339-1345.
- Stegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B., and Vestweber, D. (1995). The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 373, 615-620.
- 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., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772-4780.
- Stewart, M., and Hogg, N. (1996). Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* 61, 554-561.
- Suda, T., and Nagata, S. (1997). Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity? *J Allergy Clin Immunol* 100, S97-101.
- 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.
- Takao, S., Smith, E.H., Wang, D., Chan, C.K., Bulkley, G.B., and Klein, A.S. (1996). Role of reactive oxygen metabolites in murine peritoneal macrophage phagocytosis and phagocytic killing. *Am J Physiol* 271, C1278-1284.
- Tavassoli, M., Kishimoto, T., and Kataoka, M. (1986). Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *J Cell Biol* 102, 1298-1303.
- Tay, S.S., McCormack, A., Lawson, C., and Rose, M.L. (2003). IFN-gamma reverses the stop signal allowing migration of antigen-specific T cells into inflammatory sites. *J Immunol* 170, 3315-3322.
- Thomson, A.W., O'Connell, P.J., Steptoe, R.J., and Lu, L. (2002). Immunobiology of liver dendritic cells. *Immunology and cell biology* 80, 65-73.

- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296.
- Tomlinson, S. (1993). Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 5, 83-89.
- Tough, D.F., Sun, S., and Sprent, J. (1997). T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* 185, 2089-2094.
- Uhrig, A., Banafsche, R., Kremer, M., Hegenbarth, S., Hamann, A., Neurath, M., Gerken, G., Limmer, A., and Knolle, P.A. (2005). Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol* 77, 626-633.
- 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.
- van Furth, R. (1980). Monocyte origin of Kupffer cells. *Blood Cells* 6, 87-92.
- van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12, 542-547.
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273, 104-106.
- von Andrian, U.H., and Mackay, C.R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343, 1020-1034.
- Vora, M., Yssel, H., de Vries, J.E., and Karasek, M.A. (1994). Antigen presentation by human dermal microvascular endothelial cells. Immunoregulatory effect of IFN-gamma and IL-10. *J Immunol* 152, 5734-5741.
- Walker, L.S., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2, 11-19.
- Wardle, E.N. (1987). Kupffer cells and their function. *Liver* 7, 63-75.
- 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.
- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F.W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-530.
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P.A., Modlin, R.L., Liblau, R.S., Gressner, A.M., and Kaufmann, S.H. (2007). Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26, 117-129.
- Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* 31, 125-150.
- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., and McCuskey, R.S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5, 683-692.
- Wong, J., Johnston, B., Lee, S.S., Bullard, D.C., Smith, C.W., Beaudet, A.L., and Kubes, P. (1997). A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* 99, 2782-2790.

Xu, H., Gonzalo, J.A., St Pierre, Y., Williams, I.R., Kupper, T.S., Cotran, R.S., Springer, T.A., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1994). Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med* *180*, 95-109.

Yamamoto, T., Naito, M., Moriyama, H., Umezu, H., Matsuo, H., Kiwada, H., and Arakawa, M. (1996). Repopulation of murine Kupffer cells after intravenous administration of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Am J Pathol* *149*, 1271-1286.

Zinkernagel, R.M. (1996). Immunology taught by viruses. *Science* *271*, 173-178.

Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* *248*, 701-702.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121-127.

**7. Abbildungsverzeichnis****1. Einleitung**

Abb. 1.1:	Das Multistep Modell der Extravasation.....	4
Abb. 1.2:	Leber Lobulus.....	11
Abb. 1.3:	Das Leber Sinusoid.....	13
Abb. 1.4:	Die Zellen des Sinusoids.....	15
Abb. 1.5:	Der Phänotyp von LSEC.....	16

**4. Ergebnisse**

Abb. 4.1:	Aufnahme von löslichem Antigen in der Leber.....	43
Abb. 4.2:	Expression von Aktivierungsmarkern nach der Ko-Kultur naiver T-Zellen mit LSEC.....	44
Abb. 4.3:	Migration naiver CD8 T-Zellen auf kreuzpräsentierenden LSEC.....	47
Abb. 4.4:	Adhäsionsanalyse naiver CD8 T-Zellen auf kreuzpräsentierenden LSEC.....	48
Abb. 4.5:	Adoptiver Transfer von antigenspezifischen OT-1 CD8 T-Zellen und wildtyp CD8 T-Zellen <i>in vivo</i> .....	49
Abb. 4.6:	Kinetik der antigenspezifischen Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in der Leber.....	50
Abb. 4.7:	Adoptiver Transfer naiver CD8 T-Zellen über 24 Std.....	51
Abb. 4.8:	Adoptiver Transfer naiver CD8 T-Zellen über 48 Std.....	52
Abb. 4.9:	Adoptiver Transfer von antigenspezifischen DesTCR CD8 T-Zellen und wildtyp CD8 T-Zellen <i>in vivo</i> .....	53
Abb. 4.10:	Adoptiver Transfer naiver OT-1 CD8 T-Zellen in ICAM-1 <sup>-/-</sup> Empfängermäuse....	55
Abb. 4.11:	<i>Intravital</i> mikroskopische Analyse der Adhäsion naiver CD8 T-Zellen in Leber und Darm.....	58
Abb. 4.12:	<i>Intravital</i> mikroskopische Analyse der Adhäsion naiver T-Zellen 4 Std. nach adoptivem Transfer.....	59
Abb. 4.13:	Intrahepatische Lokalisation naiver und aktivierter antigenspezifischer CD8 T-Zellen.....	60
Abb. 4.14:	Analyse der Transmigration naiver und aktivierter T-Zellen auf LSEC in einer Parallelflosskammer.....	62
Abb. 4.15:	Adoptiver Transfer aktivierter OT-1 CD8 T-Zellen.....	63
Abb. 4.16:	Rekonstitution der Knochenmarkschimären.....	64
Abb. 4.17:	Adoptiver Transfer naiver OT-1 CD8 T-Zellen in Knochenmarkschimären.....	65
Abb. 4.18:	Kinetik der Expression von CD69 auf adoptiv transferierten naiven CD8 T-Zellen <i>in vivo</i> .....	67
Abb. 4.19:	Funktionelle Analyse der intrahepatisch adhätierenden CD8 T-Zellen.....	69

