

**Charakterisierung der Induktion von CD8 T Zell-Immunität  
durch sinusoidale Endothelzellen der Leber**

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Michaela Kern  
aus  
Heidelberg

Bonn 2009

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. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 20. Mai 2009  
Erscheinungsjahr: 2009

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 Januar 2006 bis März 2009 von Herrn Prof. Dr. Knolle betreut.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbstständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe.

Bonn, den 19.03.2009

Meinen Eltern

**Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteile folgender Publikationen und Kongressbeiträge:**

**Veröffentlichung:**

Michaela Kern, Alexey Popov, Kai Scholz, Beatrix Schumak, Dominik Djandji, Andreas Limmer, Daniela Eggle, Torsten Sacher, Rainer Zawatzky, Matthias J. Reddehase, Gunther Hartmann, Svenja Debey-Pascher, Linda Diehl, Ulrich Kalinke, Ulrich Koszinowski, Joachim Schultze and Percy Knolle

„Virally infected mouse liver endothelial cells trigger CD8<sup>+</sup> T cell immunity“

*Zur Publikation eingereicht*

**Kongressbeiträge:**

- 2007            Posterpräsentation auf der 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Heidelberg  
Titel: „Viral infection and local immune regulation in the liver“
- 2008            Vortrag auf der „3rd ENII-Mugen Summer School in advanced Immunology“ auf Sardinien  
Titel: „Viral infection functionally matures tolerogenic LSEC for generation of effector CD8 T cells“
- Posterpräsentation auf der „3rd ENII-Mugen Summer School“  
Titel: „Viral infection of antigen-presenting LSEC leads to the generation of effector CD8 T cells“
- 2009            Posterpräsentation auf der 25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL)  
Titel: „Viral infection of liver endothelial cells triggers CD8 T cell immunity“

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Das Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das angeborene (innate) Immunsystem .....	1
1.2 Das erworbene (adaptive) Immunsystem.....	2
1.3 Die Rolle antigen-präsentierender Zellen.....	3
1.3.1 Die Präsentation von Antigen auf MHC-Molekülen .....	4
1.3.2 Die Maturierung von DC .....	4
1.4 Die Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem .....	5
1.4.1 TLR an der Zelloberfläche.....	7
1.4.2 Intrazelluläre TLR.....	7
1.4.3 Signalweiterleitung nach TLR-Stimulation .....	8
1.5 Die Aktivierung von T Zellen .....	9
1.5.1 Der T Zell-Rezeptor (TCR).....	9
1.5.2 Die Aktivierung von T Zellen durch APC .....	10
1.5.3 Die T Effektorzellen .....	10
<b>2. Die Induktion von T Zell-Toleranz .....</b>	<b>11</b>
2.1 Die zentrale Toleranz.....	12
2.2 Die periphere Toleranz .....	13
2.2.1 Ignoranz, Anergie und Deletion .....	13
2.2.2 Regulatorische T Zellen .....	14
<b>3. Die lokale Immunregulation in der Leber.....</b>	<b>16</b>
3.1 Die Mikroanatomie der Leber .....	16
3.2 Die Zellpopulationen der Leber .....	17
3.3 Die Induktion von Toleranz in der Leber .....	19
3.3.1 Das Mikromilieu der Leber .....	19
3.3.2 Die Induktion von Toleranz in T Zellen durch LSEC .....	19
3.3.3 Die Induktion von Immunantworten in der Leber.....	20
<b>II. FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>21</b>
<b>III. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
<b>1. Material.....</b>	<b>22</b>

1.1 Geräte .....	22
1.2 Verbrauchsmaterialien .....	23
1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	24
1.4 Allgemeine Lösungen .....	25
1.4.1 Medien .....	25
1.4.2 Puffer .....	26
1.5 Antikörper .....	28
1.6 Weitere Fluorochrome .....	29
1.7 Magnetische Kügelchen (MACS-Beads).....	29
1.8 Enzyme .....	29
1.9 PRR-Liganden .....	29
1.10 Inhibitoren .....	30
1.11 Primer .....	30
1.12 Viren.....	30
1.13 Zelllinien.....	30
1.14 Mauslinien.....	31
<b>2. Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.1 Zellisolation.....	31
2.1.1 Die Isolation von Zellpopulationen über magnetische Zellseparation (MACS) .....	31
2.1.2 Die Isolation von Zellen aus der Leber.....	32
2.1.3 Die Isolation von primären Zellen aus der Milz und Lymphknoten .....	34
2.1.4 Die Generierung von CD11c <sup>+</sup> DC aus dem Knochenmark (BM-DC).....	35
2.2 Zellzahlbestimmung .....	36
2.3 Produktion von GM-CSF .....	36
2.4 Infektion mit MCMV.....	37
2.4.1 Produktion von MCMV.....	37
2.4.2 Bestimmung des Virustiters durch Plaque-Test .....	37
2.4.3 Infektion von LSEC mit MCMV .....	38
2.5 Transfektion von LSEC .....	38
2.6 Durchflusszytometrie .....	39
2.6.1 Markierung von Oberflächenantigenen .....	40
2.6.2 Intrazelluläre Färbung von Antigenen .....	40
2.6.3 Zellmarkierung mit CFSE .....	41
2.7 <i>In vitro</i> Ko-Kultur und Analyse von T Zell-Funktionen .....	41
2.8 ELISA .....	42
2.8.1 IFN- $\gamma$ ELISA.....	42
2.8.2 IFN- $\beta$ ELISA .....	43
2.9 <i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest .....	43
2.10 Gen-Expressionsanalysen .....	43
2.11 Generierung von Knochenmarkschimären.....	44

2.12 Analyse der Effektorfunktionen von T Zellen <i>in vivo</i> .....	45
2.12.1 Restimulation der T Zellen <i>ex vivo</i> .....	45
2.12.2 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest .....	45
2.13 Statistische Analysen.....	46
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
1. LSEC exprimieren „Pattern-Recognition“-Rezeptoren .....	47
2. Die Induktion von CD8 T Zell-Toleranz wird nach Stimulation mit PRR-Liganden aufrechterhalten.....	50
2.1 Nach Stimulation der PRR zeigen LSEC keine phänotypische Maturierung.....	50
2.2 Nach Stimulation von PRR in LSEC wird CD8 T Zell-Toleranz induziert .....	51
3. Die Infektion von LSEC mit MCMV .....	54
4. MCMV-infizierte LSEC induzieren die Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen.....	56
5. LSEC induzieren CD8 T Zell-Aktivierung unabhängig von CD80/86.....	61
6. MCMV-infizierte LSEC induzieren CD8 T Zell-Immunität <i>in vivo</i> .....	65
<b>V. DISKUSSION.....</b>	<b>70</b>
1. LSEC induzieren CD8 T Zell-Toleranz nach Stimulation mit spezifischen Liganden für PRR .....	70
2. Virus-infizierte LSEC vermitteln die Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen.....	72
3. Die LSEC-vermittelte Aktivierung von CD8 T Zellen ist unabhängig von CD80/86.....	77
4. MCMV-infizierte LSEC induzieren CD8 T Zell-Immunität <i>in vivo</i> .....	79
<b>VI. REFERENZEN.....</b>	<b>83</b>
<b>VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>VIII. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>94</b>



## Zusammenfassung

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion der peripheren Toleranz. Hierbei sind die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) von großer Bedeutung, welche mit CD8 T Zellen interagieren und in diesen T Zell-Toleranz induzieren. Bisher war es jedoch unbekannt, ob LSEC als antigen-präsentierende Zellen auch zu der Induktion von Immunität in der Leber beitragen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LSEC die notwendigen „Pattern-Recognition“-Rezeptoren (PRR) für die Erkennung von Pathogenen funktionell exprimierten, was sich in der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zeigte. Jedoch konnte keine Aktivierung von CD8 T Zellen durch LSEC, welche zuvor mit spezifischen Liganden für PRR stimuliert wurden, beobachtet werden. Diese LSEC induzierten weiterhin einen toleranten Phänotyp in CD8 T Zellen. Es konnte zudem belegt werden, dass LSEC von dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) infiziert wurden, wobei es anschließend zu einer Aktivierung von naiven CD8 T Zellen kam, welche in zytotoxische IFN- $\gamma$ -produzierende Effektorzellen differenzierten. Dies lässt darauf schließen, dass LSEC nach einer viralen Infektion in der Lage sind, funktionell zu reifen und anschließend zu der Induktion von Immunität beitragen. Als möglicher Mechanismus für diese Reifung konnte eine synergetische Aktivierung zweier Signalwege über „Toll-like“ Rezeptoren und cAMP aufgezeigt werden. Die Signale, welche eine T Zell-Aktivierung durch virusinfizierte LSEC induzierten, waren unabhängig von den ko-stimulatorischen Molekülen CD80/86 und IL-12 und weisen darauf hin, dass sich der Mechanismus der LSEC-vermittelten T Zell-Aktivierung von demjenigen durch funktionell mature DC unterscheidet. Des Weiteren konnte durch den Gebrauch von Knochenmarkschimären gezeigt werden, dass LSEC *in vivo* in der Lage waren, eine zytotoxische CD8 T Zell-Immunantwort nach einer MCMV-Infektion zu induzieren und dass dies auch *in vivo* unabhängig von CD80/86 erfolgte. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Rolle von LSEC bei der Regulation lokaler Immunantworten näher charakterisiert werden.

## Abstract

The liver supports the maintenance of peripheral tolerance rather than inducing immunity. Liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) play a key role in this process because they are capable to interact with CD8 T cells resulting in the induction of immune tolerance. However, nothing is known so far about the contribution of antigen-presenting LSEC to the induction of local immune responses in the liver. Here, we demonstrate that LSEC functionally expressed numerous pattern-recognition receptors allowing them to recognize pathogens. Stimulation of these receptors resulted in the production of pro-inflammatory cytokines that attributed sentinel function, but activation was not sufficient to overcome tolerance induction in CD8 T cells. However, viral infection of LSEC with murine cytomegalovirus (MCMV) promoted antigen-specific differentiation of naive CD8 T cells into cytotoxic IFN- $\gamma$ -producing effector cells. This suggests that LSEC functionally matured upon infection and thus can contribute to the induction of local immunity. We provide evidence that the signalling pathways via Toll-like receptors and the second messenger cAMP may act synergistically on the process of maturation in LSEC. Moreover, LSEC-mediated T cell activation occurred in the absence of the costimulatory molecules CD80/86 and IL-12, which supports the notion that T cell activation by LSEC differs from that mediated by DC. Furthermore, we showed that LSEC were also capable to induce an effective cytotoxic immune response after MCMV-infection *in vivo* in the absence of DC or macrophages, which was again independent of CD80/86. Taken together we demonstrate that LSEC participate in the induction of local immune responses in the liver by activating CD8 T cells after a viral infection.

# I. Einleitung

## 1. Das Immunsystem

Die physiologische Funktion des Immunsystems ist der Schutz und die Verteidigung des Organismus gegen eindringende Krankheitserreger und Mikroben. In Säugetieren lässt sich das Immunsystem in zwei Bestandteile gliedern: 1. Das angeborene (innate) Immunsystem bildet die erste Verteidigung und ermöglicht eine schnelle Reaktion auf das Pathogen, wobei ein Großteil hierdurch bereits eliminiert wird. 2. Das erworbene (adaptive) Immunsystem macht die zweite Verteidigungslinie aus, welche später erfolgt, jedoch hochspezifisch und sehr effizient gegen das Pathogen wirkt.

### 1.1 Das angeborene (innate) Immunsystem

Das innate Immunsystem besteht allgemein aus zellulären und biochemischen Komponenten, welche schnell auf Pathogene reagieren können:

- a) Physikalische und chemische Barrieren dienen dazu, das Eindringen von Mikroben in den Organismus zu verhindern, wobei zu den physikalischen Barrieren unter anderem die Haut und der Darm zählen. Chemische Barrieren sind Stoffe, die antimikrobielle Eigenschaften haben und auf physikalischen Barrieren zu finden sind, z.B. Defensine oder Lysozyme.
- b) Zelluläre Komponenten, zu denen hauptsächlich phagozytierende Zellen wie Neutrophile oder Makrophagen zählen, nehmen Mikroben aus dem Blut oder dem Gewebe auf und zerstören sie.
- c) Proteine, die im Blut vorkommen dienen als Mediatoren einer Entzündung. Dazu gehören unter anderem das Komplementsystem oder die Akut-Phase Proteine, die in der Leber von Hepatozyten gebildet werden.
- d) Eine weitere Klasse von Proteinen, die Zytokine, werden von verschiedenen Zellen des Organismus gebildet und haben unterschiedliche Funktionen. Sie dienen aber im Allgemeinen der Regulation und Koordination einzelner Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Das innate Immunsystem ist hoch konserviert (Hoffmann et al., 1999) und erkennt bestimmte Strukturen von Mikroben, die nicht in Säugetieren vorkommen (PAMP<sup>1</sup>)

---

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

(Janeway and Medzhitov, 2002). Die Rezeptoren, die solche Strukturen erkennen, bezeichnet man als „Pattern-Recognition“-Rezeptoren (PRR) und werden von professionellen antigen-präsentierenden Zellen exprimiert (Banchereau and Steinman, 1998; Reis e Sousa, 2001). Nach Aktivierung stimuliert das innate Immunsystem die adaptive Immunantwort durch die Sekretion bestimmter Zytokine (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Somit agieren beide Immunsysteme nicht unabhängig voneinander, sondern üben gemeinsam ihre Funktion aus.

## 1.2 Das erworbene (adaptive) Immunsystem

Kann das innate Immunsystem das Pathogen nicht vollständig eliminieren, kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Diese Immunantwort ist hoch spezifisch gegen Proteine des Pathogens gerichtet und hat die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis (*engl.* Memory) zu entwickeln. Bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen kann daher eine schnellere und effizientere Immunantwort generiert werden (Kaech et al., 2002a; Kaech et al., 2002b). Mit der Zeit erwirbt der Organismus ein Repertoire an Gedächtniszellen, weshalb dieser Teil als „erworbene“ Immunität bezeichnet wird.

Es gibt zwei verschiedene Arten der adaptiven Immunantwort: 1. Die humorale Immunantwort wird durch B Lymphozyten und ihre Antikörper vermittelt, welche hauptsächlich gegen extrazelluläre Pathogene und Toxine gerichtet sind oder an lösliche Proteine binden. 2. Die zell-vermittelte Immunantwort wird durch T Lymphozyten generiert und kommt vor allem bei intrazellulären Pathogenen zum Tragen. Hierbei unterscheidet man CD4 T Zellen und CD8 T Zellen. Da es bei Pathogenen in einem Organismus meistens extra- und intrazelluläre Stadien gibt, werden sowohl die humorale als auch die zell-vermittelte Immunantwort oftmals parallel induziert, um eine effiziente Eliminierung des Pathogens zu gewährleisten.

Eine adaptive Immunantwort kann generell in vier Stadien unterteilt werden. Die erste Phase ist die initiale Erkennung des Antigens durch die T Zelle, wobei jede T Zelle nur ein spezifisches Peptid durch ihren T Zell-Rezeptor (TCR<sup>2</sup>) erkennen kann. Das Peptid muss auf MHC<sup>3</sup>-Molekülen auf der Zelloberfläche antigen-präsentierender Zellen (APC<sup>4</sup>) präsentiert werden. T Zellen können somit kein lösliches Antigen erkennen, sondern nur solches, das an der Zelloberfläche gebunden ist. Die zweite Phase zeichnet sich durch die eigentliche Aktivierung der T Zellen durch die APC aus. Dies

---

<sup>2</sup> *engl.* T cell receptor

<sup>3</sup> *engl.* major histocompatibility complex

<sup>4</sup> *engl.* antigen-presenting cells

resultiert in der Synthese neuer Proteine, in der Teilung (Proliferation) und anschließend in der Differenzierung der T Zelle in eine Effektorzelle. Die Proliferation geht mit einer massiven Expansion der T Zellen einher, so dass genügend Effektorzellen vorhanden sind, um die Infektion zu beseitigen (Butz and Bevan, 1998; Doherty, 1998). Die dritte Phase dient der eigentlichen Eliminierung des Antigens und somit des Erregers, wobei oftmals auch Bestandteile der angeborenen Immunantwort mit einfließen. Die vierte und letzte Phase einer Immunantwort findet nach der Eliminierung des Pathogens statt, wobei die Immunantwort abgeschwächt und das Gleichgewicht der einzelnen zellulären Komponenten wieder hergestellt wird. Dies wird vor allem durch die Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) reguliert, so dass die meisten der vorher expandierten Lymphozyten wieder eliminiert werden. Ein Teil der Lymphozyten bleibt jedoch als Gedächtniszellen in einem ruhenden Stadium zurück, die bei einer erneuten Infektion des gleichen Pathogens aktiviert werden (Williams and Bevan, 2007; Wong and Pamer, 2003).

Für eine effiziente Immunantwort interagieren die Komponenten des angeborenen mit denjenigen des adaptiven Immunsystems, wobei APC eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von T Zellen spielen.

### **1.3 Die Rolle antigen-präsentierender Zellen**

Antigen-präsentierende Zellen sind spezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems, die Antigene aus der Umgebung aufnehmen und an Lymphozyten präsentieren können. Professionelle APC können eine Infektion über PRR als solche erkennen und zusätzlich Signale bereitstellen, die T Zellen aktivieren. Hierbei spielen Dendritische Zellen (DC<sup>5</sup>) eine besondere Rolle, jedoch sind Makrophagen und B Zellen ebenfalls APC. DC sind normalerweise unter Epithelien und in den meisten Organen lokalisiert, wo sie kontinuierlich Antigen aus der Umgebung über Endozytose aufnehmen. Da sie hauptsächlich dort vorkommen, wo Mikroben in den Organismus eindringen können, spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Immunität (Banchereau and Steinman, 1998; Jung et al., 2002; Lenz et al., 2000; Probst and van den Broek, 2005).

---

<sup>5</sup> *engl.* dendritic cells

### 1.3.1 Die Präsentation von Antigen auf MHC-Molekülen

Wie bereits unter 1.2 erwähnt, können T Zellen ihr Antigen nur in Form eines Peptids gebunden an MHC-Moleküle erkennen. Es gibt zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen, MHC-I und MHC-II. MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen eines Organismus exprimiert, wohingegen MHC-II-Moleküle nur auf APC des Immunsystems vorkommen. MHC-Moleküle binden ein breites Spektrum von Peptiden, so dass gewährleistet wird, dass jedes mögliche Antigen an T Zellen präsentiert werden kann.

Auf MHC-I-Molekülen werden zumeist endogene Peptide präsentiert, die zytoplasmatischen Ursprungs sind und somit auch Selbst-Antigene darstellen. Im Falle einer Infektion der Zelle werden jedoch zusätzlich Fremd-Antigene auf MHC-I-Molekülen gebunden, die von spezifischen CD8 T Zellen erkannt werden. Da praktisch jede Zelle eines Organismus von z.B. einem Virus infiziert werden kann, ist es sinnvoll, dass jede Zelle auch MHC-I-Moleküle exprimiert. Trifft eine aktivierte CD8 T Zelle ihr Antigen auf einer infizierten Zelle, kann sie diese eliminieren und so zur Beseitigung der Infektion beitragen (Wong and Pamer, 2003).

Im Gegensatz dazu werden MHC-II-Moleküle nur auf APC exprimiert und binden Peptide, welche exogen aus der Umgebung aufgenommen wurden und von CD4 T Zellen erkannt werden. CD4 T Zellen sind so genannte T Helfer Zellen, welche durch die Sekretion von Zytokinen die Proliferation und Differenzierung von weiteren T Zellen stimulieren und aktivierend auf andere Zellen des Immunsystems wirken.

Die Aktivierung einer T Zelle kann nur durch APC erfolgen, wobei die APC jedoch oftmals nicht selbst von dem Pathogen infiziert wurde. Um dennoch die Induktion einer Immunantwort zu garantieren, können APC exogenes Antigen, welches von einer anderen, infizierten Zelle stammt, aufnehmen und auf MHC-I-Molekülen an CD8 T Zellen präsentieren, was als Kreuzpräsentation bezeichnet wird (Heath and Carbone, 2001). Dadurch können CD8 T Zellen aktiviert werden, und anschließend zu der Eliminierung des Erregers beitragen.

### 1.3.2 Die Maturierung von DC

DC sind professionelle APC, welche effizient Antigen aus der Umgebung aufnehmen können. Zudem sind sie mit PRR ausgestattet, so dass sie die Möglichkeit haben, Pathogene in Form von PAMP zu erkennen. DC, welche im peripheren Gewebe lokalisiert sind, bezeichnet man als unreife oder immature Zellen. Kommen DC in Kontakt mit Mikroorganismen, welche sie durch PRR als solche erkennen, durchlaufen

sie einen Reifungsprozess in mature APC. Charakteristisch hierfür ist ihre Migration aus dem Gewebe zu dem nächsten Lymphknoten, wobei ihre Fähigkeit, weiter Antigen aufzunehmen, stark eingeschränkt ist. Dafür exprimieren sie verstärkt das vorher aufgenommene Antigen auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen, so dass sie effizient mit T Zellen im Lymphknoten interagieren können. Des Weiteren wird die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche erhöht, welche für die Aktivierung von T Zellen essentiell sind. CD80/86 gehören zu der Proteinklasse der B7 Proteine (B7.1 und B7.2) und werden auf professionellen APC exprimiert. Eine voll ausgereifte APC sezerniert zudem eine Reihe von Zytokinen, z.B. Interleukin- (IL-) 12 (Trinchieri, 2003) oder Typ I-Interferon (IFN), welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Differenzierung von T Zellen spielen. Da nur matura APC in der Lage sind, T Zellen zu stimulieren, wird gewährleistet, dass eine Immunantwort nur dann induziert wird, wenn eine Infektion vorliegt. So können Schäden gegen z.B. Selbst-Antigene verhindert werden. Der entscheidende Punkt liegt hierbei bei der APC und dem adäquaten Stimulus, welcher in Form von PAMP über PRR erkannt wird und eine Reifung in diesen Zellen induziert.

#### **1.4 Die Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem**

Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen konservierte Strukturen von Pathogenen, die bei Säugetieren nicht vorkommen (PAMP) durch entsprechende Rezeptoren, den PRR (Janeway and Medzhitov, 2002). So wird es ermöglicht, zwischen „fremd“ und „selbst“ zu unterscheiden. Zellen, welche PRR exprimieren, sind neben DC auch Makrophagen, Mastzellen, Neutrophile, Eosinophile und Natürliche Killer (NK) Zellen. Nach der Erkennung von mikrobiellen Strukturen differenzieren diese Zellen in kurzlebige Effektorzellen, wobei insbesondere DC anschließend Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren.

PRR können entweder sezerniert werden, an der Zelloberfläche, in intrazellulären Kompartimenten oder im Zytoplasma vorkommen. Sezernierte PRR sind z.B. das mannan-bindende Lektin (MBL) oder das C-reaktive Protein (CRP), welche bei der Akut-Phase Antwort der Leber entstehen, mikrobielle Bestandteile erkennen und daran binden (Gewurz et al., 1982).

An der Zelloberfläche befinden sich unter anderem solche PRR, welche Phagozytose oder Endozytose vermitteln, wie z.B. der Mannose-Rezeptor der Makrophagen

(MMR<sup>6</sup>), welcher Bakterien erkennt, was schließlich zu deren Aufnahme in die Zelle führt (Fraser et al., 1998). Zu dieser Klasse gehören auch die „Scavenger“-Rezeptoren, welche die Aufnahme verschiedener Komponenten von Bakterien durch z.B. Makrophagen bewirken (Pearson, 1996).

Die bekanntesten PRR sind die „Toll-like“ Rezeptoren (TLR), welche sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär vorkommen und ein breites Spektrum von viralen und bakteriellen PAMP erkennen (Tabelle 1) (Janeway and Medzhitov, 2002). Das Protein Toll wurde zunächst in *Drosophila* als wichtiger Bestandteil bei der Entstehung der dorso-ventralen Achse während der Larvenentwicklung beschrieben (Hashimoto et al., 1988). Wenig später zeigte sich zudem eine Rolle von Toll bei der Induktion von Immunantworten in *Drosophila* (Lemaitre et al., 1996), wobei eine Reihe von Homologen auch in Säugetieren vorkommen (TLR 1-13) und dort entscheidend für die Induktion von Immunität sind.

**Tabelle 1:** Gezeigt sind TLR1-9 und eine Auswahl ihrer natürlichen und synthetischen Liganden (verändert nach (Akira and Takeda, 2004)).

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1	Lipopeptide	Bakterien
TLR2	Lipoproteine	Verschiedene Pathogene
	Peptidoglykan	Gram-positive Bakterien
	Zyosan	Pilze
	Pam <sub>3</sub> Cys	Synthetisch
TLR3	dsRNA	Viren
	polyIC	Synthetisch
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Zyosan	Pilze
TLR7	ssRNA	Viren
	9.2s RNA	Synthetisch
	Imidazoquinolin	Synthetisch
TLR8	ssRNA	Viren
	Imidazochinolin	Synthetisch
TLR9	DNA	Bakterien, Viren
	CpG DNA	Synthetisch

dsRNA: doppelsträngige RNA; LPS: Lipopolysaccharid; polyIC: *engl.* poly-inosinic acid-cytidylic acid; TLR: „Toll-like“ Rezeptoren; ssRNA: einzelsträngige RNA

<sup>6</sup> *engl.* macrophage mannose receptor



### 1.4.1 TLR an der Zelloberfläche

TLR, welche Strukturen von Bakterien erkennen, sind zumeist an der Zelloberfläche lokalisiert. TLR2 erkennt hierbei die größte Anzahl bakterieller Liganden (siehe auch Tabelle 1) (Takeuchi et al., 1999), wobei TLR2 mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere bildet (Ozinsky et al., 2000). TLR4 bindet an Lipopolysaccharide (LPS), welches ein essentieller Bestandteil in der Zellwand gram-negativer Bakterien ist (Medzhitov et al., 1997).

### 1.4.2 Intrazelluläre TLR

TLR, welche intrazellulär vorkommen, sind zumeist in Endosomen lokalisiert (Latz et al., 2004; Matsumoto et al., 2003) und erkennen Nukleinsäuren von eindringenden Bakterien oder Viren, wie z.B. doppel- oder einzelsträngige RNA (dsRNA oder ssRNA<sup>7</sup>) (Kawai and Akira, 2006). Die Erkennung von einigen Viren erfolgt durch TLR3, welcher dsRNA oder das synthetische Analog polyIC<sup>8</sup> bindet (Alexopoulou et al., 2001). dsRNA fällt bei Viren während der Replikation an, und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Erkennung des murinen Cytomegalovirus (MCMV) durch DC (Tabeta et al., 2004). Da DC nicht immer selbst infiziert werden, können sie apoptotische Körperchen von infizierten Zellen aufnehmen und die darin enthaltende virale RNA kann daraufhin an TLR3 binden, was zu einer Reifung der DC und zu einer verstärkten Kreuzpräsentation von Antigenen an CD8 T Zellen führt (Schulz et al., 2005). Somit kann über TLR3 eine spezifische Immunantwort gegen Viren induziert werden, welche nicht direkt DC infizieren.

TLR7 und TLR8 erkennen ssRNA und ihre synthetischen Analoge (Diebold et al., 2004). TLR7 und TLR8 sind in der Maus identisch und werden von DC exprimiert, welche hauptsächlich bei der Induktion von antiviralen Immunantworten eine Rolle spielen (Colonna et al., 2004; Hornung et al., 2005). TLR8 beim Menschen ist für die Erkennung einiger einzelsträngiger RNA-Viren wichtig (Heil et al., 2004). TLR9 erkennt und bindet DNA, wenn diese in Endosomen gelangt (Barton et al., 2006; Hemmi et al., 2000). TLR9 bindet bakterielle und virale DNA, wobei er ebenso wie TLR3 eine essentielle Rolle bei der Erkennung von MCMV spielt (Krug et al., 2004).

Bakterien und Viren, welche eine Zelle infizieren, setzen ihre Nukleinsäure oftmals in das Zytoplasma frei. Für die Erkennung von intrazellulären Bakterien spielen NOD-

---

<sup>7</sup> engl. single-stranded RNA

<sup>8</sup> engl. poly-inosinic acid-cytidylic acid

Proteine<sup>9</sup> eine wichtige Rolle (Inohara et al., 1999). Bei der Erkennung von zytoplasmatischen Viren spielen Rezeptoren eine Rolle, welche zum einen virale RNA (RIG-I<sup>10</sup> und Mda5<sup>11</sup>) (Andrejeva et al., 2004; Hornung et al., 2006; Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004) und zum anderen virale DNA (ZBP1<sup>12</sup>) (Ishii et al., 2006; Takaoka et al., 2007) erkennen können.

### 1.4.3 Signalweiterleitung nach TLR-Stimulation

Nach Bindung des entsprechenden Liganden wird das Adaptermolekül MyD88<sup>13</sup> von allen TLR außer TLR3 rekrutiert (Medzhitov et al., 1998), welches an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors bindet (Akira and Takeda, 2004; Barton and Medzhitov, 2003). Zusätzlich können noch weitere Adapter wie TIRAP<sup>14</sup> (Hornung et al., 2001) oder TRAM<sup>15</sup> (Yamamoto et al., 2003b) in Kombination mit MyD88 an TLR binden. Es erfolgt eine Signalweiterleitung über mehrere Moleküle, welche in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB<sup>16</sup> resultiert (Hiscott et al., 2001). NFκB translokalisiert daraufhin in den Nukleus und induziert die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, die für die Regulation einer Immunantwort wichtig sind (Bonizzi and Karin, 2004). Zudem wird durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3<sup>17</sup> und IRF7 eine Typ I-IFN-Antwort (IFN-α und IFN-β) induziert (Moynagh, 2005; Taniguchi et al., 2001), welche eine Schlüsselrolle bei antiviralen Immunantworten spielt (Le Bon and Tough, 2002; Theofilopoulos et al., 2005). Typ I-IFN können z.B. die Reifung von DC bewirken und somit die Induktion einer adaptiven Immunantwort verstärken (Shirota et al., 2006). Des Weiteren werden durch Typ I-IFN Gene induziert, welche die Virusabwehr der Zelle vermitteln.

Die Signalweiterleitung bei TLR3 verläuft ausschließlich über das Adaptermolekül TRIF<sup>18</sup> (Yamamoto et al., 2003a), welches nach Bindung des Liganden eine MyD88-unabhängige Aktivierung von NFκB und Typ I-IFN bewirkt (Hoebe et al., 2003). Dies trägt auch hier zu einer antiviralen Immunantwort bei, da die Kreuzpräsentation von viralen Antigenen durch DC verstärkt wird.

<sup>9</sup> *engl.* nucleotide-binding oligomerization domain

<sup>10</sup> *engl.* retinoic acid-inducible gene I

<sup>11</sup> *engl.* melanoma differentiation-associated gene 5

<sup>12</sup> *engl.* Z-DNA binding protein 1

<sup>13</sup> *engl.* myeloid differentiation primary-response gene 88

<sup>14</sup> *engl.* Toll/IL-1R (TIR)-domain-containing adaptor protein

<sup>15</sup> *engl.* TRIF-related adaptor molecule

<sup>16</sup> *engl.* nuclear factor κB

<sup>17</sup> *engl.* IFN-regulatory factor

<sup>18</sup> *engl.* TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β

Eine Besonderheit von TLR4 besteht darin, dass sowohl MyD88 als auch TRIF an TLR4 binden können und über beide Komponenten Signale weitergeleitet werden, was zu der Aktivierung von NF $\kappa$ B und einer Typ I-IFN-Antwort führt (Fitzgerald et al., 2003). Zusammengenommen führt die Erkennung von Pathogenen über PRR durch DC zu einer Maturierung dieser Zellen. Dies resultiert in einer effektiven Immunantwort durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Reis e Sousa, 2004; Sporri and Reis e Sousa, 2005).

## 1.5 Die Aktivierung von T Zellen

T Zellen stammen von Stammzellen des Knochenmarks ab, wandern in den Thymus, wo sie gegen Selbst-MHC-Moleküle und Fremd-Peptide selektioniert werden (siehe dazu auch Punkt 2), bevor sie in die Peripherie gelangen und dort für die Vermittlung der adaptiven Immunantwort sorgen.

### 1.5.1 Der T Zell-Rezeptor (TCR)

Die Erkennung eines Peptids wird durch den TCR auf der Oberfläche der T Zellen festgelegt, wobei jede T Zelle nur einen TCR gegen ein spezifisches Peptid exprimiert. Da es eine sehr große Anzahl an möglichen Fremd-Peptiden gibt (ca.  $10^7$  bis  $10^9$ ), müssen diese durch das TCR-Repertoire vertreten sein, um einen umfassenden Schutz gegen Pathogene zu gewährleisten (Goldrath and Bevan, 1999). Die Gene, welche den TCR kodieren, bestehen aus verschiedenen Gensegmenten, die unabhängig voneinander und zufällig miteinander kombiniert werden können (somatische Rekombination) (Thompson, 1995). Dieser Vorgang führt zu einem TCR-Repertoire, welches die Vielfalt an möglichen Fremd-Peptiden widerspiegelt.

Der TCR erkennt Peptide, welche an einem MHC-Molekül gebunden sind. T Zellen, die den Thymus verlassen, exprimieren zusätzlich entweder den Ko-Rezeptor CD4 oder CD8, wobei CD4 an MHC-II- und CD8 an MHC-I-Moleküle bindet. So wird die Spezifität der T Zelle für ein bestimmtes MHC-Molekül determiniert.

Nachdem die T Zellen den Thymus verlassen haben, besiedeln sie als naive Zellen, die noch keinen Kontakt zu ihrem Antigen hatten, die sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten oder Milz, und zirkulieren durch den Organismus, bis sie Kontakt mit einer APC haben, welche ihr spezifisches Peptid an ihrer Oberfläche präsentiert (Mackay, 1993). Die Halbwertszeit einer T Zelle in der Maus beträgt ca. 1-3 Monate. Trifft sie in dieser Zeitspanne nicht auf ihr Antigen, wird die T Zelle wieder

eliminiert. So entsteht ein Gleichgewicht aus der Generierung neuer T Zellen aus dem Thymus und der Eliminierung von T Zellen, die nicht gebraucht werden.

### 1.5.2 Die Aktivierung von T Zellen durch APC

Da T Zellen durch das lymphatische Gewebe zirkulieren, können sie dort auf eine ausgereifte APC treffen, welche ihr spezifisches Antigen auf MHC-Molekülen gebunden hat. Die Aktivierung von T Zellen erfolgt über die Bereitstellung dreier Signale durch die APC: Signal 1 ist die Erkennung über den TCR, wobei eine antigenspezifische Aktivierung der T Zelle sichergestellt wird. Signal 2 wird von der APC in Form ko-stimulatorischer Moleküle wie CD80/86 bereitgestellt, welche an CD28 auf der T Zelle binden. Durch eine kombinatorische Stimulation über den TCR und CD28 erhält die T Zelle zwei Überlebenssignale (Boise et al., 1995), zum anderen wird die Produktion bestimmter Zytokine und deren Rezeptoren angeregt (Carreno and Collins, 2002). Ein Beispiel hierfür ist die Produktion des Zytokins IL-2 und die verstärkte Expression einer Kette des IL-2-Rezeptors (CD25;  $\alpha$ -Kette). IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für die T Zelle, welcher autokrin wirkt und die Proliferation der Zelle unterstützt (Malek, 2008). Durch die Aktivierung der T Zellen werden zusätzlich Signale induziert, welche ihrerseits wieder auf die APC wirken und eine weitere Stimulierung zur Folge haben. Dies ist z.B. die Expression von CD40L, welcher nach initialer Stimulation der CD4 T Zelle von dieser exprimiert wird. CD40L bindet an CD40 an der Oberfläche der APC und induziert eine verstärkte Expression von CD80/86. Diese positive Rückkopplung sorgt für eine anhaltende Interaktion der APC und der T Zelle, so dass eine starke Aktivierung der T Zelle erfolgen kann (Quezada et al., 2004). Dafür ist zudem das Zytokin IL-12 notwendig, welches von voll ausgereiften DC sezerniert wird und als Signal 3 über den entsprechenden Rezeptor auf die T Zelle wirkt (Trinchieri, 2003). IL-12 als Signal 3 kann durch Typ I-IFN ersetzt werden, welches hauptsächlich nach einer viralen Infektion produziert wird (Curtsinger et al., 1999; Curtsinger et al., 2005; Kolumam et al., 2005). Nur wenn alle drei Signale zusammen vorhanden sind, kommt es zu einer Differenzierung der T Zellen in Effektorzellen (Curtsinger et al., 2003).

### 1.5.3 Die T Effektorzellen

Nachdem T Zellen mit einer ausgereiften APC interagiert haben, kommt es zu deren Differenzierung in Effektorzellen. Dabei unterscheidet man CD4- und CD8

Effektorzellen. CD4 T Zellen differenzieren in T Helfer- ( $T_H$ ) Zellen, wobei man hier verschiedene Subtypen ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  oder  $T_{H17}$ ) unterscheidet (Bettelli et al., 2008; Moser and Murphy, 2000). Welcher Subtyp sich differenziert, hängt von den von der APC produzierten Zytokinen zusammen, die wiederum abhängig sind von der Art des Pathogens, welches erkannt wird.  $T_H$  Zellen sezernieren im betroffenen Gewebe Zytokine, die die Proliferation von T Zellen stimulieren und die weitere Zellen des Immunsystems aktivieren. So werden z.B. Makrophagen durch  $T_H$  Zellen dazu stimuliert, die von ihnen aufgenommenen Bakterien zu zerstören. Des Weiteren können  $T_H$  Zellen zu der Aktivierung von CD8 Effektorzellen beitragen (Bevan, 2004; Castellino and Germain, 2006).

CD8 T Zellen differenzieren nach entsprechender Stimulation zu zytotoxischen T Lymphozyten (CTL<sup>19</sup>). CTL erkennen im Gewebe ihr Peptid auf MHC-I-Molekülen, welches von infizierten Zellen exprimiert wird. Während ihrer Aktivierung werden in der zytotoxischen T Zelle Vesikel gebildet (Exosomen), welche bei erneutem Kontakt mit dem Antigen mit der Plasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt an der Kontaktstelle mit der Zielzelle entleeren. Die Vesikel enthalten Stoffe, welche die Zerstörung der Zielzelle einleiten. Zum einen sind dies Perforine, welche sich in die Plasmamembran der Zielzelle einlagern und Löcher in der Membran bilden. Dadurch können andere Stoffe, die von der CTL sezerniert werden, in die Zelle eindringen, wie z.B. Granzym B, das Apoptose in der Zielzelle induziert. Zum anderen exprimieren CTL den Rezeptor Fas, welcher ebenso nach Bindung seines Liganden auf der Zielzelle deren Apoptose induziert. Dies führt zu der Eliminierung der infizierten Zelle, so dass eine weitere Ausbreitung des Pathogens verhindert wird. CTL exprimieren zudem noch Zytokine wie IFN- $\gamma$ , dessen Expression charakteristisch für einen voll ausgereiften CTL ist (Harty et al., 2000).

Kommt es zu einer sehr starken Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen, was die Eliminierung sehr vieler Zellen zur Folge hat, können Organschäden entstehen. Deswegen müssen Immunantworten strikt kontrolliert und reguliert werden, wobei die Suppression von T Zellen, welche gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, eine besondere Rolle spielt.

## 2. Die Induktion von T Zell-Toleranz

Die immunologische Toleranz ist allgemein definiert als eine Nicht-Reaktivität eines Lymphozyten auf sein Antigen, wobei dies durch einen vorherigen Kontakt mit dem

---

<sup>19</sup> *engl.* cytotoxic T lymphocytes

Antigen induziert wurde. Die Entstehung von Toleranz gegen Selbst-Antigene stellt dabei eine wichtige Funktion da, um Immunreaktionen gegen körpereigene Zellen zu vermeiden.

Der TCR wird durch die zufällige Rekombination von Gensegmenten gebildet, wobei die dabei entstehende Spezifität nicht zwischen „selbst“ und „fremd“ unterscheiden kann. So entstehen zunächst T Zellen, die auch gegen Peptide von körpereigenen Proteinen gerichtet sind. Bei der Induktion von Selbst-Toleranz gilt es, diese autoreaktiven T Zellen zu eliminieren oder in ihrer Funktion zu unterdrücken, um Schäden des Organismus zu vermeiden. Ist die Induktion der Toleranz unvollständig, kann es zu einer Immunantwort gegen Selbst-Antigene kommen (Autoimmunreaktion). Generell können zwei verschiedene Mechanismen der Toleranzinduktion unterschieden werden, die zentrale und die periphere Toleranz. Beide Arten sind, wie die Induktion einer Immunantwort, antigen-spezifisch und resultieren aus der Erkennung des Antigens durch Lymphozyten auf einer APC oder auf Epithelzellen des Thymus. Die Toleranz gegen bestimmte Antigene kommt sowohl in B- als auch in T Lymphozyten vor, wobei hier die Induktion von T Zell-Toleranz näher erläutert wird.

## 2.1 Die zentrale Toleranz

Die zentrale Toleranz entsteht im Thymus während der Reifung der T Zellen und gilt für CD4 und für CD8 T Zellen. Im Thymus erfahren die Vorläuferzellen der T Zellen (Thymozyten) zuerst eine positive Selektion, so dass nur solche Thymozyten überleben, die an das körpereigene MHC-Molekül binden können. Thymozyten, welche nicht das eigene MHC-Molekül erkennen, gehen in die Apoptose über. Die überlebenden T Zellen werden anschließend einer negativen Selektion unterzogen (Starr et al., 2003). Dabei präsentieren sowohl DC als auch Epithelzellen im Thymus körpereigene Peptide auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen. T Zellen, die eine hohe Affinität zu einem der Selbst-Peptide aufweisen, binden dementsprechend stark an das MHC-Molekül und sind somit potentiell autoreaktiv. Auch diese T Zellen gehen in die Apoptose über (Deletion). So wird gewährleistet, dass T Zellen, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, den Thymus nicht verlassen und die peripheren lymphatischen Organe nicht erreichen (Gronski et al., 2004; Palmer, 2003). Antigene, welche im Thymus präsentiert werden, sind zum einen ubiquitär vorkommende und thymusspezifische Peptide. Zum anderen sind die Epithelzellen des Thymus (TEC<sup>20</sup>) auch in der Lage, spezifische Antigene des peripheren Gewebes, wie z.B. Insulin, zu

---

<sup>20</sup> engl. thymic epithelial cells

exprimieren und zu präsentieren, so dass auch diese autoreaktiven T Zellen deletiert werden. Die Expression der gewebespezifischen Antigene ist von der Aktivität des Transkriptionsfaktors AIRE<sup>21</sup> abhängig, welcher somit eine entscheidende Rolle bei der Induktion der zentralen Toleranz spielt (Anderson et al., 2002).

Nur 2-4% der T Zellen verlassen den Thymus, während alle anderen der ursprünglich in den Thymus gelangten T Zellen in die Apoptose gehen. Dennoch werden nicht alle autoreaktiven T Zellen dort eliminiert (Liu et al., 1995; Zehn and Bevan, 2006), so dass auch T Zellen in die Peripherie gelangen, welche gegen körpereigene Peptide gerichtet sind. Die Regulation dieser Zellen heißt periphere Toleranz.

## 2.2 Die periphere Toleranz

### 2.2.1 Ignoranz, Anergie und Deletion

Eine Form der peripheren Toleranz stellt die Ignoranz dar, wobei selbstreaktive T Zellen entweder eine zu niedrige Affinität zu dem Selbst-Antigen aufweisen oder nie in Kontakt mit diesem kommen. Letzteres passiert dann, wenn das Antigen an Stellen exprimiert wird, wo keine T Zellen vorkommen, wie z.B. im Gehirn. Die T Zelle an sich bleibt jedoch funktionell und könnte bei entsprechenden Signalen aktiviert werden und zu einer Autoimmunreaktion führen (Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991).

Des Weiteren wird in der Peripherie Toleranz in T Zellen durch klonale Deletion oder Anergie induziert (Redmond and Sherman, 2005). Hierbei erfolgt die Erkennung des Antigens (Signal 1) ohne das Vorhandensein von ko-stimulatorischen Molekülen (Signal 2). Es kommt zu einer anfänglichen Proliferation der T Zellen, jedoch ist für eine vollständige Aktivierung von T Zellen sowohl Signal 1 als auch Signal 2 erforderlich. Da Signal 2 fehlt, werden die T Zellen anschließend entweder durch die Induktion von Apoptose eliminiert (Deletion) (Hernandez et al., 2001) oder deaktiviert (Anergie) (Schwartz, 2003). Wird das gleiche Antigen danach unter ko-stimulatorischen Bedingungen präsentiert, sind diese T Zellen nicht mehr in der Lage, darauf zu reagieren; die Induktion von Toleranz bleibt somit stabil erhalten (Hamilton-Williams et al., 2005). Anergie kann auch durch die Bereitstellung von Signal 1 in Kombination mit ko-inhibitorischen Signalen, wie z.B. B7-H1 induziert werden (Carreno and Collins, 2002; Morelli and Thomson, 2007).

Unter nicht-entzündlichen Bedingungen nehmen APC, im Besonderen DC, im Gewebe Antigene oder apoptotische Zellkörperchen aus der Umgebung auf und

---

<sup>21</sup> *engl.* autoimmune regulator

präsentieren anschließend diese Selbst-Antigene. Unter homeostatischen Bedingungen migrieren DC aus dem Gewebe in den drainierenden Lymphknoten und können dort aufgenommenes Selbst-Antigen an T Zellen präsentieren (Steinman et al., 2003). Treffen sie auf eine T Zelle, welche spezifisch für das Selbst-Antigen ist, kommt es zu einer Interaktion ohne das Vorhandensein ko-stimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der DC, was zu einer Induktion von Deletion und/oder Anergie in der T Zelle führt. Dies gilt zum einen für Antigene, welche von DC aufgenommen und an CD4 T Zellen präsentiert werden (Hawiger et al., 2001), zum anderen für endogene Peptide, die von DC an CD8 T Zellen präsentiert werden (Probst et al., 2003) und für Antigene, welche an CD8 T Zellen kreuzpräsentiert werden (Belz et al., 2002a; Kurts et al., 1996; Kurts et al., 1997; Luckashenak et al., 2008). Ob gegen ein Antigen eine Immunantwort oder Toleranz induziert wird, hängt im Wesentlichen von dem Aktivierungsstatus der APC ab und nicht von der Art des Antigens an sich (Lefrancois et al., 2000). Kommt eine DC in Kontakt mit PAMP, durchläuft sie einen Reifungsprozess und induziert gegen das Antigen Immunität, unter nicht-inflammatorischen Bedingungen jedoch Toleranz. Im Gegensatz dazu gibt es Studien, die belegen, dass die Entscheidung, ob Toleranz oder Immunität induziert wird, von der Persistenz des Antigens abhängt. Dabei wird Immunität gegen diejenigen Antigene induziert, welche einmalig über einen kurzen Zeitraum präsentiert werden, während eine wiederholte Stimulation der T Zelle durch persistierende Antigene hingegen zu Toleranz in T Zellen führt (Redmond et al., 2003).

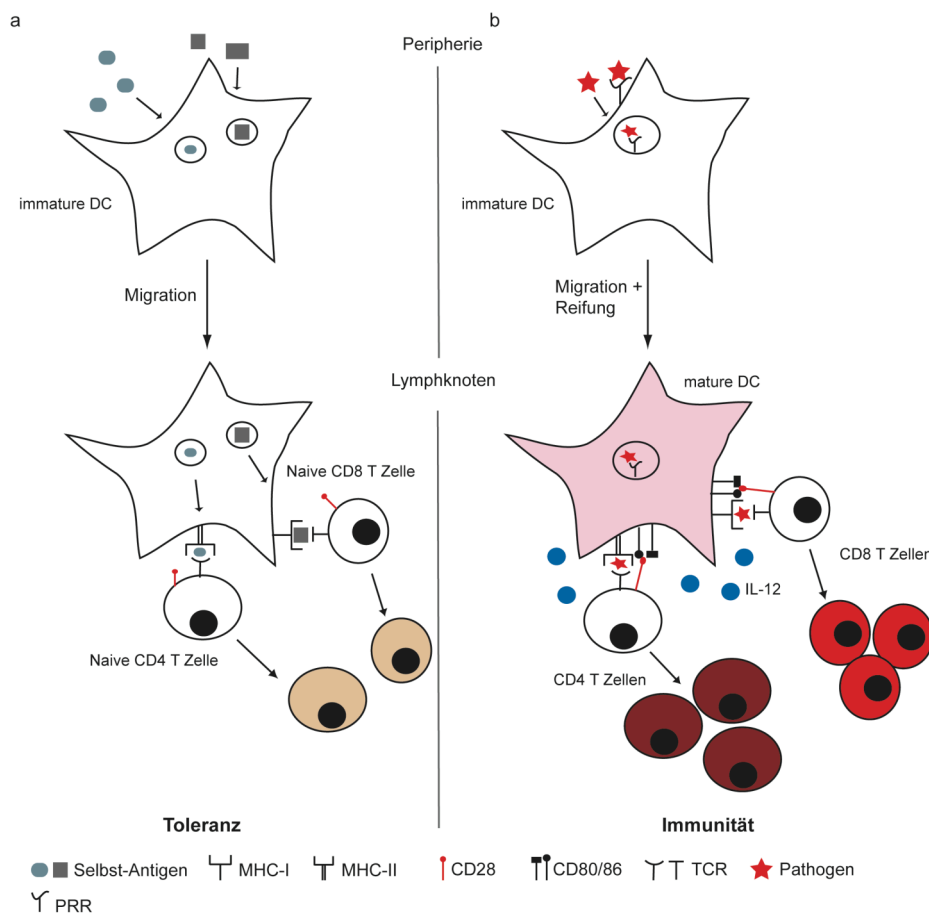
### 2.2.2 Regulatorische T Zellen

Regulatorische T Zellen ( $T_{Reg}$ ) inhibieren die Aktivierung und die Funktion von Effektorzellen durch verschiedene Mechanismen, wodurch sie wesentlich zu der peripheren Toleranz gegen Selbst-Antigene beitragen (Sakaguchi et al., 2008).  $T_{Reg}$  sind CD4 T Zellen, die konstitutiv große Mengen an CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren ( $CD4^+CD25^+$ ) (Sakaguchi et al., 1995). Sie entstehen hauptsächlich im Thymus, können sich aber auch in der Peripherie aus naiven CD4 T Zellen entwickeln, wenn nur geringe Mengen ihres Antigens unter nicht-inflammatorischen Bedingungen vorhanden sind (Apostolou and von Boehmer, 2004). Die Differenzierung in  $T_{Reg}$  kann zum einen durch DC (Wakkach et al., 2003) und zum anderen durch regulatorische T Zellen selbst induziert werden (Jonuleit et al., 2002). Ihre Entwicklung im Thymus und in der Peripherie hängt von der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 ab (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Sie interagieren entweder direkt mit der



Zielzelle und inhibieren auf diese Weise die Proliferation und die Effektorfunktion der T Zellen (von Boehmer, 2005) oder sezernieren immunsupprimierende Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ , die auch auf andere Zellen des Immunsystems wirken können (Annacker et al., 2001). IL-10 hemmt z.B. die Fähigkeit von DC, T Zellen effizient zu aktivieren (Steinbrink et al., 1997). T<sub>Reg</sub> können des Weiteren die CTL-Funktion von CD8 T Zellen durch die Sekretion von TGF- $\beta$  inhibieren (Green et al., 2003). Mäuse, die einen Defekt der regulatorischen T Zellen aufweisen, zeigen vielfältige Symptome von Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi et al., 1985).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die verschiedenen Mechanismen der zentralen und der peripheren Toleranz sichergestellt wird, dass Immunantworten gegen körpereigene Antigene verhindert werden. Eine Schlüsselrolle spielen hierbei DC, welche unter physiologischen Bedingungen Toleranz in T Zellen induzieren (Abb. I.1a). Kommen sie jedoch in Kontakt mit einem Pathogen, können sie in immunogene APC reifen und somit eine Immunantwort in T Zellen induzieren (Belz et al., 2002b; Heath and Carbone, 2001) (Abb. I.1b).



**Abb. I.1 Die Rolle von DC bei der Induktion von Toleranz und Immunität.**

### 3. Die lokale Immunregulation in der Leber

Die Leber ist ein Organ, das hauptsächlich durch Blut des Gastrointestinaltrakts gespeist wird, welches bakterielle Abbauprodukte, Toxine und harmlose Nahrungsmittelantigene enthält. Gleichzeitig zirkulieren T Zellen kontinuierlich durch die Leber, die potentiell gegen diese Antigene reagieren können. Somit ist es wichtig, dass die Induktion einer Immunantwort unterbunden wird. Hierbei spielt das Mikromilieu der Leber eine wichtige Rolle, welches eher die Induktion von immunologischer Toleranz favorisiert (Crispe, 2003; Knolle and Limmer, 2001; von Oppen et al., 2008). Dies zeigt sich z.B. dadurch, dass Transplantate der Leber selten abgestoßen werden, auch wenn keine immunsupprimierenden Medikamente eingenommen werden (Calne, 2000; Calne et al., 1969). Im Gegensatz dazu gelangen jedoch auch Pathogene in die Leber, welche persistierende Infektionen etablieren können, wie Malaria (Good, 1995) oder Hepatitis (Rehermann et al., 1996; Spengler et al., 1996). Dies verdeutlicht, dass die Entscheidung zwischen Induktion von Toleranz oder Immunität in der Leber eine entscheidende Rolle spielt.

#### 3.1 Die Mikroanatomie der Leber

Die Leber enthält zu 80% Blut über die hepatische Pfortader, welche Blut des Gastrointestinaltrakts mit sich führt, und 20% aus der hepatischen Arterie. Das Blut beider Gefäße vermischt sich in den kleinen Blutgefäßen der Leber, den Sinusoiden, welche einen Durchmesser von 5-7µm haben (MacPhee et al., 1995). Sinusoide unterscheiden sich von anderen Blutgefäßen dadurch, dass ihnen eine Basalmembran fehlt. Stattdessen sind sie von sinusoidalen Endothelzellen (LSEC<sup>22</sup>) ausgekleidet, welche durch kleine Zwischenräume (Fenestrae) voneinander getrennt sind (Wisse, 1970; Wisse et al., 1985). Dadurch kann das Blut in den dahinter liegenden Dissé Raum diffundieren und direkt in Kontakt mit den Hepatozyten treten, so dass ein maximaler Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten gewährleistet wird. Dies dient der Funktion der Leber als Verdauungs- und Entgiftungsorgan (Aufnahme bzw. Abgabe von Stoffwechselprodukten durch Hepatozyten). Der Durchmesser der Fenestrae beträgt zwar ca. 100nm, doch nur Partikel, welche kleiner als 15nm sind, können durch die Fenestrae in den Dissé Raum gelangen (Fraser et al., 1995; Kolb-Bachofen et al., 1984; Schlepper-Schafer et al., 1986). LSEC dienen somit als Barriere, die Hepatozyten von den im Blutstrom vorkommenden Lymphozyten trennen,

---

<sup>22</sup> *engl.* liver sinusoidal endothelial cells

so dass diese nicht in Kontakt miteinander treten können (Limmer et al., 1998a; Limmer et al., 1998b). Durch den langsamen Blutfluss in der Leber (25-250µm/Min) kann es zu einer Interaktion von Lymphozyten mit den verschiedenen Zellpopulationen in der Leber kommen, was durch den geringen Durchmesser der Sinusoide unterstützt wird.

### 3.2 Die Zellpopulationen der Leber

Die Zellpopulationen der Leber bestehen hauptsächlich aus Hepatozyten, LSEC, Kupffer Zellen, Sternzellen, DC und intrahepatischen Lymphozyten (Abb. I.2). Hepatozyten stellen den größten Anteil der Zellen und üben hauptsächlich die Stoffwechselfunktionen der Leber aus.

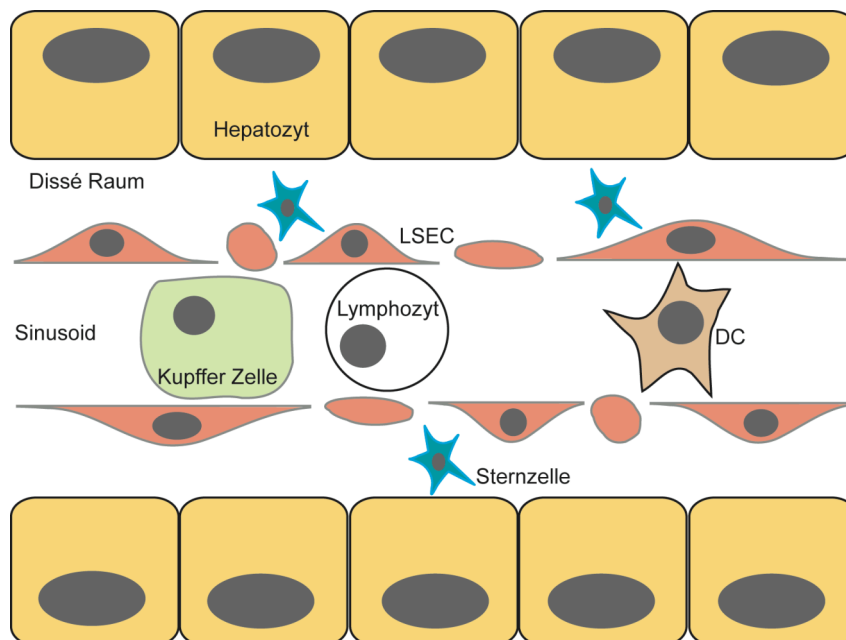


Abb. I.2 Die Zellpopulationen der Leber.

LSEC sind eine besondere Population an Endothelzellen, da sie ähnlich wie Kupffer Zellen effizient Antigene aus dem Blut aufnehmen können (Smetsrod, 2004; van Oosten et al., 2001). Dafür exprimieren sie eine Reihe von Rezeptoren wie den Mannose-Rezeptor oder „Scavenger“-Rezeptoren. Des Weiteren exprimieren LSEC konstitutiv die Adhäsionsmoleküle ICAM<sup>23</sup> (CD54) und VCAM<sup>24</sup> (CD106), so dass eine

<sup>23</sup> engl. intercellular adhesion molecule

<sup>24</sup> engl. vascular cell adhesion molecule

Interaktion mit Lymphozyten stattfinden kann. Zudem sind sie in der Lage, lösliches Antigen aus der Umgebung aufzunehmen und dieses auf MHC-I-Molekülen an CD8 T Zellen kreuzpräsentieren. LSEC exprimieren weiterhin MHC-II-Moleküle, CD80, CD86, CD40 und B7-H1 auf ihrer Oberfläche, wobei diese Eigenschaften LSEC als APC kennzeichnen (Lohse et al., 1996). Durch ihre Lokalisierung in den Sinusoiden tragen LSEC wesentlich zu der Aufnahme von Antigenen aus dem Blut bei, welche prozessiert und präsentiert werden können. Daher spielen LSEC als APC eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten in der Leber (Knolle and Gerken, 2000).

Kupffer Zellen sind die residente Makrophagen-Population in der Leber und zeichnen sich durch eine effiziente Phagozytose und Aufnahme von Antigenen aus dem Blutstrom aus (MacPhee et al., 1992). Durch ihre Lokalisation in den periportalen Bereichen im Lumen des Sinusoids haben sie direkten Kontakt zu Bestandteilen des Blutes wie Nahrungsmittelantigene und bakterielle Abbauprodukte, die sie aufnehmen und somit aus der systemischen Zirkulation entfernen (Shnyra and Lindberg, 1995; Winwood and Arthur, 1993). Kupffer Zellen stellen eine wichtige Zellpopulation für die Reinigung des Blutes aus dem Gastrointestinaltrakt dar (Filice, 1988). Zudem können Kupffer Zellen als APC fungieren und mit T Zellen interagieren (Klein et al., 2007).

Sternzellen (Ito Zellen) sind im Dissé Raum lokalisiert und haben somit keinen direkten Zugang zu zirkulierenden Lymphozyten. Sie dienen der Speicherung von Fetten und Lipiden, können durch zellulären Stress in Myofibroblasten transdifferenzieren und durch die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix zu der Entstehung von Fibrose beitragen (Geerts, 2001). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Sternzellen auch Antigene aufnehmen und mit T Zellen interagieren können (Winau et al., 2007).

Hepatische DC sind ebenfalls im Lumen des Sinusoids lokalisiert, wo sie kontinuierlich Antigene aufnehmen und diese an T Zellen präsentieren können (Sumpter et al., 2007).

Intrahepatische Lymphozyten zeigen eine Besonderheit dahingehend, dass die Anzahl der CD8 T Zellen über die der CD4 T Zellen dominiert. Des Weiteren sind NK und NKT Zellen in der Leber angereichert und spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T Zellen in die Leber (Crispe and Mehal, 1996).

### **3.3 Die Induktion von Toleranz in der Leber**

#### **3.3.1 Das Mikromilieu der Leber**

Das Mikromilieu der Leber favorisiert die Induktion von Toleranz, um eine Immunreaktion gegen Nahrungsmittelantigene zu vermeiden (Cantor and Dumont, 1967). Das Blut, welches in die Leber gelangt, entstammt hauptsächlich dem Gastrointestinaltrakt und ist demzufolge reich an bakteriellen Abbauprodukten, vor allem Endotoxin (LPS). Die Konzentration von LPS in der Leber beträgt unter physiologischen Bedingungen 10pg/ml – 1ng/ml (Jacob et al., 1977; Lumsden et al., 1988), was normalerweise zu einer Induktion von Immunantworten durch APC führen würde. Dies wird unter physiologischen Bedingungen in der Leber nicht beobachtet, so dass man von Endotoxin-Toleranz spricht (Nolan, 1981).

Die konstitutive Anwesenheit von LPS führt allgemein zu einer Hyporeaktivität der APC in der Leber gegenüber einer erneuten Stimulation mit LPS oder anderen TLR-Liganden (Abe et al., 2006; Uhrig et al., 2005). Eine repetitive Stimulation mit LPS bewirkt, dass auf LSEC oder hepatischen DC eine geringere Menge an MHC-II-Molekülen oder ko-stimulatorischen Molekülen exprimiert wird (Knolle et al., 1999a; Sumpter et al., 2007). Des Weiteren produzieren Kupffer Zellen durch die konstitutive Anwesenheit von LPS das Zytokin IL-10, welches supprimierend auf andere Zellen wie DC, T Zellen oder LSEC wirkt (Knolle et al., 1998b). LSEC können nach einer Stimulation mit LPS zwar IL-6 produzieren, jedoch wird diese Antwort durch das von Kupffer Zellen produzierte IL-10 unterdrückt (Knolle et al., 1997; Knolle et al., 1998a). Zusammengenommen wird durch das suppressive Mikromilieu der Leber sichergestellt, dass es zu keiner Immunreaktion gegen harmlose Nahrungsmittelantigene kommt. Dies wird durch eine Toleranzinduktion von T Zellen bewirkt, welche in die Leber gelangen und dort mit APC interagieren.

#### **3.3.2 Die Induktion von Toleranz in T Zellen durch LSEC**

LSEC sind APC, welche mit T Zellen interagieren können. Jedoch führt auch hier, wie bereits oben näher erläutert, eine wiederholte Stimulation mit LPS zu einer verminderten Expression von MHC-II- und CD80/86-Molekülen auf der Oberfläche von LSEC (Knolle et al., 1999a; Uhrig et al., 2005). LSEC interagieren sowohl mit naiven CD4- als auch mit naiven CD8 T Zellen, wenn diese durch die Leber zirkulieren. Dies resultiert in CD4 T Zellen jedoch in der Induktion eines regulatorischen Phänotyps, die IL-4 und IL-10 produzieren (Katz et al., 2005; Knolle et al., 1999b) und somit zu dem

tolerisierenden Milieu beitragen. LSEC können des Weiteren durch die Kreuzpräsentation von Antigen auf MHC-I-Molekülen mit CD8 T Zellen interagieren. Dies führt zwar zu einer initialen Proliferation der T Zellen, dennoch sind diese anschließend nicht in der Lage, die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 zu produzieren. Zudem zeigen sie keine zytotoxische Aktivität, was dafür spricht, dass in CD8 T Zellen Toleranz induziert wird (Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2000; von Oppen et al., 2008). Dies erfolgt jedoch nicht durch klonale Deletion, sondern durch die Induktion von Anergie (Diehl et al., 2008; von Oppen et al., 2008). LSEC spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Toleranz in der Leber.

Des Weiteren können neben LSEC auch hepatische DC und Kupffer Zellen mit T Zellen interagieren. Hepatische DC zeigen trotz des Vorhandenseins von LPS einen immaturren Phänotyp (siehe oben), so dass sie T Zellen nicht effizient aktivieren können (Abe et al., 2006; De Creus et al., 2005; Shu et al., 2007; Sumpter et al., 2007). Demzufolge tragen auch DC in der Leber zu der Induktion von T Zell-Toleranz bei (O'Connell et al., 2000).

Kupffer Zellen nehmen effizient Antigen und Mikroorganismen aus der Umgebung auf und können diese an T Zellen präsentieren. Doch auch Kupffer Zellen sind nicht in der Lage, T Zellen zu aktivieren, sondern tragen ebenfalls zu der Induktion von Toleranz in der Leber bei (Callery et al., 1989; Roland et al., 1993).

### 3.3.3 Die Induktion von Immunantworten in der Leber

Obwohl die Induktion von Toleranz in der Leber eine wichtige Rolle bei der peripheren Toleranz spielt, kommt die Leber gleichzeitig in Kontakt mit Pathogenen, welche persistierende Infektionen etablieren können, wie Malaria (Good, 1995) oder Hepatitis (Rehermann et al., 1996; Spengler et al., 1996). Dabei nimmt man an, dass das tolerisierende Milieu in der Leber zu der Etablierung der Infektion beiträgt. Dennoch kommt es z.B. bei der Infektion mit Hepatitisviren zu einer Immunantwort, wobei diese oftmals nicht in der Lage ist, den Erreger effizient zu eliminieren. Die Aktivierung von T Zellen findet zumeist nicht in der Leber, sondern in der Peripherie durch DC statt, wenn virale Antigene dorthin gelangen (Bowen et al., 2004). Ob APC in der Leber in der Lage sind, eine lokale Immunantwort gegen Pathogene zu induzieren, ist nicht bekannt. Hepatische DC scheinen hierbei nur von geringerer Bedeutung zu sein, da ihre Funktion durch das Mikromilieu der Leber unterdrückt wird (Sumpter et al., 2007). Die Rolle von lokalen APC wie LSEC bei der Induktion von Immunantworten wurde bisher noch nicht näher untersucht.

## II. Fragestellung

Die Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegen harmlose Nahrungsmittelantigene. Dazu tragen die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) als organ-residente antigen-präsentierende Zellpopulation bei, welche in den Sinusoiden der Leber lokalisiert ist. LSEC nehmen effizient Antigene aus dem Blutstrom auf und präsentieren diese auf MHC-I- oder MHC-II-Molekülen an CD8 bzw. CD4 T Zellen. Zudem exprimieren LSEC Adhäsions- und ko-stimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche, was ihnen ermöglicht, mit T Zellen zu interagieren. Eine Interaktion mit CD8 T Zellen führt unter physiologische Bedingungen zu der Induktion von CD8 T Zell-Toleranz. Es war bisher jedoch nicht bekannt, ob LSEC unter inflammatorischen Bedingungen auch die Induktion von CD8 T Zell-Immunität bewirken können und somit zu einer lokalen Immunregulation in der Leber beitragen. Hieraus ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

- Exprimieren LSEC „Pattern-Recognition“-Rezeptoren, die ihnen eine Erkennung von Pathogenen ermöglicht?
- Können LSEC nach einer Stimulierung dieser Rezeptoren funktionell reifen und anschließend T Zellen aktivieren?
- Sind LSEC in der Lage, eine virale Infektion als solche zu erkennen und danach T Zellen zu aktivieren?
- Über welche Mechanismen wird eine immunogene Reifung in LSEC vermittelt?
- Über welche Signale werden T Zellen durch LSEC aktiviert?
- Welche Rolle spielen LSEC bei der Induktion von Immunität *in vivo*?

Um die ersten Fragen zu beantworten, wurde ein *in vitro* Toleranztest unter verschiedenen Bedingungen angewendet, wobei LSEC mit transgenen CD8 T Zellen ko-kultiviert wurden. Anschließend konnten die entsprechenden T Zellen auf Effektorfunktionen hin analysiert werden.

Um die Relevanz von LSEC bei der Induktion von Immunität *in vivo* zu untersuchen, wurde von dem System des adoptiven Transfers von transgenen CD8 T Zellen in Empfängertiere Gebrauch gemacht.

## III. Material und Methoden

### 1. Material

#### 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)
ELISA-Reader	Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbach)
Erlenmeyerkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml (Schott, Mainz)
Gewindeflaschen	100ml, 250ml, 500ml, 1l, 2l (Schott, Mainz)
Injektionspumpe	WPI SP2101WZ (WPI, Aston, UK)
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	50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1l (Schott, Mainz)
Messzylinder	Rotilabo 50ml, 100ml, 500ml, 1l (Roth, Karlsruhe)
Mikroskope	DM IL (Leica, Wetzlar)
pH-Meter	pH 523 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim)
Pipetten	0,2-2µl, 0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) Transferpipette (Brand, Wertheim) HandyStep (Brand, Wertheim)
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); SW32 03U501 (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Schüttelwasserbad	GFL® 1092 (GFL®, Burgwedel)
Siebe, Metall-	Universität Bonn, Abt. Feinmechanik
Sonifikator, Stab-	UW2070/Sonoplus (Bandeln electronic, Berlin)
Ultrazentrifuge	Optima™ LE-80K (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Wasserbäder	TW8 (Julabo, Seelbach)
Werkbank, steril	Hera safe (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer (La Fontaine über Labotec, Labor-Technik, Göttingen)
Zentrifugen	Elutriator Avanti J-25 I (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA) Multifuge 3s-r, Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

## 1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21x46mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Einmalröhrchen	PP-Röhrchen 50ml steril, PP-Röhrchen 15ml steril (Greiner bio-one, Solingen)
FACS Röhrchen	Polystren 12/75mm (BD, Heidelberg und Sarstedt, Nümbrecht)
Glaskanülen, heparinisiert	Mikro-HK-Kapillaren (Brand GmbH, Wertheim)
Handschuhe, Einmal-	DermaClean (Ansell, Brüssel, Belgien)
Kanülen	0,4x19mm 27G (grau), 0,5x25mm 25G (orange) (BD Microlance, Heidelberg) 0,90x120mm (TSK-supra, Vertrieb durch Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen)
Messpipetten	2ml, 5ml, 10ml, 25ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	6- 24-, 96- Loch (Nunc, Wiesbaden; bio-one, Solingen; TPP, Trasadingen, Schweiz und Costar/Corning, USA)
Nylonwolle	Kisker GbR (über Labomedic GmbH)
OP-Masken	Foliodress®mask (Hartmann, Heidenheim)
Parafilm	Parafilm „M“ ® (Amerikan National Can TM, Greenwich, USA)
Pasteurpipetten	150mm, 230mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	10cm (greiner bio-one, Solingen)

Pipettenspitzen	Standardtips 10µl, 100µl, 1000µl (greiner bio-one, Solingen)
Polyamidsiebgebebe ‚Gaze‘	40µm über Labomedic, Bonn
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2,0ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Skalpelle	Feather (Osaka, Japan)
Spritzen	2ml, 5ml, 10ml, 20ml BD Discardit™II (BD, Heidelberg)
Sterilfilter	0,2µm (Schleicher&Schuell, Einbeck und BD, Heidelberg)
Zellkulturplatten	150x20mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Zentrifugenbehälter	1x3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> (25x89mm), No. 326823 (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)

### 1.3 Chemikalien und Reagenzien

Avertin, 2,2,2-Tribromethanol 97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
CFSE / CFDA-SE	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DMEM-Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Applichem, Darmstadt
Fötiales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
GBBS	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin (200mM)	Cambrex, Verviers, Belgien
HEPES	Roth, Karlsruhe
IFN-β ELISA Kit	PBL Biomedical Laboratories
IMDM-Medium	Lonza, Verviers, Belgien
Lymphozyten-Separationsmedium	Nycomed Pharma, Unterschleissheim
2-Merkaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Nycodenz	Axis-Shield, Norwegen
Optimem	Gibco, BRL, Karlsruhe
Ovalbumin	Serva, Heidelberg
OVA Peptid <sub>257-264</sub> (SIINFEKL), 80% HPLC rein	Pineda, Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	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
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich
TMB	Thermo Scientific, Rockford, USA
Trizol	Invitrogen, Paisley, UK
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween20	Roth, Karlsruhe

## 1.4 Allgemeine Lösungen

### 1.4.1 Medien

LSEC-Medium	DMEM high Glucose (4500 mg/l) 10% (v/v) FCS 4mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
T Zell-Medium	RPMI 1640 8% (v/v) FCS 1% (v/v) 2-Merkaptoethanol 4mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
BM-DC-Medium	IMDM 10% (v/v) FCS 1% (v/v) 2-Merkaptoethanol 4mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1g/l Streptomycin 30% (v/v) GM-CSF Überstand

M2-10B4-Medium, 3% oder 6%	DMEM 3% oder 6% (v/v) FCS 10mM HEPES 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
RMA-Medium	DMEM 5% FCS 10 <sup>5</sup> U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
1.4.2 Puffer	
ACK Lysepuffer	16,58g NH <sub>4</sub> Cl 2g KHCO <sub>3</sub> 74,4mg Na <sub>2</sub> EDTA 2000ml H <sub>2</sub> O pH 7,2-7,4
Bindungspuffer	0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O pH 9,0
Blockierungspuffer	PBS 1% (w/v) BSA
EDTA (0,5M)	186,1g EDTA ca. 20g NaOH 1000ml H <sub>2</sub> O pH 7,8-8,0
FACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS 2mM EDTA
GBSS	137mm NaCl

	<p>5mM KCl,            1,6mM CaCl<sub>2</sub>            0,9mM MgCl<sub>2</sub>            0,3mM MgSO<sub>4</sub>            0,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            1,7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            2,7mM NaHCO<sub>3</sub>            5,5mM D(+)-Glukose            50mM HEPES            pH 7,4</p>
MACS-Puffer	<p>PBS            1% (v/v) FCS            2mM EDTA            pH 7,2</p>
PBS (phosphate buffered saline):	<p>80g/l NaCl            0,2g/l KCl            1,44g/l NaHPO<sub>4</sub>x 2H<sub>2</sub>O            0,2g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            pH 7,4            (Biochrom, Berlin)</p>
Perfusionspuffer	<p>0,01g L-Asparaginsäure            0,02g L-Threonin            0,03g L-Serin            0,04g Glycin            0,05g L-Alanin            0,13g L-Glutaminsäure            0,13g L-Glutamin            3,6g D-(+)-Glukose            3,6g Fruktose            67,4g Sukrose            0,22g KCl            0,1g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O            0,1g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O            2,4g HEPES</p>

	2,0g NaHCO <sub>3</sub>
	1000ml H <sub>2</sub> O
	0,05% (v/v) Kollagenase
Saccharose-Lösung	H <sub>2</sub> O
	20% (w/v) Saccharose
Saponin-Puffer	FACS-Puffer
	0,5% (w/v) Saponin
Waschpuffer	PBS
	0,01% Tween20

### 1.5 Antikörper

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

Antigen	Isotyp	Klon	Anmerkung	Firma
B7-H1	IgG2a λ, Ratte	MIH5	= CD274, PD-L1	eBioscience
CD3ε	IgG Hamster	145-2C11		BD
CD8α	IgG2a κ, Ratte	53-6.7	= Ly-2	BD
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	= Integrin αX Kette	BD
CD16/32	IgG2b κ, Ratte	2.4G2	= anti-FcγR III + II	eigene Herstellung
CD25	IgG2b κ, Ratte	3C7	= IL-2-Rezeptor αKette	BD
CD40	IgG2a κ, Ratte	1C10	= gp39R, TNFRSF5	eBioscience
CD44	IgG2b κ, Ratte	IM7	= Pgp-1, Ly-24	BD
CD86	IgG2a κ, Ratte	GL1	= B7.2	BD
CD106	IgG2a κ, Ratte	429	= VCAM-1	BD
IFN-γ	IgG1 κ, Ratte	XMG1.2		BD
ME9F1	IgG2a, Ratte	ME9F1	anti-LSEC	eigene Herstellung
NK1.1	IgG2a κ, Maus	PK136	zur Depletion <i>in vivo</i> eingesetzt	eigene Herstellung
Vα2 TCR	IgG2a λ, Ratte	B20.1	OT-1 TCR	BD

V $\beta$ 5 TCR	IgG1 $\kappa$ , Maus	MR9-4	OT-1 TCR	BD
DesTCR	IgG, Ratte	Desiré		eigene Herstellung
H-2K <sup>b</sup>	IgG, Maus	5-F-1	anti-MHC-I, bindet nicht H-2K <sup>bm1</sup>	von M. Hoffmann, Hannover
H-2K <sup>b</sup>	IgG2a $\kappa$ , Ratte	AF6-88.5	anti-MHC-I	BD
Isotyp	IgG2a $\kappa$ , Ratte			BD
Isotyp	IgG2b $\kappa$ , Ratte			BD

### 1.6 Weitere Fluorochrome

CFSE (CFDA-SE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Hoechst	Sigma, Steinheim
Streptavidin	- FITC (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg) - PE (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg) - APC (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg)

### 1.7 Magnetische Kügelchen (MACS-Beads)

Murine anti-CD8 $\alpha$ , anti-CD11c, anti-CD90, anti-ME9F1 Beads, Miltenyi, Bergisch Gladbach

### 1.8 Enzyme

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Kollagenase A	Sigma, Steinheim
Peroxidase	Pierce, Rockford, USA
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

### 1.9 PRR-Liganden

TLR2	Pam <sub>3</sub> Cys (EMC Microcollections, Tübingen)
TLR3	polyIC (InvivoGen, San Diego, USA)
TLR4	LPS (Sigma-Aldrich)
TLR7	9.2s RNA (biomers.net, Ulm)
TLR9	CpG 1668 (TIB Molbiol, Berlin)

Dotap	Roth, Karlsruhe
RIG-I	3pRNA (von Prof. Hartmann, Institut für Klinische Pharmakologie und Biochemie, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt)
ZBP1	poly-dAdT (Amersham, Piscataway, USA)
FuGENE 6	Roche, Mannheim
IFN- $\beta$	PBL Biomedical Laboratories

### 1.10 Inhibitoren

Pertussis Toxin	<i>Bordetella pertussis</i> , Calbiochem, USA
Monensin	eBioscience, San Diego, USA
BrefeldinA	eBioscience, San Diego, USA

### 1.11 Primer

mTLR RT-Primer Set	InvivoGen, San Diego, USA
--------------------	---------------------------

### 1.12 Viren

MCMV-GFP, MCMV-OVA	von Dr. Torsten Sacher und Prof. Ulrich Koszinowski, (Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.
Adeno-OVA	von Prof. Ulrike Protzer (Institut für Virologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

### 1.13 Zelllinien

Ag8653	GM-CSF-produzierende Hybridomzelllinie
M2-10B4	Zelllinie aus Knochenmark-Stromazellen von C57BL/6J x C3H/HeJ F1 Mäusen; (LGC/ATCC, Wesel)
RMA	Lymphoblasten-Zelllinie aus C57BL/6N Mäusen, (LGC/ATCC, Wesel)



## 1.14 Mauslinien

- C57BL/6: Inzuchtstamm mit dem MHC-I-Haplotyp H2K<sup>b</sup>, aus eigener Zucht.
- OT-1xRag: CD8 T Zell transgene Mauslinie. H2K<sup>b</sup><sup>SIINFEKL</sup>-restringierter V $\alpha$ 2V $\beta$ 5 T Zell-Rezeptor, aus eigener Zucht (Hogquist et al., 1994).
- DesTCR: T Zell-Rezeptor transgene Mäuse mit Spezifität für drei endogene Peptide im Kontext des MHC-I-Moleküls H-2K<sup>b</sup> (Schonrich et al., 1991).
- B6.CH-2<sup>bm1</sup>: Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund, eine Punktmutation im MHC-I-Molekül H-2K<sup>b</sup> verhindert die Bindung des OVA-Peptids SIINFEKL (Clarke et al., 2000).
- CD80/86<sup>-/-</sup>: Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund, welche kein CD80 und kein CD86 funktionell exprimieren (Borriello et al., 1997). Bezogen von Jackson Laboratory (B6.129S4-*Cd80*<sup>tm1Shr</sup>*CD86*<sup>tm1Shr</sup>/J)

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

## 2. Methoden

### 2.1 Zellisolation

Für sämtliche Versuche wurden Mäuse im Alter von 6-20 Wochen verwendet. Zur Entnahme von Organen wurden die Versuchstiere durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet, der Körper mit 70% (v/v) Ethanol benetzt und anschließend die Leibeshöhle geöffnet.

#### 2.1.1 Die Isolation von Zellpopulationen über magnetische Zellseparation (MACS)

Die MACS-Technologie ermöglicht eine einzelne Zellpopulation über die Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen von einem Zellgemisch zu trennen. Hierbei werden die mit Antikörpern beschichteten magnetischen Kügelchen (*engl.* Microbeads) mit der Zellsuspension inkubiert. Die gegen die Oberflächenmoleküle gerichteten Antikörper binden dann an die gesuchte Zellpopulation. Danach wird die Suspension auf eine magnetische Säule gegeben, wodurch diejenigen Zellen zurück gehalten werden, welche die Microbeads gebunden haben. Die Zellen, welche nicht an die

Säule gebunden haben, werden durch Waschen abgespült. Durch die Entfernung des magnetischen Feldes kann die an die Säule gebundene Population separat von den anderen Zellen gesammelt werden. Die Separation erfolgte am AutoMACS über das Programm „Possel“ (Abkürzung für *engl.* „positive selection“). Es wurden CD8 T Zellen über anti-CD8 $\alpha$  Microbeads, CD11c<sup>+</sup> DC über anti-CD11c Microbeads, LSEC über anti-ME9F1 Microbeads und T Vorläuferzellen über anti-CD90 Microbeads aufgereinigt.

Material: AutoMACS, Gaze

Lösungen: MACS-Puffer

Methode: Die Zellen wurden in 0,5ml MACS-Puffer pro  $100 \times 10^6$  Zellen resuspendiert und mit 25 – 50 $\mu$ l Microbeads pro  $100 \times 10^6$  Zellen für 15Min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, in 4ml MACS-Puffer aufgenommen, durch die Gaze filtriert und über den AutoMACS mit Hilfe des Programms „Possel“ sortiert.

## 2.1.2 Die Isolation von Zellen aus der Leber

### Perfusion der Leber

Material: 25G Kanüle, Pumpe

Lösungen: GBSS, Perfusionspuffer

Methode: Der Peritonealraum des Versuchstieres wurde geöffnet und die Pfortader (*Vena porta*) freigelegt. Die Kanüle wurde in die Pfortader eingeführt, die *Vena cava* durchtrennt und die Leber mit der Perfusionslösung mit einer Geschwindigkeit von 3ml/Min für ca. 10Sek. perfundiert. Anschließend wurde die Gallenblase durchtrennt, die Leber entnommen und in ein Gefäß mit GBSS überführt.

### Aufreinigung von LSEC aus der Leber

Material: Sieb (250 $\mu$ m)

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 zerkleinert und anschließend im Schüttelwasserbad bei 250Upm 20Min. lang in GBSS/4% Kollagenase bei 37°C verdaut. Die Suspension wurde anschließend durch ein Sieb gedrückt und mit GBSS zwei Mal gewaschen. Über Dichte-Zentrifugation wurden dann die Parenchymzellen (Hepatozyten) von den anderen Zellen der Leber getrennt. Hierfür wurde das

Zellgemisch im Verhältnis 1:1,23 in Nycodenz gelöst (dies entspricht einer Dichte von  $1,089\text{g/cm}^3$ ) und bei  $1400\times g$  bei  $20^\circ\text{C}$  für 20Min. ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase abgenommen und in GBSS gewaschen. Die weitere Aufreinigung erfolgte entweder über Gegenstromzentrifugation oder MACS-Separation.

#### Gegenstromzentrifugation (Elutriation)

Durch Gegenstromzentrifugation (Elutriation) lassen sich Zellpopulationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte und Größe voneinander trennen. Das Zellgemisch wird durch eine Pumpe über ein Schlauchsystem in die Elutriationskammer geleitet. Hier wirken die Zentrifugalkraft des Rotors und die Strömungsgeschwindigkeit auf die Zellen, so dass sich diese abhängig von ihrer Größe und Dichte in der Elutriationskammer in einem Gradienten anordnen. Durch Variation der Pumpgeschwindigkeit bei konstanter Zentrifugationsgeschwindigkeit lassen sich die verschiedenen Zellfraktionen auftrennen.

Für die Auftrennung der Zellen durch Elutriation wurde die Elutriationszentrifuge gestartet ( $2500\text{Upm}$ ,  $24^\circ\text{C}$ ) und die Flussrate der Pumpe auf eine Anfangsgeschwindigkeit von  $16\text{ml/Min}$  eingestellt. Zur Auftrennung der unterschiedlichen Zellpopulationen wurde die Flussrate schrittweise von  $16\text{ml/Min}$  (Erythrozyten) auf  $22\text{ml/Min}$ ,  $28\text{ml/Min}$  (portale und periportale LSEC),  $32\text{ml/Min}$  (Mischfraktion aus LSEC und Kupffer Zellen) und  $56\text{ml/Min}$  (Kupffer Zellen) erhöht. Die einzelnen Zellfraktionen wurden über das Schlauchsystem des Elutriators abgeleitet und jeweils  $100\text{ml}$  je Zellfraktion gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend zentrifugiert, gezählt und in LSEC-Medium resuspendiert.  $1\times 10^6$  Zellen wurden in eine vorbeschichtete 24-Loch Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24Std. nach Isolation mit warmen PBS gewaschen und 48Std. nach Isolation für Experimente eingesetzt.

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

Material: AutoMACS

Lösungen: MACS-Puffer, anti-ME9F1 Beads, GBSS, LSEC-Medium

Methode: Erfolgte die Isolation von LSEC über anti-ME9F1 Beads, so wurden die Zellen nach der Nycodenz-Dichtezentrifugation gewaschen, in MACS-Puffer resuspendiert ( $200\mu\text{l}$  pro Leber) und  $25\mu\text{l}$  anti-ME9F1 Beads pro Leber hinzugefügt. Nach 15-20Min. Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Zellen einmal mit MACS-Puffer gewaschen und über den AutoMACS mit Hilfe des Programms „Possel“ aufgereinigt.

Die positive Fraktion wurde anschließend zentrifugiert, in LSEC-Medium resuspendiert, gezählt und wie oben angegeben ausgesät und kultiviert.

#### Isolation von Lymphozyten aus der Leber

Material: Sieb (250µm)

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

Methode: Die Perfusion der Leber erfolgte wie oben beschrieben. Die perfundierten Lebern wurden durch das Sieb gedrückt, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (10Min., 340xg, 20°C). Die Zellen wurden anschließend in 4ml 40% Percolllösung (v/v) resuspendiert, mit 2ml 80% Percolllösung (v/v) unterschichtet und bei 800xg, 20°C, 20Min. ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die oberste Zellschicht (Hepatozyten) abgenommen und verworfen. Die Interphase (Lymphozyten) wurde abgenommen und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend entweder direkt oder nach 5Std. Restimulation mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 2.1.3 Die Isolation von primären Zellen aus der Milz und Lymphknoten

#### Isolation von Lymphozyten

Material: Sieb (250 µm), Nylonwolle

Lösungen: PBS, MACS-Puffer, T Zell-Medium

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 PBS gewaschen und zentrifugiert (340xg, 10Min., 20°C). Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und über Nylonwolle angereichert (siehe unten). Danach wurden die Erythrozyten in 1ml ACK Lysepuffer für 1Min. bei RT lysiert, mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen sofort verwendet.

#### Anreicherung von Lymphozyten über Nylonwolle

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

Material: Nylonwolle, 10ml Spritze

Lösungen: T Zell-Medium

Methode: In eine mit 0,6g Nylonwolle gefüllte sterile 10ml Spritze wurde zur Blockierung von unspezifischen Bindungen T Zell-Medium gegeben und bei 37°C für 1Std. geblockt. Anschließend wurden die in T Zell-Medium aufgenommenen Milzzellen

auf die Nylonwolle gegeben (zwei Milzen pro Spritze) und für 60Min. bei 37°C inkubiert. Die T Zellen wurden danach mit 20ml warmem T Zell-Medium herunter gewaschen, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt.

#### Isolation von CD11c<sup>+</sup> Milz-DC

Material: Kanüle, Spritze, Sieb (250µm), AutoMACS

Lösungen: GBSS/4% Kollagenase (v/v), PBS, MACS-Puffer, T Zell-Medium

Methode: Nach der Entnahme der Milz wurde diese mit 1,5ml GBSS/4% Kollagenase (v/v) perfundiert und anschließend 20Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Milz durch ein Sieb gedrückt, mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in MACS-Puffer resuspendiert (pro 100x10<sup>6</sup> Zellen 0,5ml) und mit CD11c Beads (pro 100x10<sup>6</sup> Zellen 25µl Beads) 15Min. bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen und über den AutoMACS selektioniert. Von der positiven Fraktion wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die Ko-Kultur verwendet.

#### Isolation von transgenen CD8 T Zellen

Material: Sieb (250µm), Nylonwolle, AutoMACS

Lösungen: PBS, T Zell-Medium, MACS-Puffer

Methode: Für die Isolation transgener OT-1 CD8 T Zellen wurde den Versuchstieren 48Std. vor Entnahme der Lymphknoten und der Milz 300µg anti-NK1.1 Antikörper intra peritoneal (i.p.) injiziert, um die Depletion von NK- und NKT Zellen zu erreichen. Für die Isolation von DesTCR T Zellen wurden die Mäuse direkt verwendet. Nach der Entnahme von Milz und Lymphknoten wurden diese durch ein Sieb gedrückt, mit PBS gewaschen und über Nylonwolle angereichert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Pro 100x10<sup>6</sup> Zellen wurden 0,5ml MACS-Puffer und 50µl CD8α Beads zugegeben, 15Min. bei 4°C inkubiert, gewaschen und anschließend über den AutoMACS selektioniert. Von der positiven Fraktion wurde die Zellzahl bestimmt und die T Zellen für die Ko-Kultur oder für *in vivo* Experimente verwendet.

#### 2.1.4 Die Generierung von CD11c<sup>+</sup> DC aus dem Knochenmark (BM-DC)

Material: 27G Kanüle, Gaze

Lösungen: PBS, BM-DC-Medium

Methode: Den Versuchstieren wurden Oberschenkel- (*Femur*) und Unterschenkelknochen (*Tibia*) entnommen und von Muskeln und Sehnen befreit. Die

Knochen wurden mit einer Schere an beiden Seiten jeweils kurz unterhalb des Gelenks geöffnet und das Knochenmark mit BM-DC-Medium und einer 27G Kanüle aus den Knochen gespült. Die Zellen wurden zur Einzelzellsuspension resuspendiert, anschließend über die Gaze filtriert und die Zellzahl bestimmt. Die Knochenmarksvorläuferzellen wurden in BM-DC Medium in Petrischalen ausgesät ( $5 \times 10^6$ /10ml/Schale). An Tag 3 oder 4 wurde das Medium gewechselt. An Tag 7 wurden die Zellen im Experiment verwendet und hierfür mit MACS-Puffer von den Platten gelöst, die Zellzahl bestimmt und über magnetische Zellseparation die CD11c<sup>+</sup> DC aufgereinigt.

## 2.2 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 Trypanblau-Lösung verdünnt und 10 $\mu$ l in die Neubauer Zählkammer gegeben. Die Zählkammer setzt sich aus 4 Quadraten mit jeweils 16 Innenquadraten zusammen, welche vollständig ausgezählt werden. Dabei ist zu beachten, dass nur die lebenden Zellen, d.h. die nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen, gezählt werden. Daraus lässt sich die Zellzahl folgendermaßen berechnen:

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

## 2.3 Produktion von GM-CSF

Material: Zelllinie Ag8653, Sterilfilter 0,2 $\mu$ m

Lösungen: BM-DC-Medium

Methode: Die Zellen der Zelllinie Ag8653 wurden in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 30ml BM-DC-Medium in Anwesenheit von Antibiotikum in 150x20mm Kulturschalen kultiviert. Das Antibiotikum dient hierbei zur Selektion der GM-CSF-produzierenden Zellen. Nach drei Tagen wurde der Überstand gesammelt, bei 1600Upm für 10Min. zentrifugiert, in ein neues Gefäß überführt und nochmals für 15Min. bei 3000Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Für die Generierung von DC aus dem Knochenmark wurde dieser Überstand 30% (v/v) mit BM-DC-Medium eingesetzt.

## 2.4 Infektion mit MCMV

### 2.4.1 Produktion von MCMV

Material: Zelllinie M2-10B4, Petrischalen, Ultrazentrifuge

Lösungen: M2-10B4-Medium 6% und 3%, 20% Saccharose, PBS

Methode: M2-10B4 Zellen wurden in Medium mit 6% FCS kultiviert, bis ein dichter Zellrasen entstanden war. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und zentrifugiert.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 5ml Medium mit 3% FCS in Petrischalen ausgesät und mit dem entsprechenden MCMV-Stock (MCMV-GFP oder MCMV-OVA) mit einer  $MOI^{25} = 0,01$  infiziert. Nach drei bis fünf Tagen bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Überstände gesammelt und entweder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert oder sofort ankonzentriert. Dafür wurden die Überstände 10Min. bei  $340 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 30ml der Überstände in die Zentrifugenbehälter überführt und mit 4ml 20% Saccharose unterschichtet. Die Behälter wurden in die dafür vorgesehenen Rotorbehälter eingesetzt und die Ultrazentrifuge gestartet ( $21000 \text{Upm}$ , ÜN,  $4^\circ\text{C}$ ). Danach wurde der Überstand verworfen und das Viruspellet in  $50 \mu\text{l}$  PBS gelöst. Dafür wurde  $50 \mu\text{l}$  PBS zu dem Pellet zugegeben, der Behälter mit Parafilm verschlossen und 1Std. bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde das Sediment resuspendiert, mit den anderen vereinigt und in  $50 \mu\text{l}$  Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.4.2 Bestimmung des Virustiters durch Plaque-Test

Die Bestimmung des Titers erfolgte durch einen  $TCID_{50}^{26}$ -Test. Dabei werden Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des Virusstocks infiziert und nach einigen Tagen diejenige Verdünnung bestimmt, in denen noch eine Infektion zu beobachten ist. Eine Infektion ist durch die Bildung von „Plaques“ erkennbar. Diese bilden sich, wenn eine Zelle nach einer Infektion von dem Virus lysiert wurde. Die dabei entstandenen Viren infizieren benachbarte Zellen, die wieder lysiert werden usw. Dabei entsteht ein Loch in dem Zellrasen, der „Plaque“. Anhand der Verdünnung, in denen gerade noch „Plaques“ entstehen, lässt sich die Konzentration des Virusstocks berechnen.

Material: Zelllinie M2-10B4, 96-Loch Platte (Flachboden)

Lösungen: M2-10B4-Medium 3%

Methode: M2-10B4 Zellen wurden mit einer Konzentration von  $4 \times 10^4$  Zellen/ml in  $200 \mu\text{l}$  in der 96-Loch Platte vorgelegt. Die Zellen wurden 2Std. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, so

<sup>25</sup> engl. multiplicity of infection

<sup>26</sup> engl. tissue culture infective dosis

dass diese an den Plattenboden adhären konnten. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Virusverdünnungen (200µl pro Loch) zugegeben. Begonnen wurde mit einer Verdünnung des Virusstocks von 1:100 in M2-10B4-Medium und dann in einer Verdünnungsreihe 1:10 weiter verdünnt ( $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$ ). Nach einer Woche Inkubation bei 37°C wurde die Verdünnung bestimmt, in der noch Plaques zu sehen waren und die entsprechenden Löcher ausgezählt. Es wurden 2 Titrationen pro Platte angesetzt mit jeweils sechs Wiederholungen pro Verdünnung. Der logarithmische Virustiter errechnete sich wie folgt:

$$\log \text{TCID}_{50}/\text{ml} = a + 0,5 + n \times 1/r + 0,7 \quad \rightarrow \quad a + n \times 0,17 + 1,2 \quad (\text{für } r = 6)$$

a = negativer Exponent der höchsten Virusverdünnung, die in allen Löchern einer Reihe einen Plaque bildet

n = Summe aller weiteren Plattenlöcher in denen ein Plaque zu detektieren ist

r = Anzahl der Wiederholungen pro Verdünnung (s.o. r = 6)

Der Virustiter ergibt sich aus dem Mittelwert beider Bestimmungen als  $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ .

Es gilt  $\text{TCID}_{50}/\text{ml} = \text{PFU}^{27}/\text{ml} \times 0,5$ .

### 2.4.3 Infektion von LSEC mit MCMV

Material: LSEC, Virusstock

Lösungen: LSEC-Medium

Methode: LSEC wurden 48Std. nach ihrer Isolation in einer 24-Loch Platte mit einer MOI = 1 oder 0,1 infiziert. Die Infektion erfolgte in 300µl Medium für 24Std. bei 37°C. Danach wurden das Virus abgenommen und die Zellen anschließend für Experimente verwendet.

## 2.5 Transfektion von LSEC

Material: 96-Loch Platte (Rundboden)

Lösungen: Optimem, PBS, FuGENE, Dotap, LSEC-Medium

Methode: LSEC wurden 48Std. nach ihrer Isolation verwendet. Für die Transfektion des RIG-I-Liganden und des ZBP1-Liganden wurde 100µl Optimem und

---

<sup>27</sup> engl. plaque-forming units



die entsprechende Menge FuGENE gemischt und 5Min bei RT inkubiert. Die zu verwendende Menge FuGENE berechnete sich wie folgt:

Eingesetzte Menge des Liganden in  $\mu\text{g} \times 3 =$  die Menge FuGENE in  $\mu\text{l}$ .

Der Ligand wurde in Optimem verdünnt, mit FuGENE vermischt und für 20Min bei RT inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich Komplexe aus FuGENE, welches positiv geladen ist, und dem Liganden, welcher negativ geladen ist. Diese Komplexe gelangen später durch die Zellmembran, wo der Ligand in das Zytoplasma freigesetzt wird.

100 $\mu\text{l}$  des Liganden wurden mit 150 $\mu\text{l}$  LSEC-Medium gemischt und zu den LSEC gegeben. Nach 24Std. wurde frisches Medium zugegeben und die LSEC weiter verwendet.

Die Transfektion mit Dotap erfolgte nach einem ähnlichen Verfahren, wobei hier die Freisetzung der Nukleinsäure in Endosomen erfolgt. Die Transfektion mit Dotap wurde für CpG-Nukleotide und 9.2s RNA verwendet, wobei hier die zweifache Menge Dotap von der eingesetzten Menge Nukleinsäure verwendet wurde. Dotap wurde mit PBS gemischt, für 5Min. bei RT inkubiert und anschließend zu dem Liganden gegeben. Die Komplexierung erfolgte über 20Min. bei RT. Anschließend wurden 100 $\mu\text{l}$  mit 150 $\mu\text{l}$  LSEC-Medium gemischt und zu den LSEC gegeben.

## 2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: *engl.* fluorescence activated cell sorting) ermöglicht die Analyse einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Immunfluoreszenzfärbung. Dabei werden die Zellen durch eine Kapillare einzeln an monochromatischen Lasern vorbei geführt (Argonlaser  $\lambda = 488\text{nm}$ , bzw. Helium-Neon Laser  $\lambda = 635\text{nm}$ ). Das dabei durch die Zelle gestreute Licht wird von Photozellen (*engl.* Photomultiplier) detektiert und in elektronische Signale umgewandelt. Dabei gibt das Licht, welches in einem Winkel von 2-10° von der Zelle gestreut wurde (*engl.* forward scatter, FCS), Informationen über die Größe der Zelle. Licht, welches in einem Winkel von 90° detektiert wurde, erlaubt eine Aussage über ihre Granularität (*engl.* sideward scatter, SSC). Die Elektronen von Fluoreszenzfarbstoffen werden durch Licht des Laserstrahles in einen kurzfristig angeregten Zustand versetzt. Daraufhin fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und emittieren dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses wird durch den Einsatz bestimmter Filter von den Sensoren als positives Signal detektiert. Da die Fluoreszenzfarbstoffe an

Antikörper konjugiert sind, die an spezifische Oberflächenmoleküle von Zellen binden, erlaubt dies die Analyse einzelner Zellen in einem Zellgemisch.

Zur Analyse der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden folgende Durchflusszytometer verwendet: FACS Calibur, LSR und Canto II. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, USA).

### 2.6.1 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-Röhrchen, 96-Loch Platte (Rundboden)

Lösungen: FACS-Puffer, 4% PFA

Methode: Zur Oberflächenfärbung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1-5 \times 10^6$ /ml in FACS-Puffer resuspendiert und davon jeweils 100µl in ein FACS-Röhrchen oder in eine 96-Loch Platte zum Färben überführt. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:400 zu den Zellen gegeben und für 15Min. bei 4°C inkubiert. Fc $\gamma$ -Rezeptoren wurden durch Zugabe von 10µl/ml anti-CD16/CD32 Antikörper (2.4G2) blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (1600UpM, 3Min., 4°C). Wurden biotinylierte Antikörper eingesetzt, so erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe von Streptavidin Konjugaten in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:600 und eine Inkubationszeit von 15Min. bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Um tote Zellen auszuschließen wurde wenige Minuten vor der Analyse am Durchflusszytometer der Farbstoff Hoechst in einer Endkonzentration von 10µg/ml zugegeben. Erfolgte die Analyse erst am darauf folgenden Tag, so wurden die Zellen für 10Min. in 4% PFA fixiert und anschließend in FACS-Puffer resuspendiert und aufbewahrt.

### 2.6.2 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 oben beschriebenen Oberflächenfärbung die Zellen mit 4% PFA für 10Min. auf Eis fixiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen.

Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch einen Waschschrift und anschließender Inkubation in Saponin-Puffer für 10Min. auf Eis. Danach wurden die in Saponin-Puffer verdünnten Antikörper zu den Zellen gegeben und für 30Min. auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Saponin-Puffer wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.6.3 Zellmarkierung mit CFSE

Die Markierung mit CFSE ermöglicht die Analyse der Proliferation von Zellen. Der Farbstoff kann die intakte Zellmembran passieren und wird intrazellulär gespalten. Die dabei entstehenden reaktiven Gruppen binden kovalent an bestimmte Aminosäuren intrazellulärer Proteine, so dass kein Austritt des Farbstoffs aus der Zelle mehr erfolgen kann. Dieser wird bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzelle weitergegeben und verdünnt sich somit kontinuierlich, abhängig von den Teilungszyklen der Zelle. Diese Verdünnung lässt sich im Durchflusszytometer bei 488nm messen, so dass Rückschlüsse auf die Proliferation einzelner Zellen gezogen werden können.

Lösungen: PBS, T Zell-Medium

Methode: Die Färbung der Zellen erfolgte in PBS/1 $\mu$ M CFSE für 10-15Min. bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von entweder 30ml T Zellmedium oder 15ml kaltem PBS beendet, die Zellen dann in PBS gewaschen (350xg, 10Min., 20°C) und im Durchflusszytometer analysiert.

## 2.7 *In vitro* Ko-Kultur und Analyse von T Zell-Funktionen

Lösungen: T Zell-Medium, Lymphozyten-Separationsmedium, PBS

Methode: Die Interaktion zwischen CD8 T Zellen und LSEC wurde in einer *in vitro* Ko-Kultur analysiert. Dafür wurden LSEC in einer 24-Loch Platte kultiviert und 48Std. nach deren Isolation mit Virus infiziert oder mit verschiedenen Reagenzien stimuliert. Erfolgte die Ko-Kultur mit OT-1 T Zellen, wurde OVA (0,1mg/ml) zugegeben. Nach weiteren 24 Std. wurden LSEC mit 0,7 - 1x10<sup>6</sup> transgenen CD8 T Zellen in 2ml T Zell-Medium ko-kultiviert. Zur Untersuchung der Proliferation wurden CD8 T Zellen vorher mit CFSE markiert (siehe oben). Nach drei Tagen Ko-Kultur wurden die CFSE-markierten T Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Erfolgte keine CFSE-Markierung, wurden die T Zellen nach vier oder fünf Tagen von den LSEC abgenommen und lebende Zellen über Lymphozyten-Separationsmedium aufgereinigt.

Hierfür wurden die T Zellen in 5ml T Zell-Medium resuspendiert und mit 2ml Lymphozyten-Separationsmedium unterschichtet. Nach der Dichte-Zentrifugation (2000Upm, 10Min, 20°C, ohne Bremse) wurde die Interphase abgenommen, die Zellen gewaschen und gezählt. Anschließend wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/200 $\mu$ l T Zell-Medium auf vorher mit anti-CD3 $\epsilon$  Antikörpern beschichteten (10 $\mu$ g/ml in PBS für 1Std. bei 37°C) 96-Loch Platten ausplattiert. Nach weiteren 16Std. wurde der Überstand abgenommen und entweder bei -20°C gelagert oder mittels ELISA analysiert.

## 2.8 ELISA<sup>28</sup>

In dieser Arbeit wurde der „Sandwich“-ELISA verwendet, bei dem sich die Konzentration eines bestimmten Proteins in einem Gemisch bestimmen lässt. Hierfür wird ein Antikörper gegen ein bestimmtes Protein an die beschichtete Oberfläche einer 96-Loch Platte gebunden (Primärantikörper). Anschließend wird das Proteingemisch zugegeben, wobei das zu untersuchende Protein an den Antikörper bindet. Danach wird ein weiterer Antikörper gegen das Protein zugegeben (Sekundärantikörper), welcher zusätzlich an Biotin gekoppelt ist. In einem nächsten Schritt wird das Enzym Peroxidase zugegeben, welches an Streptavidin gebunden ist. Das Streptavidin bindet an das Biotin am Sekundärantikörper, so dass nach Zugabe des Enzymsubstrats eine enzymatische Reaktion erfolgen kann. Dabei entsteht ein farblicher Niederschlag, welcher anhand seiner Lichtabsorption einer bestimmten Wellenlänge ( $\lambda = 650\text{nm}$ ) quantitativ bestimmt werden kann, wobei die Absorption direkt mit der Menge an gebundenem Protein korreliert. Durch Vergleich der Menge mit einer Verdünnungsreihe des Proteins mit bekannter Konzentration (Standard) kann die Konzentration des Proteins in dem Gemisch bestimmt werden.

### 2.8.1 IFN- $\gamma$ ELISA

Material: 96-Loch Platte (Flachboden; beschichtet)

Lösungen: Bindungspuffer, Blockierungspuffer, PBS, Waschpuffer

Methode: Der Primärantikörper wurde 1:500 in Bindungspuffer verdünnt und anschließend in die entsprechende Anzahl von Löchern pipettiert. Nach 2Std. Inkubation bei RT wurde der Antikörper entfernt, die Platte 3x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 30Min. bei RT mit Blockierungspuffer inkubiert, um

---

<sup>28</sup> engl. enzyme-linked immunosorbent assay

unspezifische Bindungsstellen auf der Platte abzusättigen. Danach wurde die Platte gewaschen und die Proteinlösung bzw. der Standard (Konzentration 100ng/ml, Verdünnungsschritte 1:3) zugegeben. Die Inkubation erfolgte Ü.N. bei 4°C. Dann wurde die Platte gewaschen, der Sekundärantikörper für 2Std. bei RT zugegeben (1:200 in PBS) und anschließend wieder gewaschen. Danach wurde für 30Min. die Platte mit der Peroxidase bei RT inkubiert, gewaschen, die Substratlösung TMB zugegeben und sofort im ELISA-Reader analysiert.

### 2.8.2 IFN- $\beta$ ELISA

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

## 2.9 *In vitro* Zytotoxizitätstest

Material: 96-Loch Platte (Rundboden), Zelllinie RMA

Lösungen: RMA-Medium, PBS

Methode: Die RMA Zellen wurden in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt, wobei Fraktion 1 mit SIINFEKL (1 $\mu$ M) beladen (15Min. bei 37°C) und mit CFSE<sup>hoch</sup> (2 $\mu$ M) markiert wurde (Zielzellen). Fraktion 2 wurde nicht mit SIINFEKL beladen und mit CFSE<sup>niedrig</sup> (0,2 $\mu$ M) markiert. Anschließend wurden die Zellen in drei Schritten mit PBS gewaschen und im Verhältnis 1:1 gemischt. 5x10<sup>3</sup> Zellen wurden ausgesät und mit OT-1 T Zellen aus einer Ko-Kultur (Effektorzellen) gemischt (Verhältnis Ziel- zu Effektorzellen 1:100, 1:10, 1:1) und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten RMA Zellen, welche ohne T Zellen ko-kultiviert wurden. Danach wurden die überlebenden RMA Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert und die spezifische Zytotoxizität wie folgt berechnet:

% spezifische Zytotoxizität =

$$100 - [100 \times (\text{CFSE}^{\text{hoch}} / \text{CFSE}^{\text{niedrig}})_{\text{Probe}} / (\text{CFSE}^{\text{hoch}} / \text{CFSE}^{\text{niedrig}})_{\text{Kontrolle}}]$$

## 2.10 Gen-Expressionsanalysen

Die Gen-Expressionsanalysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Joachim Schultze an der Universität Bonn durchgeführt. Es wurden dort sowohl die Isolation der RNA und die Hybridisierung als auch die vollständige Auswertung und Visualisierung der Daten vorgenommen.

Material: 6-Loch Platte

Lösungen: LSEC-Medium, Trizol

Methode:  $2 \times 10^6$  LSEC wurden in einer 6-Loch Platte kultiviert und 48Std. nach ihrer Isolation verwendet. Hierfür wurden die LSEC entweder mit MCMV-GFP ( $n = 8$ ) mit einer MOI = 0,1 für 6Std. bei  $37^\circ\text{C}$  infiziert oder unbehandelt ( $n = 6$ ) gelassen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Trizol lysiert. Anschließend wurden die Proben von der Arbeitsgruppe Schultze übernommen und dort wurde aus 100ng RNA cRNA hergestellt (Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit, Applied Biosystems, Darmstadt). 1,5µg cRNA wurden an „Illumina® Maus BeadChip Microarrays“ hybridisiert (Illumina, San Diego, USA) und über „Illumina® BeadStation 500x“ analysiert.

Die bioinformatische Auswertung erfolgte über „Illumina® BeadStudio software“, sowie über „R language“ ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) und mit Hilfe des „Bioconductor project“ (affy, multtest, hcluster). Folgende Parameter wurden eingesetzt: Signalintensität  $\geq 100$  und p-Wert  $\leq 0,05$ . Unterschiede in der Expression der Gene wurde als signifikant erachtet, wenn die Änderung  $\geq \pm 2$  betrug. Zur vergleichenden Analyse wurde ein Datensatz von Huang et al. verwendet. Kreuzannotation ergab eine Liste von Homologen, die aufgrund der Informationen auf [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) erstellt wurde.

Alle Daten sind einsehbar unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo), Zugangsnummer GSE 14674.

## 2.11 Generierung von Knochenmarkschimären

Material: Bestrahlungsgerät

Lösungen: BM-DC-Medium, MACS-Puffer, PBS, anti-CD90 Beads

Methode: Für die Generierung von [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Knochenmarkschimären wurden die Empfängertiere mit einer Dosis von 9 Gy (= 900Rad) in einer Gammabestrahlungsanlage bestrahlt. Am darauf folgenden Tag wurde von Spendertieren das Knochenmark aus Femur und Tibia entnommen und T Zell Vorläuferzellen über anti-CD90 Beads negativ depletiert. Danach wurden  $5-10 \times 10^6$  Zellen intravenös (i.v.) in die Empfängertiere injiziert. Nach ca. 6-8 Wochen wurde das Ausmaß der Rekonstitution in den Empfängertieren analysiert, indem peripheres Blut mit dem Antikörper 5-F-I gefärbt wurde, welcher spezifisch H-2K<sup>b</sup> bindet, jedoch nicht H-2K<sup>bm1</sup>. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer, wobei nur Tiere verwendet wurden, welche weniger als 5% H-2K<sup>b</sup> positiv waren. Anschließend wurden die Chimären für *in vivo* Versuche verwendet.

## 2.12 Analyse der Effektorfunktionen von T Zellen *in vivo*

### 2.12.1 Restimulation der T Zellen *ex vivo*

Material: 96-Loch Platte

Lösungen: T Zell-Medium, Monensin, BrefeldinA

Methode: OT-1 T Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert. Anschließend wurden  $5 \times 10^6$  OT-1 T Zellen in die Empfängertiere injiziert, welche einen Tag zuvor mit  $2,5 \times 10^4$  PFU MCMV-OVA oder MCMV-GFP infiziert wurden. Fünf Tage später wurde die Milz und die Leber entnommen und die Lymphozyten wie oben beschrieben aufgereinigt. Zur Analyse des funktionellen Phänotyps wurden die Lymphozyten antigen-spezifisch auf CD11c<sup>+</sup> DC aus dem Knochenmark restimuliert. Hierfür wurden CD11c<sup>+</sup> DC 2Std. vorher mit OVA (0,5mg/ml) und SIINFEKL (2 $\mu$ M) beladen und anschließend 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 Monensin und BrefeldinA für 5Std. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen extra- und intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.12.2 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Material: Sieb (250 $\mu$ m)

Lösungen: CFSE, PBS, FACS-Puffer

Methode: OT-1 T Zellen wurden wie oben aufgereinigt und  $1 \times 10^6$  Zellen in Empfängertiere injiziert. 24Std. später wurden diese mit MCMV-OVA ( $2,5 \times 10^4$  PFU) oder Adeno-OVA ( $1 \times 10^7$  PFU) infiziert. Nach fünf Tagen wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierfür wurden Milzen aus C57BL/6 Mäusen durch ein Sieb gedrückt und in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 1 wurde mit SIINFEKL (1 $\mu$ M) beladen (15Min. bei 37°C) und mit CFSE<sup>hoch</sup> (2 $\mu$ M) markiert. Fraktion 2 wurde nicht mit SIINFEKL beladen und mit CFSE<sup>niedrig</sup> (0,2 $\mu$ M) markiert. Anschließend wurden die Zellen in drei Schritten mit PBS gewaschen und im Verhältnis 1:1 gemischt.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden pro Maus injiziert und 2,5Std. später die Milz entnommen. Diese wurde durch ein Sieb gedrückt, in 5ml FACS-Puffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle dienten Mäuse, die nicht infiziert wurden. Die Zytotoxizität wurde wie folgt berechnet:

% spezifische Zytotoxizität =

$$100 - [100 \times (\text{CFSE}^{\text{hoch}} / \text{CFSE}^{\text{niedrig}})_{\text{Probe}} / (\text{CFSE}^{\text{hoch}} / \text{CFSE}^{\text{niedrig}})_{\text{Kontrolle}}]$$

### 2.13 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens zwei Mal durchgeführt. Die Gruppen bei den *in vivo* Versuchen bestanden aus jeweils drei Tieren. Die Fehlerabweichungen sind entweder als Standardabweichung (SD<sup>29</sup>) oder als Standardfehler des Mittelwertes angegeben (SEM<sup>30</sup>). Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

---

<sup>29</sup> *engl.* standard deviation

<sup>30</sup> *engl.* standard error of the mean



## IV. Ergebnisse

### 1. LSEC exprimieren „Pattern-Recognition“-Rezeptoren

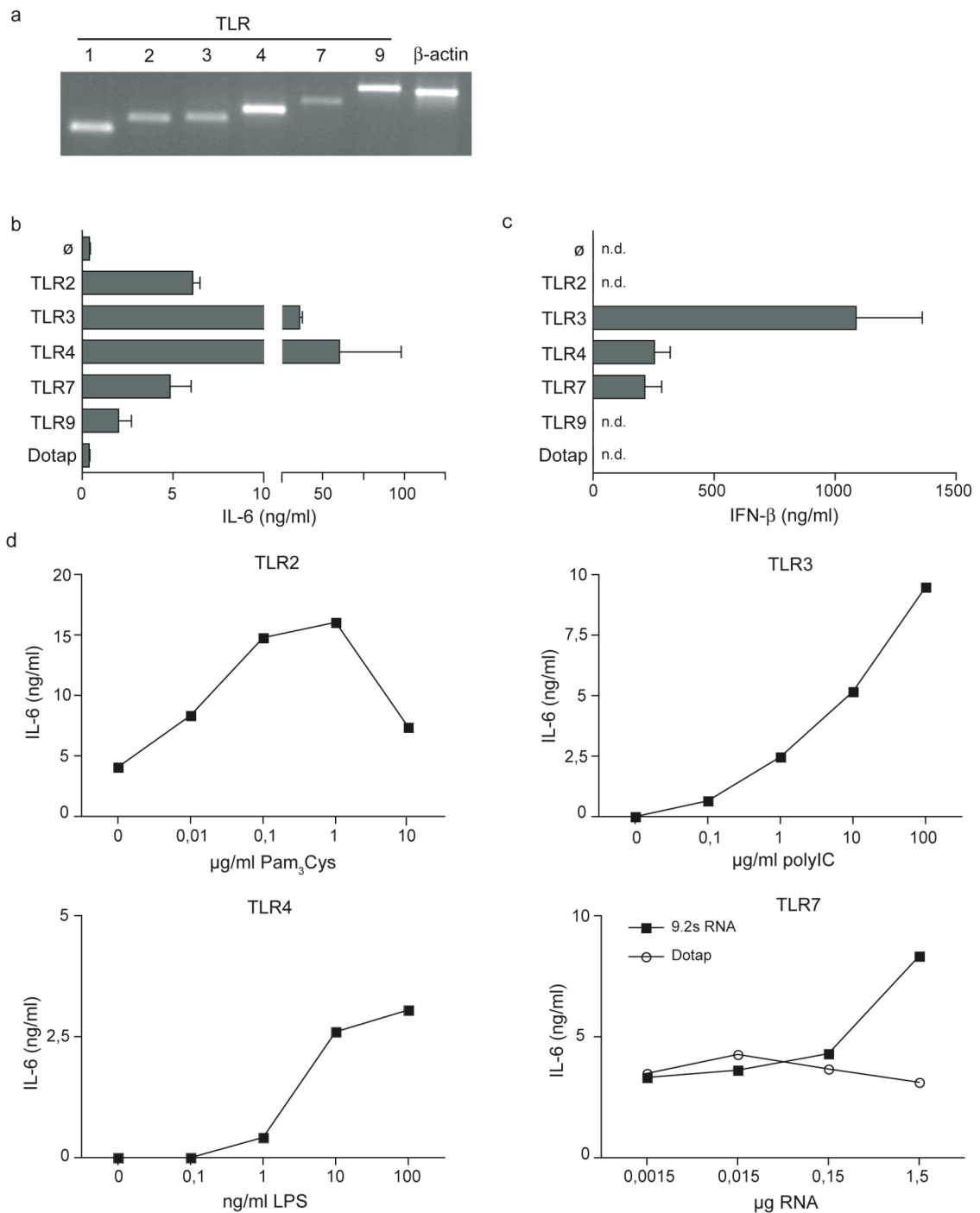
Sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC) sind organ-residente antigen-präsentierende Zellen (APC), die sehr effizient lösliches Antigen aus dem Blut aufnehmen und mit CD8 T Zellen interagieren können (Knolle and Limmer, 2003; Smedsrod, 2004). Daher wurde zunächst untersucht, ob diese Zellen, ähnlich wie DC, in der Lage sind, auf Gefahrensignale der Umgebung in Form von pathogen-assoziierten Molekülen (PAMP) zu reagieren (Banchereau and Steinman, 1998) (Matzinger, 2002). Da hierfür einerseits die Expression von solchen „pattern-recognition“-Rezeptoren erforderlich ist, die für die Aufnahme von exogenem Antigen zuständig sind (*engl.* „scavenger receptors“), und andererseits die Expression von Rezeptoren, die PAMP erkennen können, wurde zuerst die konstitutive Expression dieser Rezeptoren mittels Gen-Expressionsanalysen von unstimulierten primären LSEC bestimmt (Tabelle 2). Es konnte gezeigt werden, dass LSEC konstitutiv ein breites Spektrum der bekannten PRR exprimierten, unter anderem „Scavenger“-Rezeptoren und „Toll-like“ Rezeptoren (TLR) (Tabelle 2). Da TLR charakteristisch für professionelle APC und somit für die Erkennung von PAMP sind (Reis e Sousa, 2001), wurde, um die Expression der TLR zu bestätigen, die RNA unstimulierter LSEC isoliert und eine RT-PCR für spezifische TLR durchgeführt. Auch hier zeigte sich die konstitutive Expression von TLR1, 2, 3, 4, 7 und 9 (Abb. IV.1a). Des Weiteren sezernierten LSEC nach Inkubation mit TLR-Liganden die Zytokine IL-6 und IFN- $\beta$ , was die funktionelle Expression der TLR belegt (Abb. IV.1b und c). Die Sensitivität von LSEC gegenüber der Stimulation mit TLR-Liganden erstreckte sich über ein breites Spektrum von verschiedenen Konzentrationen der applizierten TLR-Liganden (Abb. IV.1d). Eine weitere Klasse der PRR sind die zytoplasmatischen Rezeptoren RIG-I und ZBP1, die intrazellulär virale RNA (Hornung et al., 2006) bzw. DNA (Takaoka et al., 2007) erkennen können. Nach der Transfektion von LSEC mit spezifischen Liganden für RIG-I oder ZBP1 wurde IL-6 gebildet (Abb. IV.2), was ebenso darauf schließen lässt, dass diese Rezeptoren funktionell exprimiert werden. Die Vorstimulation von LSEC mit IFN- $\beta$  führte zu einer verstärkten Produktion von IL-6 nach Transfektion der Zellen mit Liganden für RIG-I und ZBP1 (Abb. IV.2), was darauf hinweisen könnte, dass die Expression der Rezeptoren durch IFN- $\beta$  zuvor verstärkt wurde. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass LSEC in der Lage sind,

Gefahrensignale der Umgebung in Form von viralen oder bakteriellen PAMP zu erkennen und daraufhin pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren.

**Tabelle 2.** Basale Expression der Pattern-Recognition-Rezeptoren ermittelt durch die Gen-Expressionsanalyse unstimulierter LSEC (n=6)

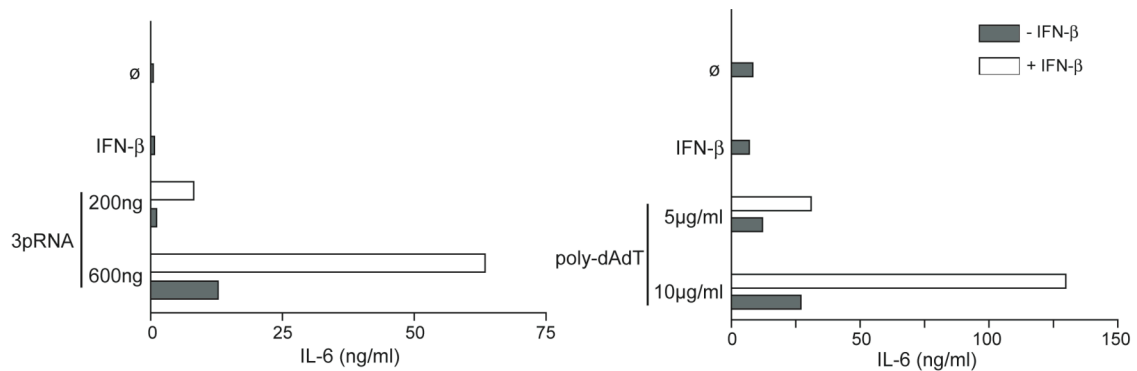
Gen Symbol	Gen Name	Expressionslevel
<u>Scavenger-Rezeptoren</u>		
Cd68	CD68 antigen	++++
Msr1	macrophage scavenger receptor 1	+
Msr2	macrophage scavenger receptor 2	+
Marco	macrophage receptor with collagenous structure	+++
Scarf1	scavenger receptor class F, member 2	+
Scarb1	scavenger receptor class B, member 1	+++
Scarb2	scavenger receptor class B, member 2	+++
Stab1	stabilin 1	+++
Stab2	stabilin 2	++++
<u>Toll-like Rezeptoren</u>		
Tlr1	toll-like receptor 1	+
Tlr2	toll-like receptor 2	++
Tlr3	toll-like receptor 3	+
Tlr4	toll-like receptor 4	++
Tlr7	toll-like receptor 7	+
Tlr8	toll-like receptor 8	+
Tlr9	toll-like receptor 9	+
Tlr13	toll-like receptor 13	+
Cd14	CD14 antigen	++
<u>C-typ Lektine</u>		
Cd69	CD69 antigen	+
Cd207	CD 207 antigen	+
Cd302	CD302 antigen	+
Mrc1	mannose receptor, C type 1	+++
Clec1a	C-type lectin domain family 1, member a	+
Clec1b	C-type lectin domain family 1, member b	+
Clec2d	C-type lectin domain family 2, member d	++
Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3	+
Clec4b1	C-type lectin domain family 4, member b1	+
Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d	+++
Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	+
Clec4f	C-type lectin domain family 4, member f	+
Clec4g	C-type lectin domain family 4, member g	+
Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	+++
Clec5a	C-type lectin domain family 5, member a	+
Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	+++
Clec14a	C-type lectin domain family 14, member a	+
Clec16a	C-type lectin domain family 16, member a	+
<u>Intrazelluläre Pattern-Recognition-Rezeptoren</u>		
Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	+
Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1	+
Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	+
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	+++
Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	+
Naip5	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5	+
Ripk2	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	+
Zbp1	Z-DNA binding protein 1	+

durchschnittliches Expressionssignal: + < 500: basale Expression; ++ 500-1000: schwache Expression; +++ 1000-5000: mittlere Expression; ++++ >5000: starke Expression



**Abb. IV.1 LSEC exprimieren funktionell TLR.**

(a) RT-PCR-Analyse der mRNA unstimulierter LSEC für TLR-Expression. (b,c) LSEC wurden mit Medium ( $\emptyset$ ) oder mit Liganden stimuliert für: TLR2 (Pam3Cys,  $1\mu\text{g/ml}$ ); TLR3 (polyIC,  $10\mu\text{g/ml}$ ); TLR4 (LPS,  $100\text{ng/ml}$ ); TLR7 (9.2s RNA,  $6\mu\text{g/ml}$  in Dotap); TLR9 (CpG 1668,  $2,5\text{nmol/ml}$  in Dotap) oder mit Dotap alleine. Nach 24Std. wurden die Konzentrationen von IL-6 und IFN- $\beta$  in den Überständen mittels ELISA bestimmt. n.d. nicht detektierbar. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. (d) LSEC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von TLR-Liganden wie in (b) stimuliert und die Konzentration von IL-6 wie in (b) bestimmt. (a-d) Ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.



**Abb. IV.2 LSEC exprimieren funktionell zytoplasmatische PRR.**

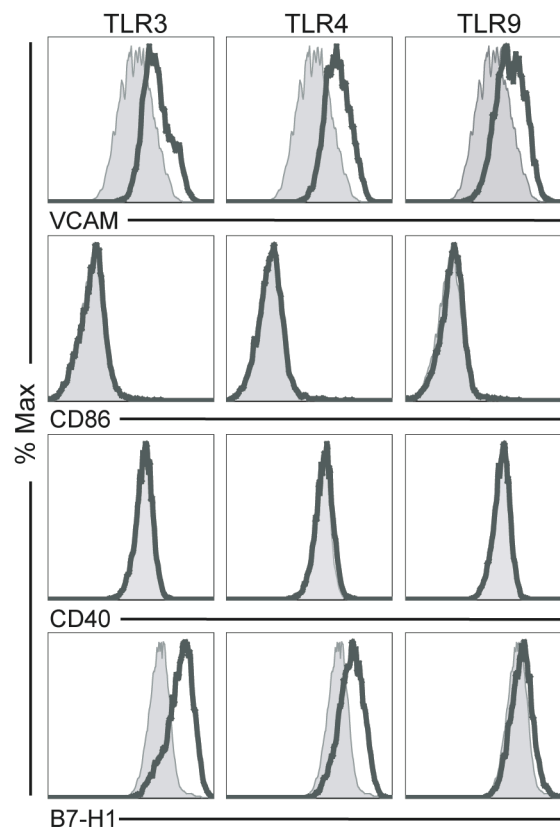
LSEC wurden entweder ohne (graue Balken) oder mit (weiße Balken) IFN- $\beta$  (30U) für 3Std. vorinkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden für RIG-I (3pRNA) oder für ZBP1 (poly-dAdT) transfiziert. IL-6-Konzentrationen der Überstände wurden 24Std. später mittels ELISA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

## 2. Die Induktion von CD8 T Zell-Toleranz wird nach Stimulation mit PRR-Liganden aufrechterhalten

### 2.1 Nach Stimulation der PRR zeigen LSEC keine phänotypische Maturierung

Bei DC reicht eine Stimulation mit PRR-Liganden aus, um eine Reifung von einem immaturren zu einem maturaen Status zu induzieren. Dieser Prozess ist durch eine erhöhte Expression von ko-stimulatorischen Molekülen wie CD80/86 oder CD40 an der Zelloberfläche charakterisiert (Janeway and Medzhitov, 2002). Nur ausgereifte DC sind in der Lage, naive CD8 T Zellen zu aktivieren, was zu deren Differenzierung in zytotoxische T Lymphozyten (CTL) führt (Banchereau and Steinman, 1998). Da LSEC TLR funktionell exprimieren, wurde zunächst untersucht, ob LSEC nach TLR-Stimulation in der gleichen Weise wie DC maturieren. Hierfür wurde die Expression einiger Oberflächenmoleküle, die für den Prozess der Maturierung bei DC charakteristisch sind, bestimmt. Wie in Abb. IV.3 zu sehen ist, konnte eine verstärkte Expression des Adhäsionsmoleküls CD106 (VCAM) beobachtet werden, wogegen die ko-stimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 nach TLR-Stimulation keine erhöhte Expression zeigten. LSEC haben eine große Menge des ko-inhibitorischen Moleküls B7-H1 an ihrer Oberfläche (Diehl et al., 2008). Interessanterweise wurde die Expression dieses Moleküls nach TLR-Stimulation noch weiter erhöht (Abb. IV.3).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass im Gegensatz zu DC keine Maturierung von LSEC nach TLR-Stimulation stattgefunden hat.



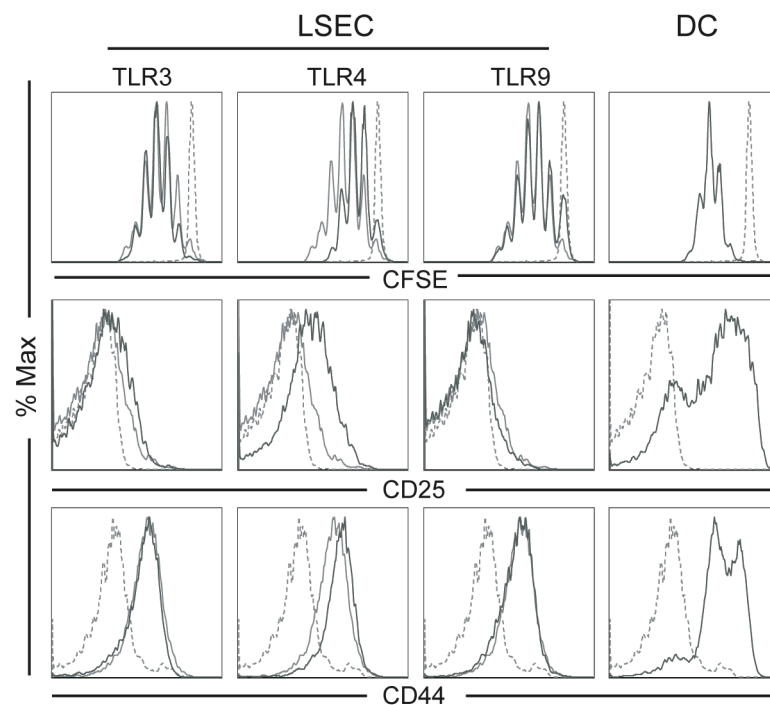
**Abb. IV.3 TLR-Stimulation führt zu keiner phänotypischen Maturierung in LSEC.**

LSEC wurden mit Liganden für TLR3 (polyIC, 10µg/ml), TLR4 (LPS, 100ng/ml) und TLR9 (CpG 1668, 2,5nmol/ml) für 24Std. stimuliert. Analyse der Oberflächenmoleküle von LSEC mittels Durchflusszytometrie. Grau: unstimulierte LSEC; schwarz: TLR-stimulierte LSEC. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

## 2.2 Nach Stimulation von PRR in LSEC wird CD8 T Zell-Toleranz induziert

LSEC induzieren nach antigen-spezifischer Interaktion mit T Zellen CD8 T Zell-Toleranz. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass die CD8 T Zellen anfangs proliferieren, was mit einer verstärkten Expression des Integrins CD44 auf der Oberfläche der T Zellen einhergeht. Jedoch produzieren diese T Zellen kein IL-2 und kein IFN-γ nach antigen-spezifischer Restimulation und zeigen keine zytotoxische Aktivität (Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2000). Um zu untersuchen, ob eine Stimulation verschiedener TLR Auswirkungen auf die Interaktion von LSEC mit CD8

T Zellen hat, wurden zunächst LSEC mit TLR-Liganden in der Anwesenheit des Antigens Ovalbumin (OVA) stimuliert und anschließend mit antigen-spezifischen CD8 T Zellen (OT-1 T Zellen) für drei Tage ko-kultiviert. OT-1 T Zellen erkennen ein durch die Prozessierung von OVA abstammendes Peptid (SIINFEKL), wenn es auf MHC-I-Molekülen kreuzpräsentiert wird. Nach drei Tagen Ko-Kultur wurden die Proliferation und die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD44 der T Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied bei der Proliferation und den Aktivierungsmarkern zwischen T Zellen festgestellt werden, die auf unstimulierten oder auf TLR3 bzw. TLR9-stimulierten LSEC ko-kultiviert wurden (Abb. IV.4). Dies zeigt, dass hier keine veränderte T Zell-Aktivierung durch TLR-Stimulation von LSEC stattgefunden hat. Bei T Zellen, die auf TLR4-stimulierten LSEC ko-kultiviert wurden, zeigte sich sogar eine leicht verringerte Proliferation, wohingegen die Expression von CD25 auf diesen T Zellen erhöht war (Abb. IV.4). Milz-DC zeigen einen maturierten Phänotyp und aktivieren CD8 T Zellen, weswegen sie als Positivkontrolle verwendet wurden. Man kann hier einerseits eine deutlich stärkere Proliferation und andererseits eine erhöhte Expression von CD25 und CD44 auf T Zellen feststellen (Abb. IV.4), was einen deutlichen Unterschied zu T Zellen aufweist, welche mit LSEC ko-kultiviert wurden. Dies deutet darauf hin, dass diejenigen T Zellen, welche auf LSEC ko-kultiviert wurden, einen toleranten Phänotyp aufweisen, unabhängig davon, ob LSEC zuvor mit TLR-Liganden stimuliert wurden oder nicht.

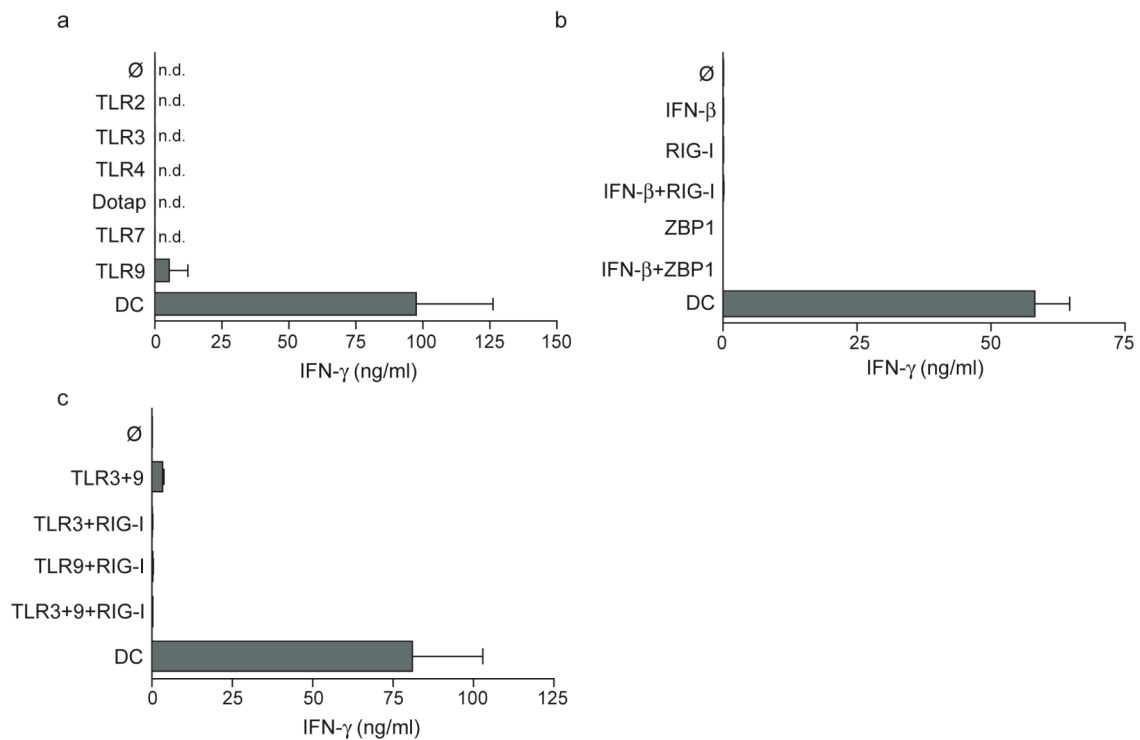


**Abb. IV.4 TLR-Stimulation von LSEC hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von CD8 T Zellen.**

LSEC wurden mit Medium oder mit Liganden für TLR3 (polyIC, 10µg/ml), TLR4 (LPS, 100ng/ml) oder TLR9 (CpG 1668, 2,5nmol/ml) für 24Std. in der Anwesenheit von OVA stimuliert, bevor CFSE-markierte naive OT-1 T Zellen zugegeben wurden. Nach drei Tagen Ko-Kultur wurde die Proliferation und die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD44 der T Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Grau: T Zellen aktiviert von unstimulierten LSEC; schwarz: T Zellen aktiviert von TLR-stimulierten LSEC; gestrichelte Linie: naive T Zellen. T Zellen aktiviert von Milz-DC (schwarze Linie) wurden als Positivkontrolle verwendet. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Um die Frage abschließend zu beantworten, ob eine TLR-Stimulation von LSEC zu einer Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen führt, wurden antigenspezifische T Zellen nach vier Tagen Ko-Kultur entweder mit unstimulierten (toleranz-induzierenden) oder mit TLR-stimulierten LSEC restimuliert und die Expression von IFN-γ mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich hier, dass auch T Zellen, die mit TLR-stimulierten LSEC ko-kultiviert wurden, kein IFN-γ produzierten, woraus man schließen kann, dass in diesen T Zellen Toleranz induziert wurde (Abb. IV.5a.) Dies konnte auch für LSEC, die mit Liganden der zytoplasmatischen PRR RIG-I und ZBP1 transfiziert wurden, bestätigt werden (Abb. IV.5b). Es ist für DC beschrieben, dass die kombinatorische Stimulation mit entweder verschiedenen TLR-Liganden (Napolitani et al., 2005) oder TLR-Liganden in Kombination mit zytoplasmatischen PRR-Liganden (Poeck et al., 2008), einen synergetischen Effekt auf deren Reifung bzw. die T Zell-Aktivierung haben. Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass LSEC eine Stimulation verschiedener TLR benötigen, um eine T Zell-Aktivierung zu steuern, wurden LSEC mit verschiedenen Kombinationen von TLR-Liganden und dem Liganden für RIG-I inkubiert und anschließend mit CD8 T Zellen ko-kultiviert. Doch auch hier bestätigte sich, dass LSEC selbst nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden Toleranz in CD8 T Zellen induzierten, da die restimulierten T Zellen kein oder nur sehr wenig IFN-γ produzierten (Abb. IV.5c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation der TLR alleine oder in Kombination miteinander in LSEC nicht dazu führte, dass sich naive CD8 T Zellen in IFN-γ-produzierende Effektorzellen differenzierten. Daraus lässt sich schließen, dass keine funktionelle Maturierung in LSEC induziert wurde.



**Abb. IV.5 Die Induktion von CD8 T Zell-Toleranz durch LSEC bleibt nach PRR-Stimulation erhalten.**

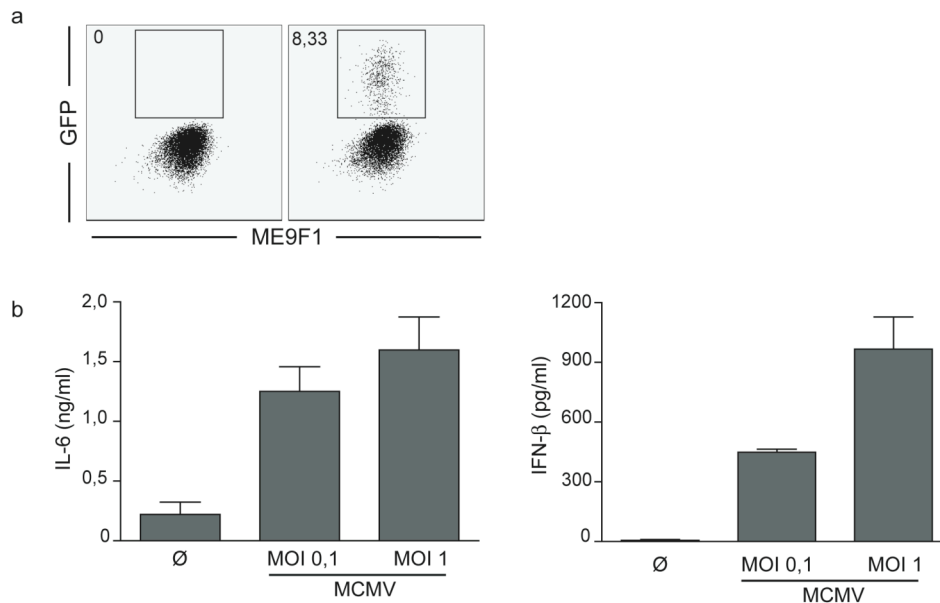
LSEC wurden unstimuliert verwendet ( $\emptyset$ ) oder mit TLR-Liganden wie in Abb.IV.1b stimuliert. (a) Antigen-präsentierende LSEC wurden nach TLR-Stimulation mit naiven T Zellen inkubiert. Nach vier oder fünf Tagen Ko-Kultur wurde jeweils die gleiche Anzahl lebender T Zellen mit  $\alpha$ CD3 $\epsilon$  restimuliert und 16Std. später die IFN- $\gamma$ -Produktion durch ELISA bestimmt. T Zellen, die von Milz-DC aktiviert wurden, dienten als Positivkontrolle. n.d. nicht detektierbar. (b) Antigen-präsentierende LSEC wurden, wenn angegeben, mit IFN- $\beta$  (30U) vorstimuliert und anschließend mit Liganden für RIG-I (3pRNA, 600ng) oder ZBP1 (poly-dAdT, 2,5 $\mu$ g) transfiziert. Funktionelle Analyse wie in (a). (c) Antigen-präsentierende LSEC wurden mit einer Kombination von TLR-Liganden und RIG-I-Ligand stimuliert und anschließend wie in (a) analysiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD eines repräsentativen Ergebnisses von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

### 3. Die Infektion von LSEC mit MCMV

Im Folgenden wurde die Frage untersucht, ob eine Infektion mit einem Pathogen die tolerisierende Eigenschaft von LSEC beeinflussen würde. Da LSEC resistent gegenüber einer Infektion mit hepatotropen Viren wie Adenoviren oder Hepatitisviren sind (Breiner et al., 2001; Hegenbarth et al., 2000), wurde zunächst versucht, ein Virus zu identifizieren, welches in der Lage ist, LSEC zu infizieren. Murines Cytomegalovirus (MCMV) hat einen breiten Gewebetropismus und infiziert Endothelien (Krpmotic et al., 2003; Podlech et al., 1998; Sacher et al., 2008). Um zu untersuchen, ob MCMV LSEC infiziert, verwendeten wir ein rekombinantes Virus, welches GFP unter dem „immediate-early“-Promotor exprimiert (MCMV-GFP). LSEC wurden mit MCMV-GFP *in*



*in vitro* infiziert und 24Std. später wurde die Anzahl GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte eine Infektion von LSEC mit MCMV-GFP nachgewiesen werden (8,33% GFP<sup>+</sup> Zellen) (Abb. IV.6a). Da nur ein geringer Prozentsatz der LSEC von MCMV-GFP infiziert wurde, wurde die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IFN- $\beta$  24Std. nach Infektion mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass eine Infektion von LSEC mit MCMV zu einer Produktion der beiden Zytokine führte (Abb. IV.6b).



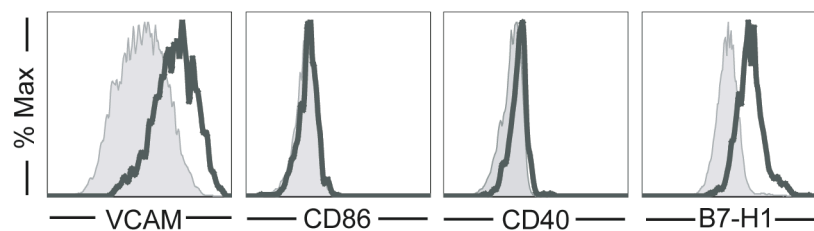
**Abb. IV.6 LSEC werden von MCMV infiziert.**

(a) LSEC wurden nicht infiziert (links) oder mit rekombinantem MCMV-GFP (MOI = 1) für 24Std. infiziert (rechts). ME9F1<sup>+</sup> LSEC wurden auf GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zahlen zeigen % GFP<sup>+</sup> Zellen. (b) LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI = 0,1 oder 1) für 24Std. infiziert und anschließend auf IL-6- und IFN- $\beta$ -Expression mittels ELISA untersucht. Nicht infizierte LSEC (Ø) dienten als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. (a+b) Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass LSEC von MCMV infiziert werden, so dass der Einfluss einer viralen Infektion auf die Maturierung von LSEC untersucht werden kann.

#### 4. MCMV-infizierte LSEC induzieren die Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen

Um den Einfluss einer MCMV-Infektion auf die phänotypische Maturierung von LSEC zu untersuchen, wurde zuerst die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle von LSEC nach MCMV-Infektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In der gleichen Weise wie nach einer TLR-Stimulation zeigte sich auch hier keine verstärkte Expression der Oberflächenmoleküle CD86 und CD40 (Abb. IV.7), welche für eine funktionelle Maturierung von DC notwendig sind. Im Gegensatz dazu wurde auch nach viraler Infektion sowohl das Adhäsionsmolekül VCAM als auch das ko-inhibitorische Molekül B7-H1 verstärkt an der Oberfläche exprimiert (Abb. IV.7). Demzufolge konnte auch hier keine phänotypische Maturierung von LSEC beobachtet werden, die mit der von DC vergleichbar wäre.

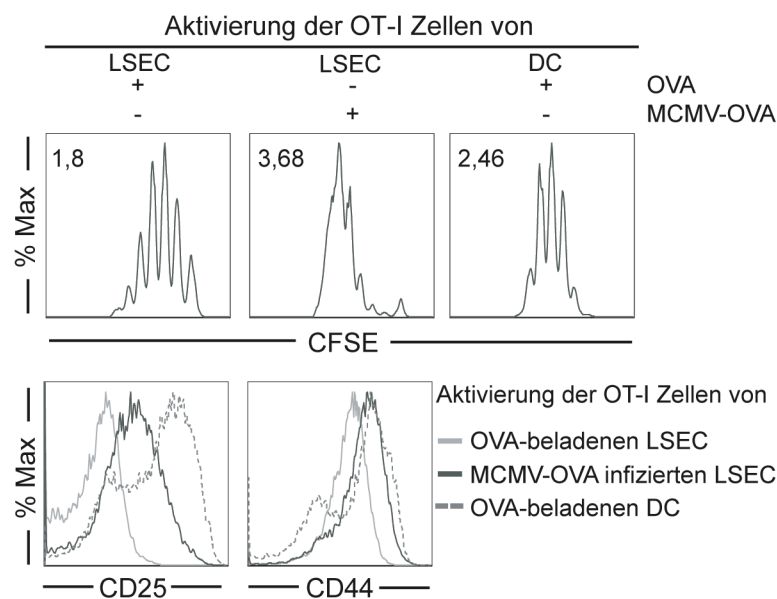


**Abb. IV.7 MCMV-infizierte LSEC zeigen keine phänotypische Maturierung.**

LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI = 1) infiziert und 24Std. später wurde die Expression der Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Grau: nicht infizierte LSEC; schwarz: GFP<sup>+</sup> LSEC. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob LSEC nach einer Virusinfektion die Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen induzieren können, wurde die antigen-spezifische Aktivierung von OT-1 T Zellen nach MCMV-Infektion analysiert. Hierfür wurde ein rekombinantes Virus verwendet, welches OVA unter dem „immediate-early“-Promotor exprimiert (MCMV-OVA). So können nur MCMV-infizierte LSEC das von OVA abstammende Peptid SIINFEKL präsentieren, welches von OT-1 T Zellen erkannt wird. Nach drei Tagen Ko-Kultur von OT-1 T Zellen mit entweder nicht infizierten (LSEC+OVA) oder MCMV-OVA-infizierten LSEC wurde die T Zell-Proliferation und die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD44 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. IV.8). Interessanterweise zeigte sich hier ein deutlicher Unterschied in der Proliferation und Expression der Aktivierungsmarker bei den verschiedenen OT-1 T Zellen. T Zellen, die mit MCMV-OVA-infizierten LSEC ko-kultiviert wurden,

proliferierten stärker (Proliferationsindex 3,68) und exprimierten eine erhöhte Menge von CD25 und CD44 auf ihrer Oberfläche, als T Zellen, welche auf nicht infizierten LSEC ko-kultiviert wurden (Proliferationsindex 1,8) (Abb. IV.8). Als Positivkontrolle wurden auch hier OT-1 T Zellen verwendet, welche auf OVA-beladenen Milz-DC ko-kultiviert wurden. Obwohl diese Zellen in einem geringeren Maße proliferierten (Proliferationsindex 2,46), als OT-1 T Zellen, welche auf MCMV-OVA-infizierten LSEC ko-kultiviert wurden, exprimierten sie mehr CD25. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine verstärkte Aktivierung von OT-1 T Zellen durch MCMV-OVA-infizierte LSEC zu beobachten war, obwohl es zu keiner verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche virusinfizierter LSEC kam.

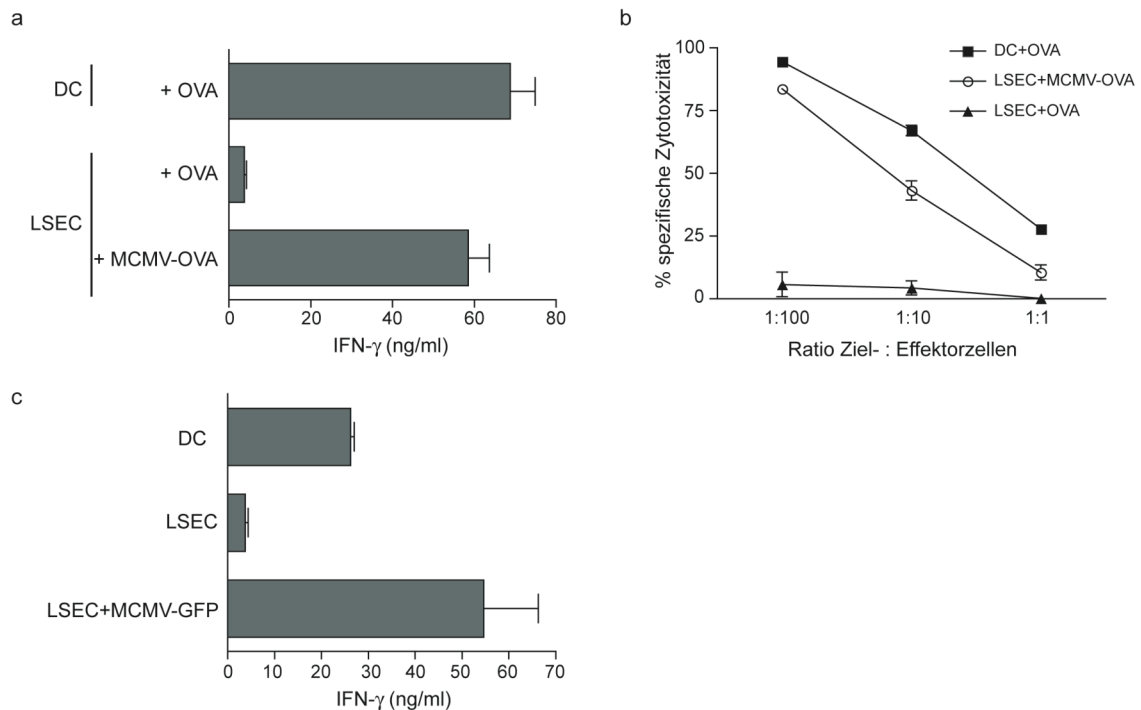


**Abb. IV.8 Aktivierung von CD8 T Zellen durch MCMV-infizierte LSEC.**

CFSE-markierte naive OT-1 T Zellen wurden mit nicht infizierten/OVA-beladenen, MCMV-OVA-infizierten LSEC oder OVA-beladenen Milz-DC ko-kultiviert. Nach drei Tagen wurden die T Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Proliferation (obere Reihe) und Aktivierungsmarker (untere Reihe) untersucht. Zahlen spiegeln den Proliferationsindex wider. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Um die Frage zu beantworten, ob die Aktivierung von OT-1 T Zellen durch virusinfizierte LSEC auch zu einer Induktion von CD8 Effektorzellen führt, wurden OT-1 T Zellen nach vier Tagen Ko-Kultur mit MCMV-OVA-infizierten LSEC restimuliert und zunächst die Produktion von IFN- $\gamma$  mittels ELISA untersucht. OT-1 T Zellen, welche mit MCMV-OVA-infizierten LSEC ko-kultiviert wurden, produzierten vergleichbare Mengen IFN- $\gamma$  wie diejenigen T Zellen, die von immunogenen DC aktiviert wurden (Abb. IV.9a). Des Weiteren wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätstest durchgeführt, um zu überprüfen, ob

die aktivierten T Zellen zusätzlich zu der Fähigkeit, IFN- $\gamma$  zu produzieren, auch in zytotoxische Effektorzellen differenzierten. OT-1 T Zellen, die auf MCMV-OVA-infizierten LSEC ko-kultiviert wurden, zeigten eine ähnliche zytotoxische Aktivität wie T Zellen, die auf immunogenen Milz-DC ko-kultiviert wurden (Abb. IV.9b), was für eine vollständige Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen spricht.



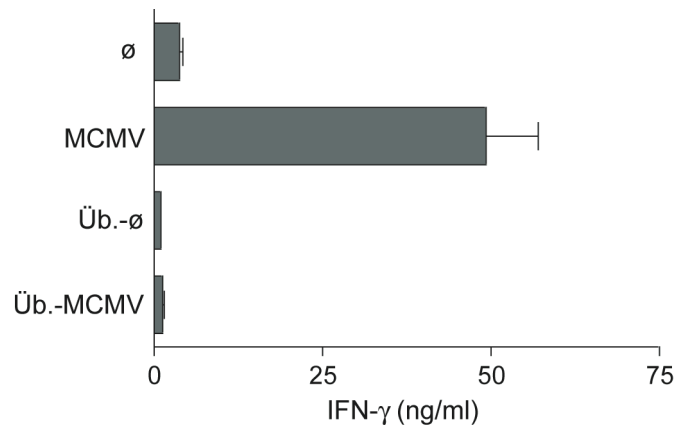
**Abb. IV.9 MCMV-infizierte LSEC induzieren CD8 Effektorzellen.**

(a) MCMV-OVA-infizierte oder OVA-beladene LSEC oder OVA-beladene Milz-DC wurden für vier Tage mit naiven OT-1 T Zellen ko-kultiviert. Die gleiche Anzahl lebender T Zellen wurde anschließend restimuliert und mittels ELISA 16Std. später auf IFN- $\gamma$ -Produktion analysiert. (b) OT-1 T Zellen wurden wie in (a) aktiviert und anschließend in einem *in vitro* Zytotoxizitätstest analysiert. (c) Nicht infizierte oder MCMV-GFP-infizierte LSEC wurden für vier Tage mit naiven DesTCR CD8 T Zellen ko-kultiviert. Analyse der IFN- $\gamma$ -Produktion der T Zellen wie in (a). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Eine Erklärung für die Aktivierung der T Zellen durch infizierte LSEC könnte sein, dass bei einer MCMV-OVA-Infektion mehr endogenes OVA auf der Oberfläche von LSEC präsentiert wird, als bei der Aufnahme und Kreuzpräsentation von löslichem OVA. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden transgene CD8 T Zellen verwendet, welche endogene Peptide erkennen, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden (DesTCR) (Schonrich et al., 1991). LSEC wurden entweder nicht oder mit MCMV-GFP infiziert und anschließend mit DesTCR T Zellen vier Tage ko-kultiviert. Danach wurden die

DesTCR T Zellen restimuliert und anhand ihrer Fähigkeit, IFN- $\gamma$  zu produzieren, auf Toleranz oder Aktivierung untersucht. Nicht infizierte LSEC induzierten auch in DesTCR T Zellen Toleranz, während virusinfizierte LSEC DesTCR T Zellen aktivieren konnten (Abb. IV.9c). Da in beiden Fällen die gleiche Menge an endogenem Peptid auf der Oberfläche vorhanden sein sollte, schließt dieser Versuch aus, dass die Aktivierung der T Zellen auf unterschiedliche Antigenmengen an der Oberfläche zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine MCMV-Infektion von LSEC zwar nicht zu einer erhöhten Expression der bisher bekannten ko-stimulatorischen Moleküle auf ihrer Oberfläche führte, dennoch konnten infizierte LSEC die Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in zytotoxische Effektorzellen induzieren. Diesem Vorgang lag aller Wahrscheinlichkeit nach eine funktionelle Maturierung von LSEC nach einer Virusinfektion zu Grunde.

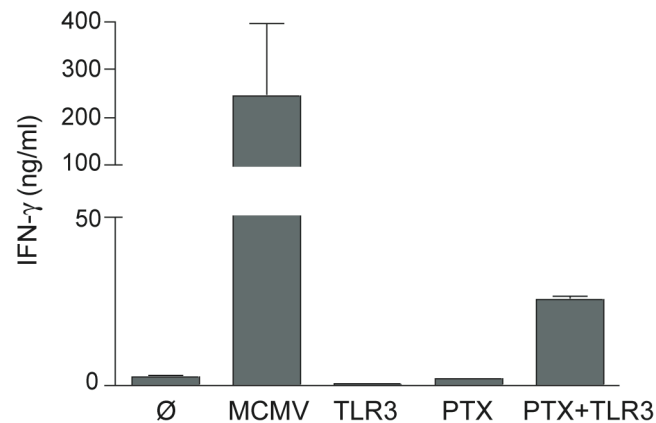
Als nächstes stellte sich die Frage, wie in LSEC eine virusvermittelte funktionelle Maturierung induziert wird. Generell könnte eine Maturierung auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: die erste Möglichkeit ist eine zell-autonome Reifung der Zellen, was bedeutet, dass diese nur dann erfolgt, wenn die Zelle direkt von einem Virus infiziert wurde. Zum zweiten könnte eine Reifung über lösliche Faktoren wie z.B. IFN- $\beta$  vermittelt werden, welches z.B. auf DC einen immunstimulierenden Effekt hat (Shirota et al., 2006). Um diese Frage zu beantworten, wurden LSEC zunächst mit MCMV-GFP infiziert. 24Std. später wurde der Überstand abgenommen, bestrahlt (um noch evtl. vorhandenes Virus zu eliminieren) und auf nicht infizierte LSEC transferiert. Nach weiteren 24Std. Inkubation wurde der Überstand abgenommen, DesTCR T Zellen zugegeben und nach vier Tagen deren Aktivierung bestimmt. Wie in Abb. IV.10 anhand der fehlenden IFN- $\gamma$ -Produktion zu sehen, wurden T Zellen auch nach Transfer des Überstands infizierter LSEC toleriert. Dies zeigt, dass für die Maturierung von LSEC wahrscheinlich zell-autonome Mechanismen verantwortlich sind, wobei lösliche Faktoren keine Rolle spielen.



**Abb. IV.10 Zell-autonome Maturierung von LSEC nach MCMV-Infektion.**

LSEC wurden entweder mit MCMV-GFP (MOI = 1) für 24Std. infiziert oder mit Überstand von MCMV-infizierten (Üb.-MCMV; UV-bestrahlt) oder nicht infizierten (Üb.-Ø; UV-bestrahlt) LSEC inkubiert und anschließend mit naiven DesTCR T Zellen ko-kultiviert. Analyse der IFN- $\gamma$ -Produktion nach Restimulation der T Zellen mittels ELISA. Unbehandelte LSEC (Ø) dienen als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten.

Eine weitere Möglichkeit, DC zu aktivieren, ist die Behandlung der Zellen mit Pertussis Toxin (PTX), welches daher unter anderem als Adjuvanz verwendet wird (Bagley et al., 2002). PTX induziert über cAMP andere Signalwege in der Zelle als eine TLR-Stimulation (Cheng et al., 2008). Da eine Stimulation mit TLR-Liganden alleine keinen Einfluss auf die Reifung von LSEC hatte, wurde untersucht, ob PTX alleine oder in Kombination mit TLR-Liganden zu einer Maturierung von LSEC führt. Nach Vorstimulation von LSEC mit PTX oder mit PTX in Kombination mit dem TLR3-Liganden polyIC wurden DesTCR T Zellen zugegeben und nach vier Tagen auf ihre Fähigkeit untersucht, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Interessanterweise ließ sich hier feststellen, dass PTX in Kombination mit polyIC in der Lage war, LSEC zu maturieren, was zu einer Aktivierung der T Zellen und somit zu einer IFN- $\gamma$ -Produktion nach Restimulation führte (Abb. IV.11). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass eine Maturierung der LSEC über Signalwege induziert wurde, welche durch PTX und TLR3 aktiviert werden, obwohl die Menge an produziertem IFN- $\gamma$  geringer war als bei T Zellen, welche durch MCMV-infizierte LSEC aktiviert wurden. Zudem scheint es einen synergetischen Effekt beider Signalwege zu geben, der einen Schwellenwert für die Aktivierung erreicht, da nur nach kombinatorischer Applikation von PTX und polyIC eine Maturierung zu beobachten war. Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, welche Signalwege innerhalb von LSEC für die Maturierung der Zellen verantwortlich sind.



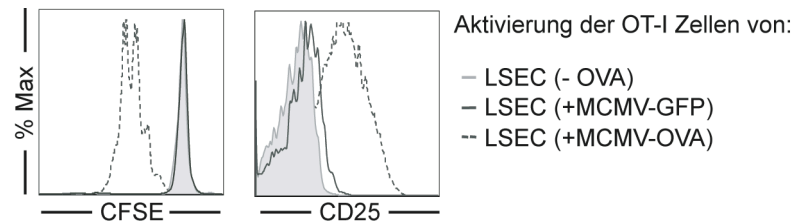
**Abb. IV.11 Die Maturierung von LSEC kann durch PTX in Kombination mit polyIC induziert werden.** MCMV-GFP-infizierte (MOI = 1 für 24Std.), TLR3-stimulierte (polyIC, 10 $\mu$ g/ml für 24Std.), PTX-vorbehandelte (20ng/ml für 1,5Std.) oder mit einer Kombination von polyIC + PTX stimulierte LSEC wurden mit DesTCR T Zellen ko-kultiviert. Vier Tage später wurden die restimulierten T Zellen auf IFN- $\gamma$ -Produktion analysiert. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD eines repräsentativen Ergebnisses aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass LSEC nach einer direkten Infektion mit MCMV in der Lage waren, zu maturieren, was zu einer Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in zytotoxische Effektorzellen führte. Ein möglicher Mechanismus dieser Maturierung könnte über die Signalwege gesteuert werden, welche durch Pertussis Toxin und TLR-Stimulation induziert werden.

## 5. LSEC induzieren CD8 T Zell-Aktivierung unabhängig von CD80/86

Für die Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen durch DC oder Makrophagen sind drei Signale notwendig, die von der APC bereitgestellt werden müssen: Signal 1 durch das MHC-I-Molekül, welches das entsprechende Peptid gebunden hat (Signal 1 über den T Zell-Rezeptor an die T Zelle), Signal 2 durch die ko-stimulatorischen Moleküle CD80/86 (über CD28 der T Zelle) und Signal 3 als löslicher Faktor wie IL-12 oder Typ I-IFN (Williams and Bevan, 2007). Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von CD8 T Zellen durch LSEC über diese Signale verläuft, wurden zunächst LSEC mit MCMV-GFP infiziert und anschließend mit OT-1 T Zellen inkubiert. Da hier MCMV-GFP verwendet wurde, sollte es zwar zu einer Reifung der LSEC kommen, jedoch wird kein Signal 1 durch LSEC an OT-1 T Zellen vermittelt, da diese nur das von OVA abstammende Peptid SIINFEKL erkennen. Nach

drei Tagen Ko-Kultur wurden mittels Durchflusszytometrie die Proliferation und die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 bestimmt. OT-1 T Zellen, welche mit MCMV-GFP-infizierten LSEC ko-kultiviert wurden, zeigten keine Proliferation und keine erhöhte Expression von CD25 (Abb. IV.12). Im Gegensatz dazu proliferierten OT-1 T Zellen, die von MCMV-OVA-infizierten LSEC aktiviert wurden, und exprimierten verstärkt CD25 an ihrer Oberfläche. Daraus kann man schließen, dass OT-1 T Zellen, die auf MCMV-GFP-infizierten LSEC ko-kultiviert wurden, einen naiven Phänotyp zeigen (Abb. IV.12). Dies verdeutlicht, dass die Bereitstellung des T Zell-Rezeptor-Signals durch Antigenpräsentation der LSEC für die Aktivierung der T Zellen unbedingt notwendig ist.



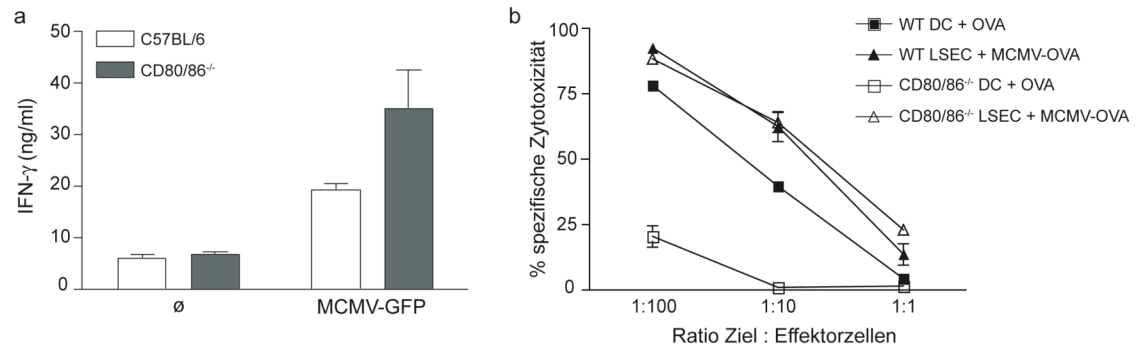
**Abb. IV.12 Aktivierung der T Zellen durch LSEC ist abhängig von Signal 1.**

LSEC wurden entweder mit MCMV-GFP oder MCMV-OVA (MOI = 1) für 24Std. infiziert und anschließend mit naiven CFSE-markierten OT-1 T Zellen ko-kultiviert. Proliferation und CD25-Expression wurden drei Tage später mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Als nächstes wurde bestimmt, ob Signal 2 (CD28) für die T Zelle über CD80/86 bei der LSEC-vermittelten Aktivierung eine Rolle spielt. Es war keine verstärkte Expression von CD86 an der Zelloberfläche nach MCMV-Infektion von LSEC zu beobachten (Abb. IV.7). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden T Zellen mit virusinfizierten LSEC von CD80/86<sup>-/-</sup> Mäusen ko-kultiviert und anschließend auf Effektorfunktionen (IFN- $\gamma$ -Produktion und Zytotoxizität) untersucht (Abb. IV.13). Interessanterweise konnte man deutlich beobachten, dass T Zellen unabhängig von CD80/86 aktiviert wurden, was sogar zu einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Expression führte (Abb. IV.13a). Des Weiteren zeigten diese OT-1 T Zellen in einem *in vitro* Zytotoxizitätstest eine vergleichbare zytotoxische Aktivität wie diejenigen T Zellen, die von infizierten Wildtyp-LSEC aktiviert wurden (Abb. IV.13b). Im Gegensatz dazu war bei einer Aktivierung von CD8 T Zellen durch DC das Vorhandensein von CD80/86 unbedingt erforderlich, da T Zellen, die mit DC von CD80/86<sup>-/-</sup> Mäusen ko-kultiviert wurden, eine deutlich reduzierte Zytotoxizität



aufwiesen (Abb. IV.13b). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Aktivierung von CD8 T Zellen durch virusinfizierte LSEC unabhängig der ko-stimulatorischen Signale CD80/86 verläuft.



**Abb. IV.13 Die Aktivierung von T Zellen durch LSEC ist unabhängig von Signal 2.**

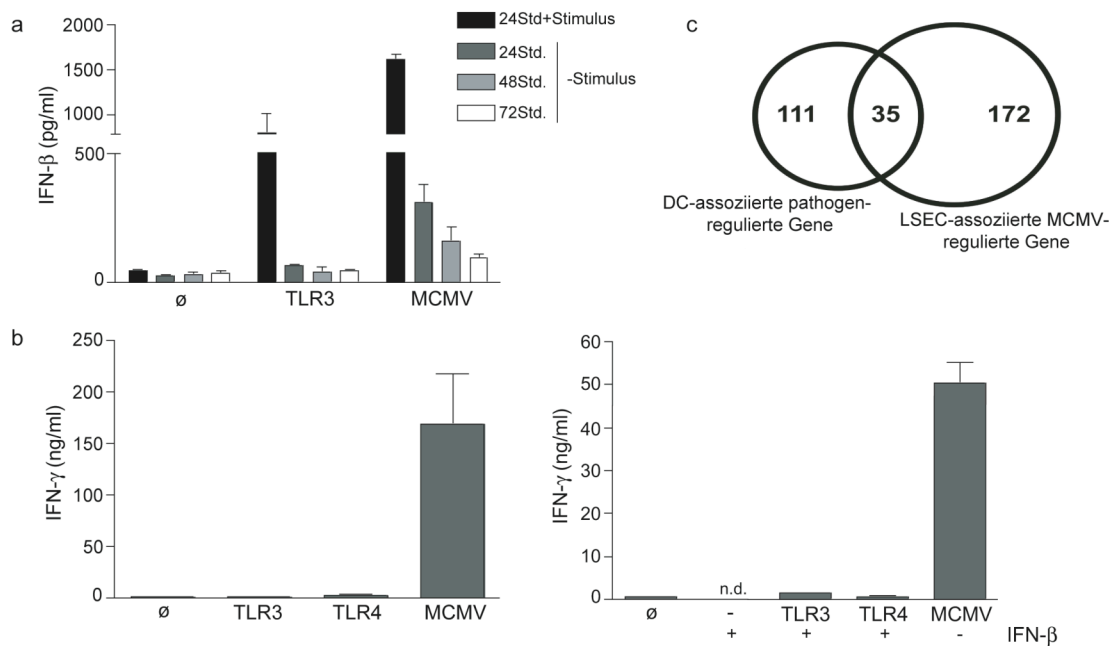
(a) LSEC von C57BL/6 oder CD80/86<sup>-/-</sup> Mäusen wurden entweder nicht ( $\emptyset$ ) oder mit MCMV-GFP infiziert (MOI = 1 für 24Std.) und mit naiven DesTCR T Zellen vier Tage ko-kultiviert. Anschließend wurden die T Zellen restimuliert und die IFN- $\gamma$ -Produktion durch ELISA bestimmt. (b) OT-1 T Zellen wurden entweder von MCMV-OVA-infizierten LSEC oder von OVA-beladenen Milz-DC von Wildtyp (WT) oder CD80/86<sup>-/-</sup> Mäusen wie in (a) aktiviert und anschließend in einem *in vitro* Zytotoxizitätstest analysiert. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten.

Das dritte wichtige Signal bei einer CD8 T Zell-Aktivierung ist der lösliche Faktor IL-12, welcher auch durch Typ I-IFN ersetzt werden kann. Da LSEC nach MCMV-Infektion kein IL-12 (nicht publizierte Beobachtung von Kai Scholz), aber IFN- $\beta$  sezernierten (Abb. IV.6b), wurde zunächst die Kinetik der IFN- $\beta$ -Expression nach MCMV-Infektion bestimmt (Abb. IV.14a). LSEC, die mit MCMV infiziert wurden, zeigten nach 24Std. eine starke IFN- $\beta$ -Produktion (schwarzer Balken). Anschließend wurde das Virus abgenommen und für weitere 72Std. die IFN- $\beta$ -Expression bestimmt (dunkelgraue, graue und weiße Balken). Obwohl das Virus nicht mehr vorhanden war, sezernierten LSEC bis zu 72Std. später noch IFN- $\beta$ . Als Vergleich wurden LSEC 24Std. mit dem TLR3-Liganden polyIC stimuliert, was ebenfalls zu einer IFN- $\beta$ -Produktion führte (Abb. IV.1c und Abb. IV.14a). Im Gegensatz zu einer MCMV-Infektion zeigten LSEC sofort nach Wegnahme des TLR3-Liganden keine Produktion von IFN- $\beta$  mehr (Abb. IV.14a). Dies könnte für eine wichtige Rolle von IFN- $\beta$  bei der Aktivierung von CD8 T Zellen durch LSEC sprechen, da das von LSEC sezernierte IFN- $\beta$  direkt als Signal 3 auf T Zellen wirken könnte. Dies würde erklären, warum eine Stimulation der TLR von LSEC alleine nicht ausreichte, um T Zellen zu aktivieren (Abb. IV.5), da hier während der Ko-Kultur kein Ligand mehr vorhanden war und folglich kein IFN- $\beta$  mehr produziert

wurde. Um die Rolle von IFN- $\beta$  bei der Aktivierung der T Zellen näher zu untersuchen, wurde hierfür über die gesamte Dauer der Ko-Kultur eine TLR-Stimulation durchgeführt, was zu einer anhaltenden IFN- $\beta$ -Sekretion ähnlich wie bei einer Virusinfektion führen sollte. Es konnte jedoch in diesem Zusammenhang keine immunstimulierende Wirkung von IFN- $\beta$  gezeigt werden, da T Zellen auch in diesem Fall nach Restimulation kein IFN- $\gamma$  produzierten. Dies weist darauf hin, dass sie tolerisiert wurden (Abb. IV.14b, links). Da es bei einer MCMV-Infektion zu einer deutlich höheren Sekretion von IFN- $\beta$  als bei einer TLR-Stimulation kam, wurde in einem weiteren Experiment zusätzlich zu TLR-Liganden noch exogen IFN- $\beta$  in die Ko-Kultur zugegeben (Abb. IV.14b, rechts). Doch auch hier konnte eine Toleranzinduktion in T Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass IFN- $\beta$  nicht der alleinige Faktor ist, welcher bei der Aktivierung von CD8 T Zellen durch LSEC notwendig ist. Es kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass IFN- $\beta$  nach einer Virusinfektion in Kombination mit anderen, bisher nicht bekannten Signalen, immunstimulatorisch wirkt.

Zusammengenommen zeigen diese Daten jedoch, dass die Aktivierung von CD8 T Zellen durch virusinfizierte LSEC durch andere Mechanismen vermittelt wird, als es bisher für DC beschrieben ist.

Um die Maturierung tolerisierender in immunogene LSEC im Vergleich zu immunogenen DC näher zu charakterisieren, wurde eine Gen-Expressionsanalyse MCMV-infizierter LSEC durchgeführt und diese mit derjenigen von DC nach Infektion verglichen. Dafür wurde ein Datensatz von Huang et al. verwendet, welcher zeigt, dass DC über eine allgemeine transkriptionelle Signatur nach einer Infektion verfügen, unabhängig davon, mit welchem Pathogen sie infiziert wurden (hier pathogen-regulierte Gene genannt) (Huang et al., 2001). Eine Kreuzannotation dieser Signatur mit dem murinen Genom führte zu 246 Transkripten, die für 149 Gene kodierten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nur 24% (n=35) dieser Gene auch in MCMV-infizierten LSEC signifikant reguliert wurden, was zusätzlich verdeutlicht, dass beide Zellen sehr unterschiedlich auf eine Infektion reagieren (Abb. IV.14c). Die meisten Gene, die von beiden Zellpopulationen reguliert wurden, waren IFN- $\beta$ -abhängige Gene, die bei LSEC nicht für die Maturierung verantwortlich sind (Abb. IV.14b). Des Weiteren sind 85% (n= 172) der MCMV-spezifischen Gene nur in LSEC reguliert, nicht jedoch in DC (Abb. IV.14c).



**Abb. IV.14 IFN-β von LSEC induziert nicht als einziger Faktor eine T Zell-Aktivierung.**

(a) Kinetik der IFN-β-Expression nach MCMV-Infektion (MOI = 1) oder nach TLR3-Stimulation (polyIC, 10µg/ml) (schwarzer Balken). Nach 24Std. wurde frisches Medium zu den LSEC gegeben und die IFN-β-Produktion von LSEC für weitere 72Std. (24Std.-72Std. – Stimulus) mittels ELISA analysiert. (b) LSEC wurden mit Liganden für TLR3 (polyIC, 10µg/ml) und TLR4 (LPS, 100ng/ml) stimuliert. Die TLR-Liganden wurden konstitutiv in der Ko-Kultur mit DesTCR T Zellen zugegeben (links) oder wurden durch die Gabe von exogenem IFN-β (40U/ml) in die Ko-Kultur ergänzt (rechts). Nach vier Tagen wurden die T Zellen restimuliert und mittels ELISA auf IFN-γ-Produktion analysiert. n.d. nicht detektierbar (a+b) Gezeigt ist der Mittelwert ± SD eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten. (c) Das Venn-Diagramm zeigt die Schnittmenge der DC-assozierten pathogen-regulierten Gene (linker Kreis) mit den LSEC-assozierten MCMV-regulierten Genen (n=8) (rechts). Abgebildet ist die Anzahl signifikant regulierter Gene.

Zusammenfassend heben diese Ergebnisse deutlich hervor, dass sich der Mechanismus der T Zell-Aktivierung durch LSEC grundsätzlich von dem durch DC unterscheidet und unabhängig von CD80/86 und IL-12 verläuft.

## 6. MCMV-infizierte LSEC induzieren CD8 T Zell-Immunität *in vivo*

Um zu untersuchen, ob LSEC auch *in vivo* in der Lage sind, CD8 T Zell-Immunität zu induzieren, wurden [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Knochenmarkschimären verwendet. Hierfür wurden zuvor bestrahlte C57BL/6 Mäuse mit Knochenmark von B6.CH-2<sup>bm1</sup> Mäusen rekonstituiert. B6.CH-2<sup>bm1</sup> Mäuse tragen eine Punktmutation in ihrem MHC-I-

Molekül, so dass keine Präsentation des SIINFEKL-Peptids stattfinden kann. Demzufolge können in [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Knochenmarkschimären keine Zellen des hämatopoietischen Systems wie DC oder Makrophagen über die Präsentation von OVA OT-1 T Zellen aktivieren. Stattdessen sind nur strahlungsresistente, nicht-hämatopoietische Zellen wie LSEC in der Lage, OVA aufzunehmen und SIINFEKL zu präsentieren, was unter physiologischen Bedingungen zu einer CD8 T Zell-Toleranz führt (von Oppen et al., 2008).

24Std. nach einer Infektion von entweder C57BL/6 Mäusen oder [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Chimären mit MCMV-OVA wurden OT-1 T Zellen, die den Marker Thy1.1 an ihrer Oberfläche tragen, adoptiv transferiert und nach fünf Tagen auf ihre Expansion und auf ihre Fähigkeit, IFN- $\gamma$  zu produzieren, untersucht (Abb. IV.15). Eine Infektion von C57BL/6 Mäusen mit MCMV-OVA führte zu einer massiven Expansion der OT-1 T Zellen sowohl in der Milz als auch in der Leber. Nach antigen-spezifischer Restimulation *ex vivo* produzierten die OT-1 Zellen IFN- $\gamma$  (Abb. IV.15a), was auf deren Differenzierung in Effektorzellen hindeutet. Im Gegensatz dazu konnte keine Aktivierung der OT-1 T Zellen nach MCMV-GFP-Infektion beobachtet werden, was generell die Antigen-spezifität der OT-1 Aktivierung nach einer MCMV-Infektion beweist.

Interessanterweise konnte eine ähnliche Expansion und IFN- $\gamma$ -Produktion der OT-1 T Zellen auch in MCMV-OVA-infizierten [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Chimären beobachtet werden (Abb. IV.15b, c), was zeigt, dass eine Differenzierung von CD8 T Zellen in Effektorzellen nach einer MCMV-Infektion auch in Abwesenheit von DC und Makrophagen erfolgen kann und wahrscheinlich durch LSEC vermittelt wird.

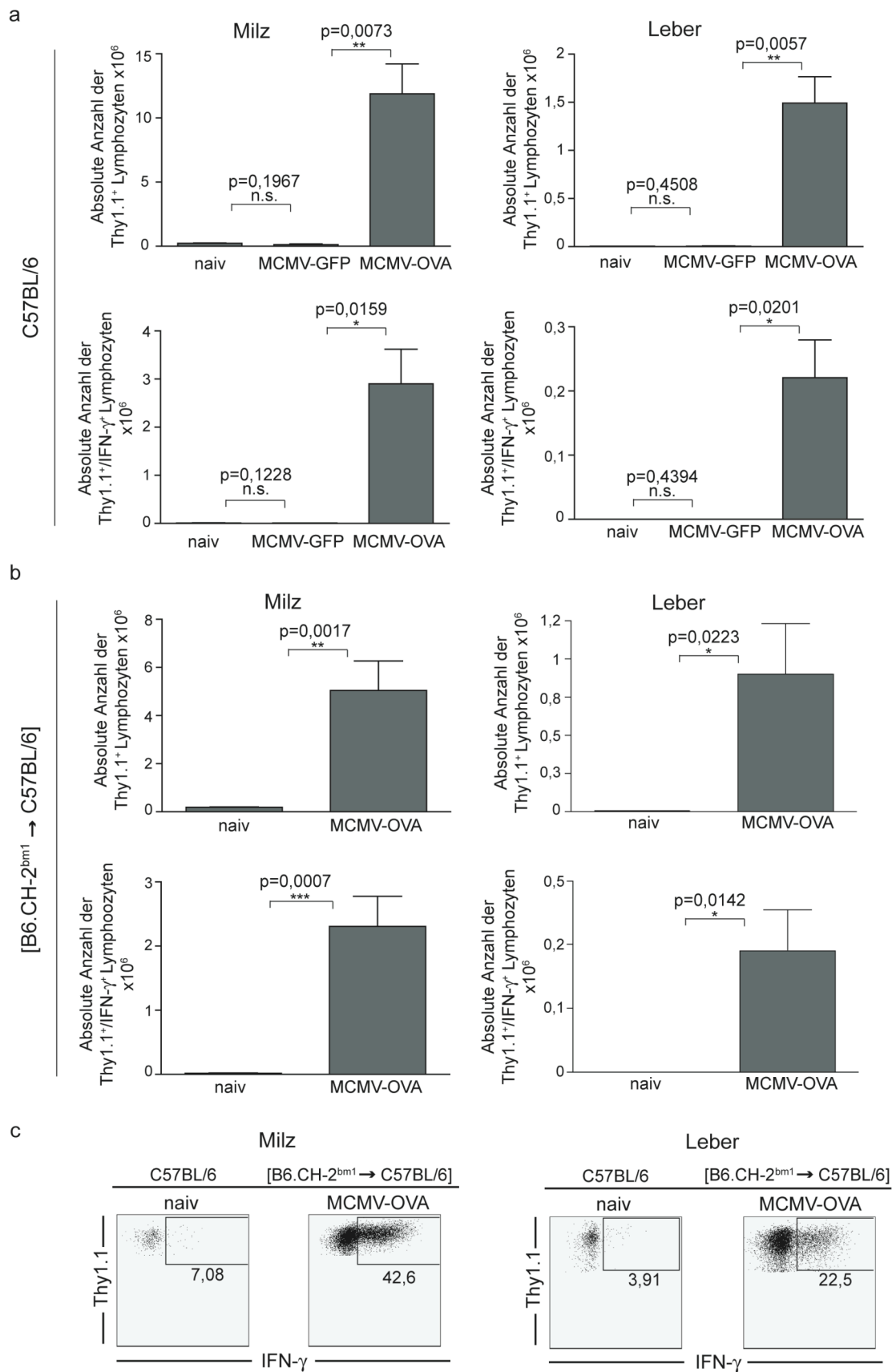


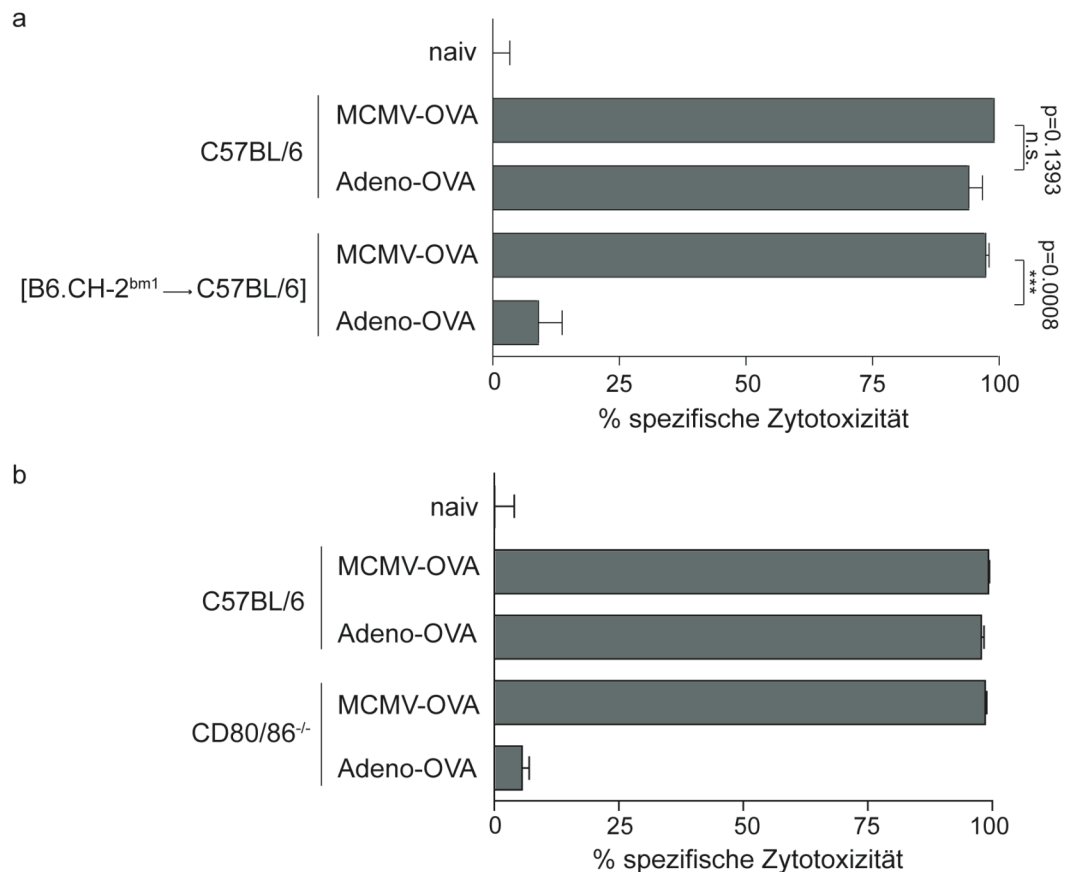
Abb. IV.15 LSEC induzieren nach MCMV-Infektion CD8 T Zell-Immunität *in vivo*.

(a) C57BL/6 Mäusen wurde entweder PBS (naiv), MCMV-GFP oder MCMV-OVA (jeweils  $2,5 \times 10^4$  PFU) einen Tag vor adoptivem Transfer von  $5 \times 10^6$  Thy1.1<sup>+</sup> OT-1 T Zellen i.v. injiziert. Vier Tage später wurde die Expansion (obere Reihe) und IFN- $\gamma$ -Expression nach antigen-spezifischer Restimulation (untere Reihe) der OT-1 T Zellen in Milz und Leber mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n=3) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten. (b) OT-1 T Zellen wurden wie in (a) in nicht infizierte C57BL/6 (naiv) oder in MCMV-OVA-infizierte [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Chimären transferiert. Analyse der OT-1 T Zellen wie in (a). Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n=6) von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Tieren pro Gruppe. (c) Repräsentative Dot Plots eines Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten. Zahlen bedeuten % Thy1.1<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen. (a+b) Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

Um die Effektorfunktion der CD8 T Zellen näher zu untersuchen, wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest von OT-1 T Zellen fünf Tage nach MCMV-OVA-Infektion von entweder C57BL/6 oder [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Chimären durchgeführt (Abb. IV.16). Auch hier zeigte sich, dass aktivierte OT-1 T Zellen aus den MCMV-OVA-infizierten Chimären eine nahezu identische Zytotoxizität aufwiesen ( $97,4\% \pm 0,5$ ), wie T Zellen, die in C57BL/6 Mäusen aktiviert wurden ( $98,9\% \pm 0,1$ ) (Abb. IV.16a). Um weiterhin zu bestätigen, dass LSEC diejenigen Zellen sind, die für die Aktivierung der CD8 T Zellen verantwortlich sind und um auszuschließen, dass kontaminierende DC oder Makrophagen diesen Effekt bewirken, wurden C57BL/6 und [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Chimären mit rekombinantem Adenovirus infiziert, welches OVA exprimiert (Adeno-OVA). Da LSEC nicht von Adenoviren infiziert werden (Hegenbarth et al., 2000), sollte in den Chimären keine Aktivierung der OT-1 T Zellen zu sehen sein. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in den Chimären keine CD8 T Zell-Immunantwort nach Adeno-OVA-Infektion induziert wurde (Abb. IV.16a). Im Gegensatz dazu war in C57BL/6 Mäusen eine effektive Immunantwort nach der Adeno-OVA-Infektion zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass LSEC eine wichtige Rolle bei der Induktion einer CD8 Immunantwort spielen können, sofern sie selbst von einem Virus infiziert werden.

Mechanistisch konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Aktivierung von CD8 T Zellen durch LSEC unabhängig der ko-stimulatorischen Moleküle CD80/86 erfolgte (Abb. IV.13). Um diesen Effekt *in vivo* zu bestätigen, wurden die gleichen Infektionsexperimente mit C57BL/6 und CD80/86<sup>-/-</sup> Mäusen wiederholt. Wie zu erwarten, konnte in C57BL/6 sowohl bei einer Adeno-OVA als auch bei einer MCMV-OVA-Infektion eine Induktion von CD8 T Zell-Immunität beobachtet werden, was sich in einer effizienten Zytotoxizität widerspiegelte (Abb. IV.16b). Im Gegensatz dazu wurde in CD80/86<sup>-/-</sup> Mäusen eine CD8 Immunantwort nur nach einer MCMV-OVA-Infektion induziert, wohingegen keine zytotoxische Aktivität nach einer Adeno-OVA-

Infektion zu beobachten war (Abb. IV.16b). Diese Ergebnisse bestätigen, dass unter bestimmten Bedingungen die Induktion einer Immunantwort unabhängig von CD80/86 auch *in vivo* erfolgen kann. Da wir *in vitro* eindeutig zeigen konnten, dass LSEC unabhängig von CD80/86 CD8 T Zellen aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass dieser auch *in vivo* zu beobachtende Effekt auf LSEC zurückzuführen ist.



**Abb. IV.16 LSEC induzieren CD8 Effektorzellen unabhängig von CD80/86 *in vivo*.**

(a)  $1 \times 10^6$  OT-1 T Zellen wurden in C57BL/6 Mäusen oder in [B6.CH-2<sup>bm1</sup> → C57BL/6] Chimären einen Tag vor Infektion der Mäuse mit entweder  $2,5 \times 10^4$  PFU MCMV-OVA oder  $1 \times 10^7$  PFU Adeno-OVA transferiert. Die zytotoxische Aktivität wurde fünf Tage nach Infektion mittels *in vivo* Zytotoxizitätstest bestimmt. (b) OT-1 T Zellen wurden in C57BL/6 oder CD80/86<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert und anschließend wurden die Tiere wie in (a) infiziert und die zytotoxische Aktivität bestimmt. (a+b) Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n=3) eines repräsentativen Ergebnisses zweier unabhängiger Experimente. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass nicht-hematopoietische Zellen, wie z.B. LSEC, eine Rolle bei der Induktion von CD8 T Zell-Immunität *in vivo* spielen und dass dies sogar in Abwesenheit von DC oder Makrophagen und unabhängig von CD80/86 erfolgen kann.

## V. Diskussion

LSEC sind organ-residente APC, die mit CD8 T Zellen interagieren und unter physiologischen Bedingungen CD8 T Zell-Toleranz induzieren (Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2000). Ziel dieser Arbeit war es, die Frage zu beantworten, ob LSEC zudem in der Lage sind, Pathogene als solche zu erkennen und anschließend CD8 T Zellen zu aktivieren, wie es für andere professionelle APC wie DC beschrieben ist (Janeway and Medzhitov, 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LSEC verschiedene PRR, unter anderem TLR, funktionell exprimieren. Des Weiteren konnte belegt werden, dass LSEC nach der Stimulation mit spezifischen Liganden für verschiedene PRR ihre Fähigkeit aufrechterhalten, Toleranz in CD8 T Zellen zu induzieren. Es wurde gezeigt, dass eine Infektion von LSEC mit MCMV zu einer Aktivierung von naiven CD8 T Zellen und zu deren Differenzierung in zytotoxische T Lymphozyten *in vitro* und *in vivo* führte. Diese Aktivierung erfolgte unabhängig von den ko-stimulatorischen Molekülen CD80/CD86 und IL-12. Dies hebt hervor, dass LSEC in der Lage sind, CD8 T Zell-Immunität zu induzieren, welche nach anderen Mechanismen verläuft als sie für DC beschrieben sind.

### 1. LSEC induzieren CD8 T Zell-Toleranz nach Stimulation mit spezifischen Liganden für PRR

DC sind Zellen hämatopoietischen Ursprungs, die mit PRR wie TLR ausgestattet sind, und die somit körperfremde Moleküle in Form von PAMP erkennen können, was zu einer Maturierung der DC und zu einer Induktion von T Zell-Immunität führt (Banchereau and Steinman, 1998; Reis e Sousa, 2001). In dieser Arbeit konnte mittels Gen-Expressionsanalysen gezeigt werden, dass LSEC PRR, wie z.B. TLR, exprimieren. Zudem produzierten LSEC nach Stimulation von TLR die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IFN- $\beta$ . Dies zeigt, dass LSEC durch die Produktion von Zytokinen Einfluss auf die lokale Immunregulation der Leber nehmen können. Im Gegensatz zu DC zeigten LSEC jedoch nach einer TLR-Stimulation keinen maturierten Phänotyp in Bezug auf die Expression von CD86 oder CD40. Des Weiteren induzierten LSEC nach TLR-Stimulation einen toleranten Phänotyp in CD8 T Zellen, welcher durch eine fehlende IFN- $\gamma$ -Produktion gekennzeichnet ist (Limmer et al., 2000). Das Gleiche konnte auch für die kombinatorische Stimulation verschiedener TLR beobachtet werden, was bei DC einen synergetischen Effekt in Bezug auf Reifung



und T Zell-Aktivierung zeigt (Napolitani et al., 2005; Poeck et al., 2008). Dies weist auf einen deutlichen Unterschied der beiden Zellpopulationen hin, welcher in dem besonderen Mikromilieu der Leber begründet sein könnte. Die Blutversorgung der Leber erfolgt zum großen Teil über die Pfortader, welche Blut aus dem Gastrointestinaltrakt enthält. Dieses Blut ist reich an Nahrungsmittelantigenen, Toxinen und bakteriellen Degradierungsprodukten, was mit einer konstitutiven Anwesenheit von PAMP, im Besonderen von LPS einhergeht (die physiologische Konzentration von LPS in der Leber beträgt ca. 10pg/ml–1ng/ml) (Jacob et al., 1977; Lumsden et al., 1988). In diesem Zusammenhang wäre eine CD8 T Zell-Aktivierung durch LSEC schädlich, da dies wahrscheinlich mit einem kontinuierlichen Schaden der Leber und eventuell der Induktion von Autoimmunität assoziiert wäre. Demzufolge scheint es sinnvoll, dass eine Stimulation mit TLR-Liganden zu keiner Reifung von LSEC führt und somit die Induktion von Toleranz gegen harmlose Nahrungsmittelantigene stabil erhalten bleibt. Des Weiteren sind hohe Konzentrationen des Zytokins IL-10 in der Leber vorhanden, welches z.B. von Kupffer Zellen oder CD4 T Zellen produziert wird und eine immunsupprimierende Wirkung sowohl auf DC (Steinbrink et al., 1997) als auch auf T Zellen hat und somit zu dem tolerisierenden Milieu beiträgt (Knolle and Gerken, 2000; Knolle et al., 1999b; Knolle et al., 1998b). Der supprimierende Effekt auf hepatische DC kann auch durch TLR-Stimulation nicht aufgehoben werden, so dass eine Aktivierung von T Zellen unter physiologischen Bedingungen in der Leber ausgeschlossen bleibt (Sumpter et al., 2007). Dies zeigt, dass die ansonsten immunstimulierende Wirkung von DC nach TLR-Stimulation durch das Mikromilieu der Leber unterdrückt werden kann. Im Unterschied dazu zeigen LSEC eine intrinsische Resistenz gegenüber der Reifung nach TLR-Stimulation, denn auch 72 Stunden nach der Isolation aus der Leber wurden CD8 T Zellen nach TLR-Stimulation von LSEC noch toleriert. Dies belegt, dass LSEC als organ-residente Zellen an das Mikromilieu der Leber angepasst sind, obwohl sie die entsprechenden PRR funktionell exprimieren. LSEC sezernierten nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden *in vitro* die Zytokine IL-6 und IFN- $\beta$ , was die Frage nach dem Zweck dieser Sekretion aufwirft. Ein Grund hierfür könnte sein, dass das von LSEC sezernierte IL-6 *in trans* auf Hepatozyten wirkt. IL-6 induziert in Hepatozyten die Produktion der Akut-Phase Proteine, welche eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort spielen (Baumann and Gauldie, 1994). Es ist jedoch fraglich, ob LSEC auch *in vivo* ständig IL-6 exprimieren, da dies folglich zu einer kontinuierlichen Produktion der Akut-Phase Proteine führen würde. Durch die konstitutive Anwesenheit von IL-10 in der Leber wird die IL-6 Produktion durch LSEC nach LPS-Stimulation inhibiert (Endotoxin-Toleranz) (Knolle et al., 1999a; Knolle et al., 1997; Uhrig et al., 2005), so dass unter normalen

Bedingungen kein IL-6 produziert wird. Zudem ist es möglich, dass eine Stimulation der TLR durch PAMP unter Flussbedingungen in der Leber nicht ausreicht, um eine IL-6 Antwort zu induzieren. Vorstellbar wäre jedoch, dass es nach einem starken TLR-Stimulus, wie bei einer *in vitro* Stimulation, zu einer IL-6 Sekretion durch LSEC kommen könnte, obwohl IL-10 in der Leber vorhanden ist. Dies könnte der Fall sein, wenn es z.B. nach einer Infektion zu einer erhöhten Konzentration von PAMP kommt. Ein Beleg für diese Hypothese könnte die Arbeit von Lang et al. sein, die zeigt, dass die Perfusion der Leber nach einer Infektion mit LCMV stark reduziert ist (Lang et al., 2008), was somit zu einer lokal erhöhten Konzentration von TLR-Liganden führen könnte. In solch einem Fall käme es nur nach einer Infektion zu einer IL-6 Sekretion durch LSEC und folglich zu einer Produktion der Akut-Phase Proteine.

Ein weiterer Effekt von dem von LSEC produzierten IL-6 könnte die Hemmung der Suppression von naiven CD4 T Zellen durch T<sub>Reg</sub> sein, wie es für IL-6, welches von DC nach TLR-Stimulation produziert wird, beschrieben ist (Pasare and Medzhitov, 2003). T Zellen würden somit für die Aktivierung durch APC sensibilisiert. Jedoch scheint dies für eine Aktivierung von CD8 T Zellen durch LSEC nicht auszureichen, da trotz TLR-Stimulation die Induktion von Toleranz erhalten bleibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LSEC eine Zellpopulation an antigen-präsentierenden Zellen darstellen, die funktionell PRR exprimieren und dennoch die CD8 T Zell-Toleranz nach TLR-Stimulation stabil aufrechterhalten.

## **2. Virus-infizierte LSEC vermitteln die Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in Effektorzellen**

Die Leber ist aufgrund ihres tolerisierenden Milieus ein Organ, welches häufig Ort persistierender Infektionen darstellt, wie z.B. durch Infektionen mit Hepatitisviren (Rehermann et al., 1996; Spengler et al., 1996) oder Plasmodien (der Erreger der Malaria) (Good, 1995). Daher und aufgrund der eher suppressiven Funktion von hepatischen DC stellt sich im Falle einer Infektion die Frage, wie eine lokale Immunantwort in der Leber generiert werden könnte. Hierfür wurde in dieser Arbeit die Rolle von LSEC als antigen-präsentierende Zellen näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass LSEC teilweise von MCMV infiziert wurden, wohingegen keine Infektion mit Adeno- oder Hepatitisviren erfolgt (Breiner et al., 2001; Hegenbarth et al., 2000). Des Weiteren konnte belegt werden, dass MCMV-infizierte LSEC eine Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in zytotoxische Effektorzellen induzierten. Dies deutet darauf hin, dass LSEC nach einer Virusinfektion einen Reifungsprozess durchlaufen, welcher

in der Aktivierung von T Zellen endet. Dies wurde anhand von OT-1 T Zellen untersucht, welche das von OVA abstammende Peptid SIINFEKL gebunden an MHC-I-Moleküle erkennen. Lösliches OVA wird von LSEC aufgenommen und an der Oberfläche kreuzpräsentiert, was unter nicht-inflammatorischen Bedingungen zu einer Toleranzinduktion in OT-1 T Zellen führt, welche durch eine fehlende IFN- $\gamma$ -Produktion und eine fehlende zytotoxische Aktivität gekennzeichnet ist (Limmer et al., 2000). Um den Effekt einer Virusinfektion auf OT-1 Zellen zu analysieren, wurde ein rekombinantes MCMV verwendet, welches OVA unter dem „immediate-early“-Promotor exprimiert (MCMV-OVA). In diesem Fall können nur MCMV-infizierte LSEC SIINFEKL präsentieren, so dass der Effekt einer Virusinfektion direkt auf OT-1 T Zellen analysiert werden kann, was - wie oben beschrieben - zu einer T Zell-Aktivierung führte. Der Nachteil dieses Systems ist, dass hier die Kreuzpräsentation eines Antigenes mit der Präsentation eines endogenen viralen Proteins verglichen wird, wobei sich die absolute Menge an präsentiertem Antigen an der Zelloberfläche unterscheiden könnte. LSEC, die große Mengen an OVA (Konzentrationen um 1mg/ml) aufgenommen haben, können ebenfalls T Zellen aktivieren, so dass diese IFN- $\gamma$  produzieren (nicht publizierte Beobachtung von Anna Schurich). Dies spricht dafür, dass ein starkes Signal 1 von antigen-präsentierenden LSEC an die T Zelle ein fehlendes ko-stimulatorisches Signal ersetzen kann, was somit in einer T Zell-Aktivierung enden würde, aber keine eigentliche Reifung von LSEC voraussetzt. Daher könnte die Aktivierung der T Zellen nach einer MCMV-OVA-Infektion nicht auf eine direkte Reifung der LSEC zurückzuführen sein, sondern einfach aufgrund unterschiedlicher Mengen an präsentiertem Antigen an der Zelloberfläche erfolgen. Um zu untersuchen, ob dies bei der LSEC vermittelten Aktivierung von T Zellen vorliegt, wurde ein transgenes T Zell-System verwendet, bei dem CD8 T Zellen endogene Peptide auf MHC-I-Molekülen erkennen (DesTCR) (Schonrich et al., 1991). Dies führte zu einer CD8 T Zell-Toleranz induziert durch unstimulierte LSEC, zum anderen wurden DesTCR T Zellen durch virusinfizierte LSEC in der gleichen Weise aktiviert wie zuvor OT-1 T Zellen. Da hier die Aktivierung der T Zellen über Antigene erfolgte, die nicht mit der Infektion zusammenhängen, sollte die Menge an präsentiertem Antigen an der Zelloberfläche konstant bleiben. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung der CD8 T Zellen auf eine direkte Reifung der LSEC in immunogene APC zurückzuführen und somit ein aktiver Vorgang ist und nicht aufgrund erhöhter Antigenmengen auf der Oberfläche erfolgte. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass durch eine MCMV-Infektion auch die Präsentation der endogenen Peptide verändert bzw. verstärkt wurde. Dies müsste durch eine quantitative Bestimmung der Antigenpräsentation auf der Oberfläche der Zellen mittels

Durchflusszytometrie untersucht werden. Zudem könnte man einen funktionellen Test mit T Zellen durchführen, bei dem die IL-2-Produktion direkt mit der Menge an präsentem Antigen korreliert.

Die Aktivierung von DesTCR T Zellen, welche endogene Peptide erkennen, zeigt, dass nach einer Virusinfektion auch eine CD8 T Zell-Antwort durch LSEC generiert werden könnte, welche gegen körpereigene Antigene gerichtet ist, und somit letztendlich zu einer Induktion von Autoimmunität in der Leber führen würde. T Zellen, die eine niedrige Affinität zu einem Selbst-Antigen aufweisen, und somit nicht deletiert werden (Ignoranz), könnten bei einem entsprechend starken ko-stimulatorischen Signal wie bei einer Virusinfektion von LSEC gegen körpereigene Antigene aktiviert werden (Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991). Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass *in vivo* zusätzlich andere Regulationsmechanismen vorhanden sind, die eine Autoimmunreaktion unterdrücken, wie z.B. durch das Vorhandensein von regulatorischen T Zellen in der Leber.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, über welche molekularen Mechanismen eine Reifung von LSEC induziert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass dies auf zell-autonome Prozesse zurückzuführen ist, da nur direkt infizierte LSEC in der Lage waren, T Zellen zu aktivieren. Dies würde die Induktion der Immunität auf den Bereich in der Leber beschränken, in dem tatsächlich eine Infektion stattgefunden hat. Es könnte sein, dass dies einen Regulationsmechanismus dafür darstellt, wie inadäquate Organschäden vermieden werden können.

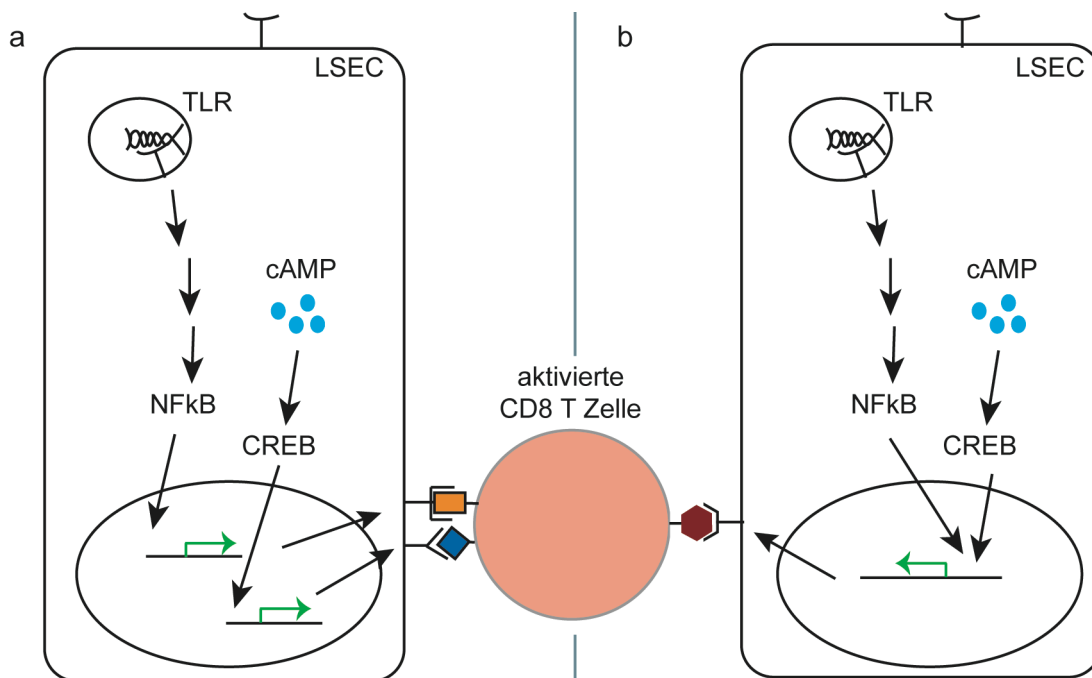
Für DC ist eine Stimulation mit TLR-Liganden ausreichend, um eine effektive Immunantwort zu erzeugen, wobei man sich diesen Effekt bei Adjuvanzen zu Nutze macht (Reis e Sousa, 2004). Adjuvanzen sind Substanzen, welche die Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen induzieren oder verstärken. Pertussis Toxin (PTX) hat ebenso einen stimulierenden Effekt auf DC und kann als Adjuvanz die Immunantwort gegen Peptide verstärken (Bagley et al., 2002; Roberts et al., 1995). PTX hemmt trimere  $G_i$ -Proteine, deren inhibitorische Wirkung somit aufgehoben wird, was in einer Aktivierung des Enzyms Adenylat-Zyklase resultiert. Dieses Enzym katalysiert die Ringbildung von ATP zu cAMP, so dass anschließend erhöhte Mengen von cAMP intrazellulär vorkommen. cAMP fungiert als so genannter „Second Messenger“ und kann sehr unterschiedliche Effekte haben, abhängig vom Zelltyp, Differenzierungsgrad und Aktivierungsstatus der Zelle (Cheng et al., 2008). So sind z.B. erhöhte cAMP-Spiegel in DC für deren Aktivierung verantwortlich (Bagley et al., 2002; Roberts et al., 1995).

Für LSEC scheint eine TLR-Stimulation alleine, wie oben näher erläutert, nicht zu genügen, um in ihnen eine immunogene Reifung zu induzieren. Daher wurde als nächstes die Wirkung von PTX auf LSEC getestet. Interessanterweise zeigte sich hier, dass eine kombinatorische Stimulation mit PTX und dem TLR3-Liganden polyIC eine Reifung in LSEC induzierte, was folglich zu einer Aktivierung der T Zellen in Bezug auf IFN- $\gamma$ -Produktion führte. Hervorzuheben ist hierbei, dass eine Stimulation von LSEC mit PTX alleine keinen Effekt zeigte, sondern nur in Kombination mit dem TLR3-Liganden eine immunogene Reifung induzierte. Dies spricht für eine synergetische Wirkungsweise beider Signalwege in LSEC, was eine weitere Regulationsstufe in diesen Zellen darstellen könnte. Die Signalweiterleitung durch TLR reguliert unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, welcher die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine reguliert (Akira and Takeda, 2004), während zumindest bei DC der Adjuvanz-Effekt von PTX auf einen erhöhten cAMP Spiegel in der Zelle zurückzuführen ist (Bagley et al., 2002). cAMP kann zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB<sup>31</sup> führen, welcher an entsprechende Elemente in der DNA bindet und die Transkription verschiedener Gene induziert. Obwohl bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte, welche Signalwege durch PTX in LSEC induziert werden, lassen die oben beschriebenen Ergebnisse zwei mögliche Interpretationen einer synergetischen Wirkungsweise beider Moleküle zu (Abb. V.1). Eine Möglichkeit wäre, dass durch TLR-Stimulation und somit über NF $\kappa$ B alleine nicht alle Gene für die ko-stimulatorischen Moleküle angeschaltet werden können, die notwendig sind, um eine LSEC-vermittelte T Zell-Aktivierung zu steuern. Folglich bliebe in diesem Fall die Induktion der T Zell-Toleranz aufrechterhalten. Erfolgt jedoch zusätzlich zu einer TLR-Stimulation eine Stimulation über erhöhte cAMP-Mengen in der Zelle, die eine weitere Signalkaskade und somit CREB aktivieren, wird die Expression der fehlenden ko-stimulatorischen Moleküle induziert, was schließlich zu einer T Zell-Aktivierung führt (Abb. V.1a). Eine andere mögliche Interpretation wäre, dass die Transkription der Gene für ko-stimulatorische Moleküle die gleichzeitige Bindung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und CREB benötigt. Dies kann nur erreicht werden, wenn beide Signalwege in Kombination aktiviert werden, wobei dann beide Transkriptionsfaktoren zusammen an entsprechende Stellen auf der DNA binden und die Transkription der Moleküle induzieren (Abb. V.1b). Bei beiden Modellen kommt es aber letztendlich nur dann zu einer Aktivierung von T Zellen, wenn beide Signalkaskaden eingeschaltet werden, was in LSEC ein Mechanismus der Immunregulation darstellen könnte.

---

<sup>31</sup> engl. cAMP-responsive element (CRE)-binding protein

Es konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, ob die gleichen Mechanismen auch für eine Maturierung von LSEC nach einer MCMV-Infektion verantwortlich waren. Dafür müssten entsprechende Inhibitoren der Signalwege in Kombination mit einer viralen Infektion verwendet werden. Sollte es dann zu keiner Reifung von LSEC kommen, wäre dies ein Hinweis auf die Beteiligung dieser Signalwege.



**Abb. V.1 Modell einer synergistischen Wirkungsweise von Signalwegen in LSEC.**

(a) NFκB und CREB induzieren jeweils die Transkription verschiedener Gene, deren Genprodukte zusammen die Aktivierung von T Zellen stimulieren. (b) NFκB und CREB binden zusammen an ein Gen und induzieren somit die Transkription der notwendigen ko-stimulatorischen Moleküle.

Es konnte für myeloide Zellen gezeigt werden, dass TLR3 und TLR9 für die Erkennung und Kontrolle einer MCMV-Infektion notwendig sind (Tabeta et al., 2004). Im Gegensatz dazu und zu den oben beschriebenen Ergebnissen stehen Beobachtungen, dass die funktionelle Maturierung von LSEC auch in TLR3<sup>-/-</sup> bzw. TLR9<sup>-/-</sup> Zellen nach MCMV-Infektion erfolgte, da auch hier eine Aktivierung von CD8 T Zellen zu beobachten war (nicht publizierte Beobachtung von Kai Scholz), was darauf hindeutet, dass TLR nicht essentiell für die Erkennung des Virus in LSEC sind. Dennoch könnte es sein, dass MCMV sowohl TLR3 als auch TLR9 gleichzeitig in LSEC stimuliert, so dass beide TLR redundant zueinander fungieren können. Dies würde erklären, warum in den einzelnen TLR<sup>-/-</sup> Zellen noch eine Maturierung von LSEC zu beobachten war. Die Frage nach der Notwendigkeit von TLR bei der Maturierung in LSEC könnte nur

durch die Verwendung von MyD88/TRIF doppelknockout T Zellen geklärt werden. MyD88 und TRIF sind Adapter, die an der zytoplasmatischen Seite der TLR binden und eine Signalweiterleitung vermitteln. Fehlen beide Adapter, kann keine Signalweiterleitung über TLR erfolgen, so dass deren Beteiligung bei der Reifung von LSEC untersucht werden kann.

### **3. Die LSEC-vermittelte Aktivierung von CD8 T Zellen ist unabhängig von CD80/86**

Die DC-vermittelte Differenzierung von naiven CD8 T Zellen in zytotoxische Effektorzellen ist strikt von dem Vorhandensein dreier Signale abhängig, welche nur durch eine maturierte DC bereitgestellt werden. Erstens muss das entsprechende Peptid auf dem MHC-I-Molekül der APC gebunden sein, so dass eine antigenspezifische Aktivierung der T Zelle erfolgt (Signal 1 über den T Zell-Rezeptor der T Zelle). Zweitens muss die DC ko-stimulatorische Moleküle wie CD80/86 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Signal 2 über CD28 der T Zelle). Um eine maximale zytotoxische Aktivität in CD8 T Zellen zu induzieren, muss des Weiteren ein drittes Signal über lösliche Faktoren wie IL-12 oder Typ I-IFN bereitgestellt werden (Williams and Bevan, 2007). Fehlt Signal 2, z.B. bei der Interaktion einer T Zelle mit einer immaturen DC, die nur geringe Mengen an CD80/86 exprimiert, kann es zwar zu einer initialen Proliferation der T Zelle kommen, jedoch resultiert daraus eine deletionale Toleranz (Hawiger et al., 2001; Kurts et al., 1997). Wird hingegen kein IL-12 oder Typ I-IFN produziert, kann es zwar zu einer Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion der T Zelle kommen, jedoch zeigen diese CD8 T Zellen keine oder nur eine geringe zytotoxische Aktivität (Curtsinger et al., 2003; Curtsinger et al., 1999; Curtsinger et al., 2005). Somit wird gewährleistet, dass nur eine voll ausgereifte DC eine entsprechende Immunantwort induzieren kann. Da LSEC die Kapazität besitzen, nach einer Infektion zu maturieren und T Zellen zu aktivieren, wurde untersucht, ob dies auch über die für DC beschriebenen Signale 1, 2 und 3 gesteuert wird. Dabei konnte belegt werden, dass die Aktivierung der T Zelle zwar antigen-spezifisch erfolgte (d.h. Signal 1 war erforderlich), jedoch spielten die ko-stimulatorischen Moleküle CD80/86 keine essentielle Rolle bei der LSEC-vermittelten T Zell-Aktivierung *in vitro* und *in vivo*. Die Signale, über die eine Aktivierung von CD8 T Zellen durch LSEC erfolgte, konnten in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert werden. Neben der Möglichkeit, dass es sich hier um völlig neue Mechanismen sowohl in LSEC als auch in der T Zelle handelt, könnte es sein, dass die Signale seitens der T Zelle ähnlich sind wie bei einer

Aktivierung durch DC. Auf LSEC könnten dann Moleküle exprimiert werden, die zur gleichen Proteinklasse wie CD80/86 gehören (den B7 Proteinen) und die somit mit CD28 auf der T Zelle interagieren könnten. Um diese Frage abschließend zu klären, müssten entweder transgene CD28<sup>-/-</sup> T Zellen oder blockierende Antikörper gegen CD28 in einer Ko-Kultur verwendet werden. Werden z.B. CD28<sup>-/-</sup> T Zellen nicht mehr durch MCMV-infizierte LSEC aktiviert, würde dies bedeuten, dass die Aktivierung über CD28 auf den T Zellen verläuft. Findet jedoch eine Aktivierung statt, wären andere Moleküle involviert. Obwohl CD80/86 die am häufigsten vorkommenden ko-stimulatorischen Moleküle darstellen, sind noch einige weitere Moleküle beschrieben, welche ko-stimulatorisch auf T Zellen wirken können (Shahinian et al., 1993). Darunter befinden sich CD70 (Hendriks et al., 2000) und 4-1BBL (Halstead et al., 2002), wobei LSEC keins der beiden Moleküle auf ihrer Oberfläche nach MCMV-Infektion exprimierten (nicht gezeigte Daten). Ein weiterer möglicher Kandidat wäre das ko-stimulatorische Molekül ICOS-L, welches an ICOS<sup>32</sup> auf der T Zelle bindet. Ob ICOS-L auf der Oberfläche von LSEC bei der Aktivierung von T Zellen eine Rolle spielt, könnte durch die Verwendung von LSEC aus ICOS-L<sup>-/-</sup> Mäusen oder durch die Verwendung von blockierenden Antikörpern für ICOS in einer Ko-Kultur untersucht werden.

LSEC produzierten zwar kein IL-12 (nicht publizierte Beobachtung von Kai Scholz), jedoch IFN- $\beta$  nach einer viralen Infektion. Es konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, ob IFN- $\beta$  als Signal 3 eine essentielle Rolle bei der T Zell-Aktivierung spielt, dennoch konnte es als einzig notwendiger Faktor einer Aktivierung ausgeschlossen werden, da IFN- $\beta$  in einer Ko-Kultur von LSEC mit T Zellen zu keiner Aktivierung der T Zellen führte. Um die Frage zu beantworten, ob IFN- $\beta$  als Signal 3 eine essentielle Rolle bei der T Zell-Aktivierung durch LSEC spielt, konnten transgene IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup> x OT-1 Mäuse generiert werden. T Zellen dieser Mäuse können in einer Ko-Kultur nicht mehr auf das von LSEC gebildete IFN- $\beta$  reagieren, so dass festgestellt werden kann, ob IFN- $\beta$  für die Differenzierung in zytotoxische Effektorzellen essentiell ist. Entsprechende Experimente hierzu sind bereits in Planung.

LSEC exprimieren große Mengen des ko-inhibitorischen Moleküls B7-H1 an ihrer Oberfläche, wobei das Gleichgewicht durch Signale von CD28 und PD-1 auf der T Zelle festlegt, ob Toleranz oder Immunität entsteht (Diehl et al., 2008). Demzufolge könnte eine LSEC-vermittelte Aktivierung der T Zellen durch eine verminderte B7-H1-Expression erreicht werden. Es konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die Expression von B7-H1 auf LSEC nach einer MCMV-Infektion sogar noch weiter erhöht wurde und dass dennoch eine Aktivierung von CD8 T Zellen erfolgte. Dies legt die

---

<sup>32</sup> *engl.* inducible costimulator



Vermutung nahe, dass ein über B7-H1 dominierendes ko-stimulatorisches Signal durch eine Reifung in LSEC induziert wird, was letztendlich eine Differenzierung in CD8 Effektorzellen bewirkt. Dies wäre ein neuer Mechanismus, wie eine T Zell-Aktivierung generell erreicht werden könnte. Es ist hierzu anzumerken, dass das Wissen über die Induktion von CD8 T Zell-Immunität hauptsächlich aus Studien mit DC und Makrophagen resultiert, welche hämatopoietischen Ursprungs sind und unzweifelhaft eine entscheidende Rolle bei der Induktion systemischer Immunität spielen (Banchereau and Steinman, 1998; Morelli and Thomson, 2007; Pozzi et al., 2005; Reis e Sousa, 2006). LSEC jedoch sind organ-residente APC, welche aus nicht-myeloiden Zellen entstehen (Gao et al., 2001; Limmer et al., 2005). Es erscheint sinnvoll, dass die lokale Induktion von organ-spezifischer Immunität durch LSEC nach anderen Prinzipien erfolgt. Dies würde bedeuten, dass zwar beide Arten der Immunität parallel induziert und sich somit ergänzen könnten, jedoch könnte ein alternativer Mechanismus dann greifen, wenn durch bestimmte Bedingungen eine Induktion von Immunität durch DC verhindert ist. Dies könnte in der Leber der Fall sein, da hier eine Maturierung der DC durch die konstitutive Anwesenheit von PAMP, wie weiter oben näher erläutert, verhindert wird. Es bleibt die Frage offen, ob dies für Organe mit ähnlichem Mikromilieu, wie z.B. die Lunge oder den Darm, ebenso gilt.

Um die Reifung tolerisierender in immunogene LSEC näher zu charakterisieren, wurden Gen-Expressionsanalysen von MCMV-infizierten LSEC durchgeführt und mit denen unstimulierter LSEC verglichen. Doch auch hier zeigten sich bei spezifisch in MCMV-infizierten LSEC regulierten Genen keine mit bekannter ko-stimulatorischer Funktion. Die meisten der differenziell exprimierten Gene waren eher Typ I-IFN-abhängige Gene oder solche, die allgemein zur spezifischen Virusabwehr einer Zelle gehörten. Bei dem Vergleich der MCMV-spezifischen Gene in LSEC mit denjenigen, die in DC allgemein nach einer Infektion reguliert werden (Huang et al., 2001), konnte bestätigt werden, dass beide Zelltypen sehr unterschiedlich auf den Kontakt mit einem Pathogen reagieren. Dies verdeutlicht, dass eine Reifung und somit letztendlich eine T Zell-Aktivierung durch beide Zelltypen nach anderen Mechanismen verläuft.

#### **4. MCMV-infizierte LSEC induzieren CD8 T Zell-Immunität *in vivo***

Abschließend sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob LSEC auch *in vivo* eine Rolle bei der Induktion von CD8 T Zell-Immunität bei einer MCMV-Infektion spielen. Da

MCMV einen breiten Gewebetropismus (Krpmotic et al., 2003; Podlech et al., 1998) besitzt und eine Immunantwort auch über DC und Makrophagen erfolgt, wurde von [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Knochenmarkschimären Gebrauch gemacht. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit einer tödlichen Dosis bestrahlt und anschließend mit Knochenmark von B6.CH-2<sup>bm1</sup> Mäusen rekonstituiert. B6.CH-2<sup>bm1</sup> Mäuse tragen eine Punktmutation in ihrem MHC-I-Molekül und können das von OVA abstammende Peptid SIINFEKL nicht präsentieren. Demzufolge sind in [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Knochenmarkschimären nur strahlungsresistente Zellen in der Lage, OT-1 T Zellen über die Präsentation von SIINFEKL zu aktivieren, da alle knochenmarksabhängigen Zellen dem B6.CH-2<sup>bm1</sup> Knochenmark entstammen. von Oppen et al. konnten zeigen, dass in diesen Chimären die Injektion von OVA zu einer antigen-spezifischen Retention von OT-1 T Zellen in der Leber und als Folge zu der Induktion von T Zell-Toleranz führte (von Oppen et al., 2008). Da wir *in vitro* zeigen konnten, dass LSEC in der Lage sind, nach einer MCMV-Infektion zu maturieren und anschließend T Zellen zu aktivieren, sollte dies auch *in vivo* in [B6.CH-2<sup>bm1</sup>→C57BL/6] Chimären erfolgen können. Hierfür wurden OT-1 T Zellen in die mit MCMV-OVA-infizierten Chimären transferiert und anschließend auf Effektorfunktionen wie IFN- $\gamma$ -Produktion und Zytotoxizität analysiert. Da auch hier OT-1 T Zellen nur durch die Präsentation von SIINFEKL strahlungsresistenter Zellen aktiviert werden können, kann eine Beteiligung von DC oder Makrophagen an der Immunantwort ausgeschlossen werden. Es zeigte sich, dass es in MCMV-OVA-infizierten Chimären zu einer Expansion der OT-1 T Zellen sowohl in der Milz als auch in der Leber kam, welche zu IFN- $\gamma$ -produzierenden zytotoxischen CD8 Effektorzellen differenzierten. Dies belegt eindeutig, dass die Induktion einer Immunantwort auch in Abwesenheit von DC erfolgen kann. Ein Nachteil bei der Verwendung von Chimären ist, dass kein direkter Rückschluss auf die Beteiligung von LSEC gezogen werden kann, sondern nur generell auf strahlungsresistente Zellen. Da wir jedoch *in vitro* zeigen konnten, dass LSEC unmittelbar eine Aktivierung von T Zellen induzieren konnten, liegt die Vermutung nahe, dass LSEC auch *in vivo* daran beteiligt sind. Um die Bedeutung von LSEC bei der Induktion von Immunität näher zu analysieren, wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest mit Adeno-OVA-infizierten Chimären durchgeführt. LSEC werden nicht von Adenoviren infiziert (Hegenbarth et al., 2000) und da eine Aktivierung von T Zellen durch LSEC nach zell-autonomen Mechanismen erfolgt, sollte es in diesem Fall zu keiner Induktion von CD8 T Zell-Immunität kommen. Tatsächlich konnte in Adeno-OVA-infizierten Chimären keine Zytotoxizität nachgewiesen werden, wohingegen eine Adeno-OVA-Infektion in C57BL/6 Mäusen eine starke Immunantwort induzierte. Dies zeigt zum einen, dass eine Kontamination der Chimären mit DC oder

Makrophagen ausgeschlossen ist, zum anderen ist dieses Ergebnis ein weiteres Indiz dafür, dass LSEC an einer Immunantwort gegen MCMV-OVA beteiligt sind.

Eine weitere Zellpopulation in der Leber, welche Antigen aufnehmen und an CD8 T Zellen präsentieren kann, sind Sternzellen (Itozellen) (Winau et al., 2007). Auch diese sind strahlungsresistent, so dass deren Beteiligung an dem oben beschriebenen Effekt möglich wäre. Jedoch wurde in der Arbeit von Winau et al. *in vivo* nur gezeigt, dass Sternzellen Proliferation induzieren können, so dass es letztendlich keine Hinweise dafür gibt, dass dies in einer effektiven Immunantwort resultiert (Winau et al., 2007). Des Weiteren werden Sternzellen von Adenoviren infiziert (Weiskirchen et al., 2000), was wahrscheinlich in der Induktion einer Immunantwort resultieren würde, wenn diese Zellen in der Lage wären, T Zellen antigen-spezifisch zu aktivieren. Jedoch kommt es bei einer Adeno-OVA-Infektion in Chimären zu keiner zytotoxischen Immunantwort, so dass es unwahrscheinlich ist, dass Sternzellen *in vivo* hierbei eine Rolle spielen. Um eine Beteiligung von Sternzellen endgültig auszuschließen, könnte man transgene Mäuse verwenden, welche das MHC-I<sup>Kb</sup>-Molekül unter dem GFAP<sup>33</sup>-Promotor exprimieren. Dieser Promotor wird außer in neuronalen Zellen in Sternzellen exprimiert, so dass in diesen Mäusen Sternzellen als APC in der Lage wären, das von MCMV-OVA abstammende SIINFEKL auf MHC-I<sup>Kb</sup>-Molekülen an OT-1 T Zellen zu präsentieren. In diesen Mäusen sollte es nach einer MCMV-OVA-Infektion zu keiner zytotoxischen Immunantwort kommen.

Dass eine zytotoxische Immunantwort auch in Abwesenheit von DC entstehen kann, steht im Widerspruch zu anderen Studien, die belegen, dass DC essentiell für die Entstehung von Immunität sind (Jung et al., 2002; Kurts et al., 2001; Probst and van den Broek, 2005). Der Gegensatz zu dieser Arbeit könnte darin begründet sein, dass hier andere Pathogene verwendet wurden. Es ist z.B. bekannt, dass LSEC nicht von Plasmodien infiziert werden (Mota et al., 2001; Pradel and Frevet, 2001), so dass zumindest in dem Beispiel von Jung et al. eine Beteiligung von LSEC nicht erfolgen würde. Dies zeigt, dass DC zwar für die Induktion einer Immunantwort gegen bestimmte Pathogene unerlässlich sind, jedoch können in bestimmten Fällen organresidente APC ihre Funktion übernehmen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass eine Immunantwort *in vivo* auch in Abwesenheit von professionellen APC wie DC induziert werden kann. Hierbei erfolgte die Aktivierung von CD8 T Zellen unabhängig von den ko-stimulatorischen Molekülen CD80/86. Es konnte belegt werden, dass LSEC eine Zellpopulation darstellen, die für die Aktivierung von CD8 T Zellen nach einer Infektion verantwortlich sein könnten.

---

<sup>33</sup> *engl.* glial fibrillary acidic protein

Diese Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis von organ-spezifischer Immunität beitragen. Zum einen scheint es sinnvoll, in bestimmten Situationen wie Krebs oder chronischen Infektionen der Leber eine effiziente Immunantwort dagegen zu induzieren, zum anderen sollte z.B. im Falle einer Autoimmunreaktion eine Immunantwort unterbunden werden. Das Verständnis organ-spezifischer Immunität würde in beiden Fällen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung möglicher Therapien spielen.

## VI. Referenzen

- Abe, M., Tokita, D., Raimondi, G., and Thomson, A.W. (2006). Endotoxin modulates the capacity of CpG-activated liver myeloid DC to direct Th1-type responses. *Eur J Immunol* **36**, 2483-2493.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738.
- 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.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R.E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-17269.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A., and Bandeira, A. (2001). CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* **166**, 3008-3018.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* **199**, 1401-1408.
- Bagley, K.C., Abdelwahab, S.F., Tuskan, R.G., Fouts, T.R., and Lewis, G.K. (2002). Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. *J Leukoc Biol* **72**, 962-969.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Barton, G.M., Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49-56.
- Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**, 1524-1525.
- Baumann, H., and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today* **15**, 74-80.
- Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Miller, J.F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002a). The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* **196**, 1099-1104.
- Belz, G.T., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2002b). The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol* **80**, 463-468.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**, 1051-1057.
- Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* **4**, 595-602.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**, 87-98.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-288.
- Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (1997). B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **6**, 303-313.

- 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.
- Butz, E.A., and Bevan, M.J. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* *8*, 167-175.
- Callery, M.P., Kamei, T., and Flye, M.W. (1989). Kupffer cell blockade inhibits induction of tolerance by the portal venous route. *Transplantation* *47*, 1092-1094.
- Calne, R.Y. (2000). Immunological tolerance--the liver effect. *Immunol Rev* *174*, 280-282.
- 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.
- Carreno, B.M., and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* *20*, 29-53.
- Castellino, F., and Germain, R.N. (2006). Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* *24*, 519-540.
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., and Mei, F. (2008). Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* *40*, 651-662.
- Clarke, S.R., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* *78*, 110-117.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* *5*, 1219-1226.
- Crispe, I.N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* *3*, 51-62.
- 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. (2003). 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., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedi, R.M., Jenkins, M.K., and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* *162*, 3256-3262.
- Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., and Mescher, M.F. (2005). Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* *174*, 4465-4469.
- 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.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., and Knolle, P.A. (2008). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology* *47*, 296-305.
- Doherty, P.C. (1998). The numbers game for virus-specific CD8+ T cells. *Science* *280*, 227.

- Filice, G.A. (1988). Antimicrobial properties of Kupffer cells. *Infect Immun* 56, 1430-1435.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., and Golenbock, D.T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043-1055.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Fraser, I.P., Koziel, H., and Ezekowitz, R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10, 363-372.
- 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.
- Gao, Z., McAlister, V.C., and Williams, G.M. (2001). Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 357, 932-933.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21, 311-335.
- Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J., and Fiedel, B. (1982). C-reactive protein and the acute phase response. *Advances in internal medicine* 27, 345-372.
- Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262.
- Good, M.F. (1995). Development of immunity to malaria may not be an entirely active process. *Parasite Immunol* 17, 55-59.
- Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., and Flavell, R.A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10878-10883.
- Gronski, M.A., Boulter, J.M., Moskophidis, D., Nguyen, L.T., Holmberg, K., Elford, A.R., Deenick, E.K., Kim, H.O., Penninger, J.M., Odermatt, B., *et al.* (2004). TCR affinity and negative regulation limit autoimmunity. *Nat Med* 10, 1234-1239.
- Halstead, E.S., Mueller, Y.M., Altman, J.D., and Katsikis, P.D. (2002). In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses. *Nat Immunol* 3, 536-541.
- Hamilton-Williams, E.E., Lang, A., Benke, D., Davey, G.M., Wiesmuller, K.H., and Kurts, C. (2005). Cutting edge: TLR ligands are not sufficient to break cross-tolerance to self-antigens. *J Immunol* 174, 1159-1163.
- Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18, 275-308.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-134.
- Hegenbarth, S., Gerolami, R., Protzer, U., Tran, P.L., Brechot, C., Gerken, G., and Knolle, P.A. (2000). Liver sinusoidal endothelial cells are not permissive for adenovirus type 5. *Hum Gene Ther* 11, 481-486.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745.
- Hendriks, J., Gravestien, L.A., Tesselaar, K., van Lier, R.A., Schumacher, T.N., and Borst, J. (2000). CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* **1**, 433-440.
- Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L., and Sherman, L.A. (2001). Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* **194**, 707-717.
- Hiscott, J., Kwon, H., and Genin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* **107**, 143-151.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., *et al.* (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743-748.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318.
- 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.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061.
- Hornig, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**, 835-841.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., *et al.* (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* **11**, 263-270.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., and Hachohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* **294**, 870-875.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **274**, 14560-14567.
- Ishii, K.J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., *et al.* (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-48.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-995.
- Jacob, A.I., Goldberg, P.K., Bloom, N., Degenshein, G.A., and Kozinn, P.J. (1977). Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* **72**, 1268-1270.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* **196**, 255-260.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211-220.



- Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002a). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* *111*, 837-851.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002b). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* *2*, 251-262.
- Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A.M., and Fisher, P.B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 637-642.
- Katz, S.C., Pillarisetty, V.G., Bleier, J.I., Kingham, T.P., Chaudhry, U.I., Shah, A.B., and DeMatteo, R.P. (2005). Conventional liver CD4 T cells are functionally distinct and suppressed by environmental factors. *Hepatology* *42*, 293-300.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* *7*, 131-137.
- 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.
- Knolle, P.A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* *174*, 21-34.
- Knolle, P.A., Germann, T., Treichel, U., Uhrig, A., Schmitt, E., Hegenbarth, S., Lohse, A.W., and Gerken, G. (1999a). Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* *162*, 1401-1407.
- Knolle, P.A., and Limmer, A. (2001). Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol* *22*, 432-437.
- Knolle, P.A., and Limmer, A. (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly* *133*, 501-506.
- Knolle, P.A., Loser, E., Protzer, U., Duchmann, R., Schmitt, E., zum Buschenfelde, K.H., Rose-John, S., and Gerken, G. (1997). Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clin Exp Immunol* *107*, 555-561.
- Knolle, P.A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1999b). 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., Hegenbarth, S., Loser, E., Schmitt, E., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1998a). IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol* *114*, 427-433.
- Knolle, P.A., Uhrig, A., Protzer, U., Trippler, M., Duchmann, R., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Gerken, G. (1998b). Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* *27*, 93-99.
- 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.
- Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* *202*, 637-650.
- Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* *5*, 1263-1277.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* *21*, 107-119.

- Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., and Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol* *166*, 1439-1442.
- 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.
- Lang, P.A., Contaldo, C., Georgiev, P., El-Badry, A.M., Recher, M., Kurrer, M., Cervantes-Barragan, L., Ludewig, B., Calzascia, T., Bolinger, B., *et al.* (2008). Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin. *Nat Med* *14*, 756-761.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., and Golenbock, D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* *5*, 190-198.
- Le Bon, A., and Tough, D.F. (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* *14*, 432-436.
- Lefrancois, L., Altman, J.D., Williams, K., and Olson, S. (2000). Soluble antigen and CD40 triggering are sufficient to induce primary and memory cytotoxic T cells. *J Immunol* *164*, 725-732.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Lenz, L.L., Butz, E.A., and Bevan, M.J. (2000). Requirements for bone marrow-derived antigen-presenting cells in priming cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *J Exp Med* *192*, 1135-1142.
- 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., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jungerkes, F., Schumak, B., Djandji, D., Scholz, K., Klevenz, A., Hegenbarth, S., *et al.* (2005). Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* *35*, 2970-2981.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hammerling, G.J. (1998a). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol* *28*, 2395-2406.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hammerling, G.J. (1998b). A two-step model for the induction of organ-specific autoimmunity. *Novartis Foundation symposium* *215*, 159-167; discussion 167-171, 186-190.
- 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.
- Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., Schmidt, D., Mahnke, K., Bachmann, M.F., Marconi, P., Deeg, C.A., and Brocker, T. (2008). Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo. *Immunity* *28*, 521-532.
- Lumsden, A.B., Henderson, J.M., and Kutner, M.H. (1988). Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* *8*, 232-236.
- Mackay, C.R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* *5*, 423-427.

- MacPhee, P.J., Schmidt, E.E., and Groom, A.C. (1992). Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 263, G17-23.
- MacPhee, P.J., Schmidt, E.E., and Groom, A.C. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 269, G692-698.
- Malek, T.R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26, 453-479.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., and Seya, T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171, 3154-3162.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell* 2, 253-258.
- Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610-621.
- Moser, M., and Murphy, K.M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1, 199-205.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141-144.
- Moynagh, P.N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 26, 469-476.
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 769-776.
- Nolan, J.P. (1981). Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology* 1, 458-465.
- 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.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-13771.
- Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 3, 383-391.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.
- Pearson, A.M. (1996). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8, 20-28.
- Podlech, J., Holtappels, R., Wirtz, N., Steffens, H.P., and Reddehase, M.J. (1998). Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J Gen Virol* 79 ( Pt 9), 2099-2104.

- Poeck, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S.S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., *et al.* (2008). 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* *14*, 1256-1263.
- Pozzi, L.A., Maciaszek, J.W., and Rock, K.L. (2005). Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J Immunol* *175*, 2071-2081.
- Pradel, G., and Frevert, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* *33*, 1154-1165.
- Probst, H.C., Lagnel, J., Kollias, G., and van den Broek, M. (2003). Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* *18*, 713-720.
- Probst, H.C., and van den Broek, M. (2005). Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells. *J Immunol* *174*, 3920-3924.
- Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., and Noelle, R.J. (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* *22*, 307-328.
- Redmond, W.L., Hernandez, J., and Sherman, L.A. (2003). Deletion of naive CD8 T cells requires persistent antigen and is not programmed by an initial signal from the tolerogenic APC. *J Immunol* *171*, 6349-6354.
- Redmond, W.L., and Sherman, L.A. (2005). Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* *22*, 275-284.
- 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.
- Reis e Sousa, C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* *14*, 495-498.
- Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* *16*, 27-34.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* *6*, 476-483.
- Roberts, M., Bacon, A., Rappuoli, R., Pizza, M., Cropley, I., Douce, G., Dougan, G., Marinaro, M., McGhee, J., and Chatfield, S. (1995). A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect Immun* *63*, 2100-2108.
- 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.
- Sacher, T., Podlech, J., Mohr, C.A., Jordan, S., Ruzsics, Z., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (2008). The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host. *Cell Host Microbe* *3*, 263-272.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* *161*, 72-87.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* *155*, 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* *133*, 775-787.
- 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.
- Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Naslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.T., Flavell, R.A., Liljestrom, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887-892.
- Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.
- Shirota, H., Ishii, K.J., Takakuwa, H., and Klinman, D.M. (2006). Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA. *Immunology* 118, 302-310.
- Shnyra, A., and Lindberg, A.A. (1995). Scavenger receptor pathway for lipopolysaccharide binding to Kupffer and endothelial liver cells in vitro. *Infect Immun* 63, 865-873.
- Shu, S.A., Lian, Z.X., Chuang, Y.H., Yang, G.X., Moritoki, Y., Comstock, S.S., Zhong, R.Q., Ansari, A.A., Liu, Y.J., and Gershwin, M.E. (2007). The role of CD11c(+) hepatic dendritic cells in the induction of innate immune responses. *Clin Exp Immunol* 149, 335-343.
- Smedsrod, B. (2004). Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol* 3 *Suppl* 1, S22.
- 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.
- Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2005). Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 6, 163-170.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772-4780.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.
- Sumpter, T.L., Abe, M., Tokita, D., and Thomson, A.W. (2007). Dendritic cells, the liver, and transplantation. *Hepatology* 46, 2021-2031.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3516-3521.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., *et al.* (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19, 623-655.
- Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B., and Kono, D.H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23, 307-336.
- Thompson, C.B. (1995). New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* 3, 531-539.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.

- 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.
- van Oosten, M., van Amersfoort, E.S., van Berkel, T.J., and Kuiper, J. (2001). Scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide and lipoteichoic acid to liver endothelial and Kupffer cells. *J Endotoxin Res* 7, 381-384.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.
- von Oppen, N., Schurich, A., Hegenbarth, S., Stabenow, D., Tolba, R., Weiskirchen, R., Geerts, A., Kolanus, W., Knolle, P., and Diehl, L. (2008). Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology*.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.
- Weiskirchen, R., Kneifel, J., Weiskirchen, S., van de Leur, E., Kunz, D., and Gressner, A.M. (2000). Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts. *BMC Cell Biol* 1, 4.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171-192.
- 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.
- Winwood, P.J., and Arthur, M.J. (1993). Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis* 13, 50-59.
- 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, P., and Pamer, E.G. (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* 21, 29-70.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 1144-1150.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730-737.
- Zehn, D., and Bevan, M.J. (2006). T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 25, 261-270.

## VII. Abbildungsverzeichnis

### I. Einleitung

Abb. I.1	Die Rolle von DC bei der Induktion von Toleranz und Immunität.....	15
Abb. I.2	Die Zellpopulationen der Leber.....	17

### IV. Ergebnisse

Abb. IV.1	LSEC exprimieren funktionell TLR.....	49
Abb. IV.2	LSEC exprimieren funktionell zytoplasmatische PRR.....	50
Abb. IV.3	TLR-Stimulation führt zu keiner phänotypischen Maturierung in LSEC.....	51
Abb. IV.4	TLR-Stimulation von LSEC hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von CD8 T Zellen.....	52
Abb. IV.5	Die Induktion von CD8 T Zell-Toleranz durch LSEC bleibt nach PRR-Stimulation erhalten.....	54
Abb. IV.6	LSEC werden von MCMV infiziert.....	55
Abb. IV.7	MCMV-infizierte LSEC zeigen keine phänotypische Maturierung...	56
Abb. IV.8	Aktivierung von CD8 T Zellen durch MCMV-infizierte LSEC.....	57
Abb. IV.9	MCMV-infizierte LSEC induzieren CD8 Effektorzellen.....	58
Abb. IV.10	Zell-autonome Maturierung von LSEC nach MCMV-Infektion.....	60
Abb. IV.11	Die Maturierung von LSEC kann durch PTX in Kombination mit polyIC induziert werden.....	61
Abb. IV.12	Aktivierung der T Zellen durch LSEC ist abhängig von Signal 1.....	62
Abb. IV.13	Die Aktivierung von T Zellen durch LSEC ist unabhängig von Signal 2.....	63
Abb. IV.14	IFN- $\beta$ von LSEC induziert nicht als einziger Faktor eine T Zell-Aktivierung.....	65
Abb. IV. 15	LSEC induzieren nach MCMV-Infektion CD8 T Zell-Immunität <i>in vivo</i> .....	67
Abb. IV.16	LSEC induzieren CD8 Effektorzellen unabhängig von CD80/86 <i>in vivo</i> .....	69
<b>V. Diskussion</b>		
Abb. V.1	Modell einer synergetischen Wirkungsweise von Signalwegen in LSEC.....	76

## VIII. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	antigen-präsentierende Zelle ( <i>engl.</i> antigen presenting cell), Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
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
c	zyklisch ( <i>engl.</i> cyclic)
CD	Zelloberflächenmarker ( <i>engl.</i> cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester
CREB	<i>engl.</i> cAMP-responsive element (CRE)-binding protein
D	Dalton
DC	Dendritische Zelle ( <i>engl.</i> : dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> enzyme linked immunosorbent assay
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
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein ( <i>engl.</i> green fluorescent protein)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid



LSEC	<i>engl.</i> liver sinusoidal endothelial cells
M	Molar
m	milli
	Meter
μ	mikro
MACS	Magnetische Zellsortierung ( <i>engl.</i> magnetic activated cell sorter)
MCMV	murines Cytomegalovirus
Min.	Minute
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>engl.</i> major histocompatibility complex)
n	nano
NK	Natürliche Killer-
OVA	Ovalbumin
p	piko
Pam <sub>3</sub> Cys	N-Palmitoyl-(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl <sub>3</sub> -lysine x 3HCl
PAMP	<i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
polyIC	<i>engl.</i> poly-inosinic acid-cytidylic acid
PRR	<i>engl.</i> pattern-recognition receptors
RNA	Ribonukleinsäure
Rag	<i>engl.</i> recombination activating gene
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
SD	Standardabweichung ( <i>engl.</i> standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>engl.</i> standard error of the mean)
SSC	<i>engl.</i> sideward scatter
Std.	Stunde
TCR	T Zell-Rezeptor ( <i>engl.</i> T cell receptor)
TLR	<i>engl.</i> Toll-like receptor
U	Unit(s), Einheit von Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
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

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Percy Knolle herzlich bedanken, der es mir ermöglichte, an diesem interessanten Thema zu arbeiten und der sich immer Zeit nahm, mit mir über bestimmte Probleme und Fragestellungen zu diskutieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Kolanus bedanken, der als zweiter Betreuer diese Arbeit unterstützte, sowie bei Prof. Kurts und bei Prof. Fürst für die weitere Begutachtung.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Schultze und seiner Arbeitsgruppe bedanken, die sich sehr engagiert bei der Auswertung der Microarrays einbrachten und die somit zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Danken möchte ich zudem Kai Scholz und Beatrix Schumak für die Arbeit, die sie zuvor in dieses Projekt investierten.

Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Knolle, die mich in allen Belangen meiner Arbeit unterstützte und die für eine großartige Arbeitsatmosphäre sorgte. Im Besonderen möchte ich mich bei Silke Hegenbarth bedanken, die durch ihren Arbeitseinsatz im Labor jedem hilfreich zur Seite steht. Bei Linda Diehl und Dirk Stabenow möchte ich mich für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen bedanken. Ich habe mich am IMMEI immer sehr wohl gefühlt und dies lag vor allem an den netten Kollegen, aus denen mit der Zeit Freunde wurden. Vielen Dank an Anna Schurich, Katja Gärtner, Li-Rung Huang, Jan Böttcher, Zeinab Abdullah, Frank Schildberg und Rike Schulte sowie an die „Klötzchen“ Stephanie Hucke und Juliane Floßdorf. Dies gilt natürlich auch für die Arbeitsgruppe Limmer auf der „anderen Seite“ im Schreibzimmer, Martina Brock und Timo Schwandt, ohne die die Arbeit nur halb so schön gewesen wäre. Besonders möchte ich mich bei Steffi und Martina bedanken, die sich die Mühe machten, diese Arbeit zu lesen und mit konstruktiver Kritik stetig zum Entstehen beitrugen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Sascha Fersch, auf die ich mich stets verlassen konnte und die mich die gesamte Zeit hindurch unterstützten. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.