**5. Diskussion**

## 5. Diskussion

Abb. 5.1: Bedeutung der selektiven Retention naiver CD8 T-Zellen in der Leber für die

## 8. Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	antigen-präsentierende Zelle ( <i>engl.</i> : antigen presenting cell), Allophycocyanin
bidest.	bidestilliert
BM-DC	Knochenmark DC ( <i>engl.</i> : bone marrow DC)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl.</i> : bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Zelloberflächenmarker ( <i>engl.</i> : cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester
D	Dalton
DC	Dendritische Zelle ( <i>engl.</i> : dendritic cell)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Immunglobulins
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ( <i>engl.</i> : fluorescence activated cell sorting)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>engl.</i> : fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>engl.</i> : forward scatter
g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
GBSS	<i>engl.</i> : Gey's Balanced Salt Solution

---

GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor ( <i>engl.</i> : guanine nucleotide exchange factors)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül ( <i>engl.</i> : inter-cellular adhesion molecule)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IS	Immunologische Synapse
I	Liter
LFA-1	funktionelles Leukozytenantigen 1 ( <i>engl.</i> : leukocyte function-associated antigen-1)
LPS	Lipopolysachharid
LSEC	<i>engl.</i> : Liver Sinusoidal Endothelial Cells
MACS	Magnetische Zellsortierung ( <i>engl.</i> : magnetic activated cell sorter)
Min	Minute
mM	Millimolar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>engl.</i> : major histocompatibility complex)
n	nano-
NK	Natürliche Killer-
OVA	Ovalbumin
p	piko-
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>engl.</i> : phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>engl.</i> : rounds per minute)
Rag	<i>engl.</i> : recombination activating gene
RT	Raumtemperatur
rel.	relativ

Sek.	Sekunde
SD	Standardabweichung ( <i>engl.</i> : standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>engl.</i> : standard error of the mean)
spez.	spezifische
SSC	<i>engl.</i> : sideward scatter
stim.	stimuliert
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor ( <i>engl.</i> : T cell receptor)
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ ( <i>engl.</i> : transforming growth factor- $\beta$ )
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
U	Unit (s), Einheit von Enzymaktivität
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen ( <i>engl.</i> : volume to volume)
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen ( <i>engl.</i> : weight to volume)
wt	wildtyp
z.B.	zum Beispiel

---

## DANKE

Mein Dank gilt vor allem Prof. Percy Knolle für die Möglichkeit meine Promotion an seinem Institut anzufertigen und die sehr engagierte Betreuung der Arbeit während dieser Zeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Kolanus für die Übernahme des 2. Vorsitzes der Prüfung. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Fürst und Prof. Kurts für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Im Labor habe ich mich während der letzten Jahre sehr wohl gefühlt und möchte mich bei meinen Kollegen des IMMEIs für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders mit der AG Limmer auf der ‚anderen Seite‘ war immer für eine nette Stimmung gesorgt.

Den ‚Knolle-Mädels‘ möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die viele Hilfe danken: Besonders Linda Diehl hat mich durch ihre ständige Beratung und Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr unterstützt und das Gelingen des Projektes vorangebracht, ihr danke ich sehr. Anna Schurich und Michaela Kern danke ich für die netten gemeinsamen Stunden im IMMEI, der Freundschaft die daraus entstanden ist und die große Hilfsbereitschaft während der letzten Jahre. Auch Silke Hegenbarth möchte ich ganz besonders für ihre viele Hilfe im Labor und ihren Beitrag am Transwell Experiment danken.

Bei Dirk Stabenow möchte ich mich für die Hilfe bei der Anfertigung der konfokalen Bilder bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei den anderen ‚Knolle Jungs‘, Frank Schildberg, Carsten Linnemann, Jan Böttcher und Florian Küpper für die nette Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Meinem Freund Christian Salz danke ich für seine immer vorhandene Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen lieben Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann.