

# **Charakterisierung der Veto-Funktion von hepatischen Sternzellen**

## **DISSERTATION**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Frank Alexander Schildberg**

aus

Neuwied

Bonn 2012

---

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

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

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

Tag der Promotion: 12.06.2012

Erscheinungsjahr: 2012

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

---

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung vom 03.06.2011 im Zeitraum von November 2008 bis Februar 2012 von Herrn Prof. Dr. Knolle betreut.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass

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

Bonn, den 27.02.2012

---

*Meinen Großeltern*  
*Erna und Kurt Hebel*

---

**Auszüge dieser Arbeit gingen in folgende Publikationen ein:**

*Schildberg FA*, Wojtalla A, Siegmund SV, Endl E, Diehl L, Abdullah Z, Kurts C, Knolle PA. Murine hepatic stellate cells veto CD8 T cell activation by a CD54-dependent mechanism.

Hepatology, 2011; 54: 262-72 (doi: 10.1002/hep.24352).

*Schildberg FA*, Kurts C, Knolle PA. Prominent regulatory but weak antigen-presenting cell function of hepatic stellate cells.

Hepatology, 2011; 54: 1108 (doi: 10.1002/hep.24565).

---

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	6
I. ZUSAMMENFASSUNG.....	9
II. ABSTRACT.....	10
1. EINLEITUNG.....	11
1.1 Überblick über das Immunsystem.....	11
1.2 Antigenpräsentation und Antigen-präsentierende Zellen.....	11
1.3 Die Aktivierung von T-Zellen.....	13
1.4 T-Zell-Toleranz.....	15
1.4.1 Zentrale Toleranz.....	15
1.4.2 Periphere Toleranz.....	16
1.5 Die lokale Immunregulation in der Leber.....	18
1.5.1 Die Mikroanatomie der Leber.....	18
1.5.2 Zellpopulationen der Leber.....	19
1.5.3 Hepatische Sternzellen.....	21
1.5.4 Induktion von peripherer Toleranz in der Leber.....	23
2. ZIELE DER ARBEIT.....	26
3. MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1 Material.....	27
3.1.1 Geräte.....	27
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	27
3.1.3 Allgemeine Lösungen.....	30
3.1.3.1 Medien.....	30
3.1.3.2 Puffer.....	31
3.1.4 Antikörper.....	34
3.1.5 Weitere Fluorochrome.....	35
3.1.6 Antikörper-beschichtete Partikel.....	35
3.1.7 Enzyme.....	36
3.1.8 Zytokine.....	36

---

3.1.9 Zelllinien.....	36
3.1.10 Mauslinien.....	36
3.1.11 Rekombinante Viren / Plasmide.....	37
3.1.12 Primer.....	37
3.1.13 Computersoftware.....	37
3.2 Methoden.....	38
3.2.1 Isolation primärer muriner Zellen.....	38
3.2.2 Isolation von primären hepatischen Sternzellen.....	38
3.2.3 Isolation von primären Hepatozyten.....	39
3.2.4 Aufreinigung von LSECs.....	39
3.2.5 Etablierung einer Fibroblasten-Zelllinie aus Nierenzellen.....	40
3.2.6 Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz.....	40
3.2.7 Isolation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus Milz und Lymphknoten.....	40
3.2.8 Isolation von CD19 <sup>+</sup> B-Zellen aus der Milz.....	41
3.2.9 Isolation von Zellpopulationen durch magnetische Zellseparation (MACS).....	41
3.2.10 Bestimmung von Zellzahlen.....	41
3.2.11 Kokultur-Experimente.....	42
3.2.12 Propagation und Kryokonservierung von Zelllinien.....	42
3.2.13 Durchflusszytometrie.....	43
3.2.13.1 Färbung von Oberflächenantigenen.....	43
3.2.13.2 Färbung von intrazellulären Proteinen.....	43
3.2.13.3 Zellmarkierung mit CFSE zur Analyse der Proliferation.....	44
3.2.13.4 Bestimmung von absoluten Zellzahlen am Durchflusszytometer.....	44
3.2.13.5 Bestimmung der absoluten Molekülzahl pro Zelle am Durchflusszytometer.....	44
3.2.14 Sandwich-ELISA zur Messung von Zytokin-Konzentrationen.....	44
3.2.15 Westernblot.....	45
3.2.16 Real-Time-PCR.....	45
3.2.17 Induktion einer Leberfibrose durch Gabe von Tetrachlorkohlenstoff.....	46
3.2.18 Statistische Analysen.....	46

---

4. ERGEBNISSE. ....	47
4.1 HSCs verhindern die Proliferation von naiven T-Zellen. ....	47
4.2 HSCs beeinträchtigen die T-Zell-Aktivierung. ....	53
4.3 Spezifität der HSC-Veto-Funktion. ....	55
4.4 Der Veto-Effekt korreliert mit der Aktivierung von HSCs. ....	58
4.5 Die HSC-Veto-Funktion basiert auf physikalischem Kontakt. ....	60
4.6 Die CD54-Expression ist essentiell für die HSC-vermittelte Effektorfunktion. ....	63
4.7 Beständigkeit der HSC-Veto-Funktion. ....	67
5. DISKUSSION. ....	71
5.1 HSCs besitzen eine starke Veto-Funktion und sind nur schwache APCs. ....	71
5.2 Veto-Effekt ist eventuell ein Charakteristikum von mesenchymalen Zellen. ....	74
5.3 Molekularer Mechanismus: CD54 als Basis für HSC-Veto-Effekt. ....	76
5.4 Weitere mögliche sekundäre Mechanismen der Veto-Funktion. ....	78
5.5 Relevanz und Regulation des Veto-Effektes <i>in vivo</i> . ....	80
6. LITERATURVERZEICHNIS. ....	84
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS. ....	94
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS. ....	95



## I. ZUSAMMENFASSUNG

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion der T-Zell-Toleranz. Diese wird insbesondere durch die Funktionen von tolerogenen hepatischen Antigen-präsentierenden Zellen und regulatorischen T-Zellen erzielt. Hepatische Sternzellen (HSCs) sind eine wichtige Zellpopulation der Leber und zeichnen sich durch viele immunologische Funktionen aus, so etwa die immunogene Antigenpräsentation sowie die Induktion einer T-Zell-Apoptose.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun eine neue Rolle von HSCs untersucht. Hierbei handelt es sich um die effiziente Inhibition des „Primings“ von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen: die so genannte „Veto-Funktion“ von HSCs. Murine als auch humane HSCs konnten die Aktivierung von naiven T-Zellen durch dendritische Zellen, artifizielle Antigen-präsentierende Zellen sowie PMA/Ionomycin-Stimulation verhindern. Dieser Effekt basierte hierbei auf einem Zell-Kontakt-abhängigen Mechanismus. Darüber hinaus korrelierte die Veto-Funktion direkt mit dem Aktivierungsstadium der HSCs. Besonders ausgeprägt zeigte sich diese Suppression bei HSCs, welche aus fibrotischen Lebern isoliert wurden.

Insgesamt konnten diese Ergebnisse die Existenz einer funktionalen Barriere in der Leber unterstützen, bei der sinusoidale Zellen, wie etwa HSCs, die lokale Stimulation von T-Zellen inhibieren. Diese Eigenschaft wurde hingegen bei Hepatozyten nicht beobachtet.

Mechanistisch betrachtet, basierte der HSC-Veto-Effekt auf einer Expression hoher Mengen des Adhäsionsmoleküls CD54. So konnte beobachtet werden, dass ab einem definierten Schwellenwert HSC-exprimiertes CD54 die T-Zell-Expression von IL-2 und dem IL-2-Rezeptor unterbindet. Diese Regulation stellt den zentralen Mechanismus für den Veto-Effekt dar, da exogenes IL-2 die HSC-vermittelte Inhibition der T-Zell-Aktivierung aufheben konnte.

Diese Ergebnisse demonstrieren eine neue Eigenschaft von HSCs: Sie sind in der Lage, lokale Immunantworten in der Leber zu beeinflussen, indem sie die lokale Stimulation von naiven T-Zellen verhindern. Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf eine nützliche Rolle in der hepatischen Fibrose hin, da die CD54-Expression von HSCs eine weitere Aktivierung von T-Zellen abmildern könnte. Darüber hinaus konnte IL-2 als das relevante Zytokin identifiziert werden, welches die hepatische Toleranz brechen und somit zu einer lokalen T-Zell-Immunität führen kann.

## II. ABSTRACT

The liver plays a crucial role in the induction of T cell tolerance. This phenomenon is predominantly achieved through tolerogenic hepatic antigen-presenting cells and regulatory T cells. Hepatic stellate cells (HSCs) are an important liver cell population, as they possess various immunological functions such as immunogenic antigen presentation or induction of T cell apoptosis.

For this dissertation, a possible new role for HSCs was investigated; the so-called “Veto effect”. The Veto effect is defined as the inhibition of the priming of naive CD8<sup>+</sup> T cells. Murine HSCs, as well as human HSCs, could be shown to inhibit the activation of naive T cells not only by dendritic cells and artificial antigen-presenting cells, but also by PMA/Ionomycin treatment. The underlying mechanism was demonstrated to occur in a cell contact-dependent manner. Additionally, the Veto function was shown to take place in a direct correlation with the activation status of HSCs. A particularly strong correlation of HSC activation status to Veto effect extent could be identified in HSCs obtained from fibrotic livers.

Taken together, these results support the existence of a functional barrier in the liver, composed of sinusoidal cells such as HSCs, but not hepatocytes, blocking the local stimulation of T cells.

Mechanistically, the HSC Veto effect was demonstrated to depend on a high expression of the adhesion molecule CD54. Once a certain threshold level was passed, CD54 blocked the T cell expression of IL-2 and the IL-2 receptor. This regulation represents the central and crucial mechanism of the Veto effect, as exogenous IL-2 would be capable of overcoming the HSC-mediated inhibition of T cell activation.

These results have established a new characteristic of HSCs: they have the potential to influence local immune responses in the liver by inhibiting the local stimulation of naive T cells.

In summary, these results indicate a beneficial role of HSCs in hepatic fibrosis, as the CD54 expression of HSCs can mitigate further T cell activation. Moreover, IL-2 could be pinpointed as the crucial cytokine which is capable of breaking down hepatic tolerance, thereby resulting in local T cell immunity.

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Überblick über das Immunsystem

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor eindringenden Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten. Zur effizienten Bewältigung dieser Herausforderung besteht das Immunsystem sowohl aus einem angeborenen (innaten) als auch einem erworbenen (adaptiven) Teil.

Hierbei bildet das innate Immunsystem eine erste Verteidigungslinie und eliminiert eingedrungene Erreger besonders schnell. Bei dem adaptiven Immunsystem handelt es sich um den evolutionär jüngeren Teil des Immunsystems. Es wird in das humorale und zelluläre System unterteilt und besitzt eine große Variabilität an Antigen-spezifischen Rezeptoren. Diese werden durch die Rekombination und Modifikation von definierten Gensegmenten generiert (Davis and Bjorkman, 1988). Die humorale Immunantwort wird von B-Zellen gebildet, welche Antikörper sezernieren und somit Pathogene binden können. Hingegen stellen T-Zellen die Effektorzellen der zellulären Immunantwort dar. Beide Zelltypen erkennen ihr spezifisches Fremdanigen und entwickeln nach einer erfolgreich bekämpften Infektion das sogenannte immunologische Gedächtnis. Im Falle einer wiederholten Infektion mit dem gleichen Pathogen kann somit eine schnellere und effizientere Immunantwort ausgelöst werden (Kaech et al., 2002).

### 1.2 Antigenpräsentation und Antigen-präsentierende Zellen

Während B-Zellen mithilfe ihres B-Zell-Rezeptors direkt definierte Antigene erkennen können, muss bei T-Zellen das Antigen in prozessierter Form präsentiert werden. Hierbei erkennen T-Zellen mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR; *engl.*: T cell receptor) Proteinfragmenten, welche in Assoziation mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC; *engl.*: major histocompatibility complex) von Antigen-präsentierenden Zellen (APC; *engl.*: antigen presenting cell) präsentiert werden (Lanzavecchia, 1996).

Die MHC-Moleküle lassen sich in zwei Klassen unterteilen. MHC-I-Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren meistens zytosolische Antigene. Hierfür werden sie im endosomalen Retikulum mit zytoplasmatischen Peptiden beladen und nach Transport auf die Zelloberfläche können die Peptid/MHC-Komplexe dann von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden (Wong and Pamer, 2003). Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche auf diese Weise ihr Antigen präsentiert bekommen haben, können nach diesem Kontakt Zellen mit dem spezifischen Antigen lysieren. Die

konstitutive Expression von MHC-II-Molekülen beschränkt sich hingegen nur auf professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie etwa dendritische Zellen (DCs; *engl.*: dendritic cell), Makrophagen und B-Zellen. MHC-II-Moleküle binden extrazelluläre Antigene, die aufgenommen und in dem endosomatischen Abbauweg proteolytisch zerkleinert wurden. Schlussendlich werden diese präsentierten Peptide von sogenannten  $CD4^+$  T-Helferzellen erkannt. Diese reagieren auf die Interaktion mit der Sekretion von Zytokinen, welche zu einer Expansion und Differenzierung weiterer T-Zellen führen kann. Diese Erkennungsmechanismen von zytosolischen Antigenen auf MHC-I durch  $CD8^+$  T-Zellen und von exogenen Antigenen auf MHC-II durch  $CD4^+$  T-Zellen erlauben die Kontrolle des intrazellulären als auch des extrazellulären Kompartiments (Guermontprez et al., 2002).

Neben diesen beiden Möglichkeiten ist noch eine weitere Form der Antigenpräsentation bekannt, die so genannte Kreuzpräsentation (Bevan, 1976; Rock et al., 1990). Hierbei werden MHC-I-Moleküle, nicht mit endogenen Peptiden, sondern mit exogenen Antigenen beladen. Die Kreuzpräsentation ermöglicht somit, dass Antigene von anderen infizierten Zellen durch APCs aufgenommen werden können und zu einer  $CD8^+$  T-Zell-Antwort führen. Diese Form der Präsentation spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des peripheren Gewebes. Professionelle APCs können auf diese Weise Immunantworten gegen Antigene von Infektionen oder malignen Veränderungen generieren ohne dass sie selber infiziert wurden. Insbesondere DCs, Makrophagen und B-Zellen zeigen diese besondere Form der Antigenpräsentation (Heath and Carbone, 2001; Ke and Kapp, 1996; Kurts et al., 1996).

DCs sind die wichtigsten professionellen APCs. Sie patrouillieren durch die Gewebe und üben hier eine Art Wächterfunktion aus, indem sie körpereigene und körperfremde Antigene aufnehmen (Kurts et al., 1996). Durch den bereits beschriebenen Prozess der Antigenpräsentation werden die internalisierten Antigene schließlich proteolytisch in Peptide prozessiert und führen nach Beladung von MHC-I- und MHC-II-Molekülen zu einer Aktivierung von  $CD8^+$  oder  $CD4^+$  T-Zellen (Lanzavecchia, 1996). In der Abwesenheit von Mikroorganismen bzw. den so genannten „Gefahr-Signalen“ liegen die meisten DCs im peripheren Gewebe in einem unreifen Stadium vor. Unter diesen Bedingungen präsentieren sie Antigene nur sehr ineffizient (Gallucci and Matzinger, 2001; Pulendran et al., 2001) und begünstigen eher eine periphere Immuntoleranz (Dhodapkar et al., 2001; Guermontprez et al., 2002).

Wenn unreife DCs jedoch in Kontakt mit Pathogenen kommen, dann durchlaufen sie ein Differenzierungsprogramm. Zuerst erkennen DCs hierbei mithilfe spezifischer Rezeptoren, so genannte „Pattern-recognition receptors“, konservierte Strukturen von einem Pathogen („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs). Nach diesem initialen Kontakt durchlaufen DCs einen Reifungsprozess und migrieren in sekundäre lymphatische Organe (Banchereau and Steinman, 1998). Ausgereifte DCs zeichnen sich durch eine verringerte Antigenaufnahme aus (Thery et al., 1998), präsentieren dafür aber verstärkt vorher aufgenommene Antigene auf MHC-Molekülen. Darüber hinaus zeigen DCs eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen. Dadurch und durch die Sekretion von IL-12 werden Antigen-spezifische T-Zellen stimuliert, was zu deren Expansion und Aktivierung führt (Janeway and Medzhitov, 2002).

### **1.3 Die Aktivierung von T-Zellen**

T-Zellen können mithilfe des TCR prinzipiell auf jeder maturen APC ihr spezifisches Antigen, das gebunden auf MHC-Molekülen vorliegt, erkennen und demnach aktiviert werden. Allerdings ist das reine Erkennen eines spezifischen Peptids durch den TCR nicht ausreichend für eine T-Zell-Aktivierung. Vielmehr benötigt die Aktivierung von T-Zellen drei Signale: Signal 1 stellt hierbei die Antigen-spezifische Erkennung über den TCR dar. Signal 2 wird durch die kostimulatorischen Moleküle CD80/86 auf der APC bereitgestellt. Diese Moleküle interagieren mit CD28, ihrem kostimulatorischen Rezeptor auf der T-Zelle, und reduzieren so in Kombination mit Signal 1 die benötigte Schwelle für eine Aktivierung (Germain, 2001; Rosette et al., 2001). Aufgrund dieser Stimulation werden Signalkaskaden induziert, deren Ergebnis die Proliferation sowie Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen ist (Shaw and Dustin, 1997; Viola and Lanzavecchia, 1996).

Neben CD80/86 gibt es noch weitere kostimulatorische Moleküle auf APCs wie z.B. ICOS (*engl.*: inducible costimulator) und seinen Liganden ICOS-L. Die Interaktion der kostimulatorischen Moleküle auf APCs und T-Zellen aktiviert völlig unterschiedliche intrazelluläre Signalwege. So vermittelt die Stimulation von CD28 Überlebenssignale an T-Zellen (Boise et al., 1995); zusätzlich induziert sie die Expression des Zytokins IL-2 und der zugehörigen Rezeptoren (Carreno and Collins, 2002). IL-2 wirkt hierbei als Wachstumsfaktor und unterstützt die Proliferation von T-Zellen (Feau et al., 2011).

Es spielt aber auch eine zentrale Rolle in der anschließenden Kontraktionsphase der T-Zellen nach entsprechender Aktivierung.

Neben Signal 1 und 2 benötigt eine naive T-Zelle für ihre komplette Aktivierung und Differenzierung in Effektorzellen jedoch noch ein drittes Signal. Dieses wird über die Zytokine IL-12 oder Typ I Interferon von murenen DCs an die T-Zellen vermittelt (Curtsinger et al., 2005; Valenzuela et al., 2005).

Werden naive T-Zellen hingegen nur durch das Signal 1 stimuliert, dann werden diese anergisch und somit unempänglich für weitere Signale (Schwartz, 1996, 1997). Auch bei dem Vergleich von CD28 und ICOS zeigt sich, dass die Art der Kostimulation maßgeblich darüber entscheidet, welche Effektorfunktionen von aktivierten T-Zellen ausgebildet werden: Eine Stimulation über CD28 induziert eine starke Produktion von IL-2 und begünstigt Immunität. Hingegen fördert das kostimulatorische Molekül ICOS eher die Sekretion von IL-10 und lässt naive T-Zellen in einen regulatorischen Phänotyp differenzieren (van Berkel and Oosterwegel, 2006). Des Weiteren wird auf diese Weise z.B. auch die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die unterschiedlichen Subtypen von T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 bzw. T<sub>H</sub>17) reguliert (Bettelli et al., 2008).

Darüber hinaus können kostimulatorische Signale aber auch die Geschwindigkeit regulieren, mit der die T-Zellen differenzieren. Hierbei entscheidet die Summe der kostimulatorischen Signale, wie lange es dauert bis sich eine T-Zelle teilt bzw. wie stark deren Proliferation ausfällt (Gett and Hodgkin, 1998, 2000).

Bei der Differenzierung von naiven T-Zellen ist aber nicht nur die Kostimulation über membranständige Moleküle oder Zytokine von Relevanz, sondern auch die Signalstärke des TCR. Hierbei bestimmt sowohl die erkannte Konzentration an Antigen als auch die Länge der Interaktion von T-Zellen und APCs die Stärke dieses Signals (Iezzi et al., 1998; Valitutti et al., 1995). Diese Kommunikation kann unterschiedliche Zeitspannen annehmen und von Sekunden bis zu Stunden andauern (Stoll et al., 2002). In dieser Dauer werden alle auf die T-Zelle eintreffenden Signale registriert und integriert. Bei der Auswertung dieser Signale sind die absolute Länge der Interaktion oder die Antigenkonzentrationen also nicht von Relevanz. Vielmehr entscheidet die Summe aus allen Signalen über das Schicksal der T-Zelle, sodass ein Signal auch durch ein anderes kompensiert werden kann.

Die Summe der Signale an die T-Zelle entscheidet aber nicht nur darüber, ob T-Zellen vollständig oder gar nicht aktiviert werden: Hier zeigt sich ein deutlich komplexeres

Bild, sodass T-Zellen aufgrund der jeweiligen Stimulation auch inaktiviert oder zu regulatorischen Zellen differenziert werden können. Insgesamt bedeutet dies, dass die verschiedenen Signale nicht nur addiert werden und zwangsläufig aktivierend wirken, sondern dass sie auch Immunantworten modulieren können. Neben verschiedenen kostimulatorischen Molekülen sind zur Vermittlung solcher immunregulatorischen Prozesse insbesondere die Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 bekannt (Groux et al., 1997; Steinbrink et al., 1997).

## **1.4 T-Zell-Toleranz**

Um ein möglichst großes Spektrum an Antigenespezifitäten sicher zu stellen, wird der TCR durch eine zufällige Rekombination gewisser Gensegmente gebildet. Demzufolge entsteht eine große Vielfalt an Rezeptoren, die spezifisch zwischen unterschiedlichen Antigenen differenzieren können. Jedoch besitzen diese Rezeptoren keine Möglichkeit, zwischen selbst und fremd zu unterscheiden. Deshalb entstehen immer T-Zellen, deren TCR gegen fremde sowie eigene Antigene gerichtet sind. Um jedoch zu verhindern, dass autoreaktive T-Zellen körpereigene Peptide erkennen und gegen diese eine Immunantwort induzieren (Autoimmunreaktion), kommen Mechanismen zum Einsatz, welche selbstreaktive Zellen eliminieren. Hierbei handelt es sich um die so genannte zentrale Toleranzinduktion sowie die periphere Toleranzinduktion.

### **1.4.1 Zentrale Toleranz**

Als erster Schritt in der Toleranzinduktion werden während der T-Zell-Reifung die entstandenen Vorläuferzellen (Thymozyten) im Thymus selektioniert. Zuerst wird in der positiven Selektion überprüft, ob die Thymozyten das körpereigene MHC-Molekül erkennen können. Zellen, deren TCR nicht zu eigenen MHC-Molekülen passt, werden durch Apoptose eliminiert. Anschließend werden diese vorausgesuchten Thymozyten der so genannten Negativselektion unterworfen. Hierbei werden eine große Anzahl an körpereigenen Antigenen von DCs bzw. Thymusepithelzellen auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentiert. Durch den Transkriptionsfaktor AIRE (*engl.*: autoimmune regulator) wird eine Expression von gewebsspezifischen Antigenen jenseits des Thymus ermöglicht (Anderson et al., 2002). Thymozyten, die besonders stark mit diesen Komplexen aus MHC und Selbstantigen interagieren, werden als autoreaktive Zellen mittels Apoptose deletiert. Auf diese Weise können nahezu alle selbstreaktiven T-Zellen

bereits im Thymus während der T-Zell-Reifung beseitigt werden (Starr et al., 2003; Venanzi et al., 2004).

Jedoch werden im Thymus nicht alle autoreaktiven T-Zellen eliminiert (Zehn and Bevan, 2006). Ein Grund hierfür ist, dass trotz der Anwesenheit von AIRE nicht alle Selbstantigene in einer ausreichenden Menge im Thymus exprimiert werden können (Kyewski et al., 2002). Demnach befinden sich unter den Zellen, die den Thymus verlassen, auch autoreaktive T-Zellen. Um Autoimmunreaktionen zu vermeiden, müssen diese Zellen einer sehr genauen Regulation unterworfen sein; diese heißt periphere Toleranz (Arnold, 2002). Neben der Kontrolle von selbstreaktiven T-Zellen, verhindert dieser Mechanismus auch ungewollte Immunität gegen harmlose Nahrungsantigene (Mowat, 2003).

#### **1.4.2 Periphere Toleranz**

Die periphere Toleranz lässt sich in mehrere grundsätzliche Mechanismen unterteilen: Ignoranz, Anergie, Deletion, Regulation von T-Zell-Antworten mittels unreifer bzw. tolerisierender DCs oder Suppression durch regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ).

Ignoranz bezeichnet eine Form der Toleranz, bei der T-Zellen ihr spezifisches Antigen nicht oder nur in zu geringem Umfang detektieren können. Etwa kann das Antigen an einem Ort im Organismus vorliegen zu dem T-Zellen keinen Zutritt haben, wie etwa das Gehirn (Alferink et al., 1998). Ein ähnlicher Effekt würde vorliegen, wenn das Antigen nicht in einer ausreichenden Konzentration vorliegt oder die Affinität des TCR nicht hoch genug ist (Kurts et al., 1998). Da die autoreaktiven T-Zellen jedoch selber nicht beeinträchtigt sind, reichen entsprechende stimulatorische Signale, um diese Form der Toleranz zu brechen (Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991).

T-Zell-Anergie entsteht durch die Präsentation von Antigenen ohne Kostimulation. Da unter diesen Bedingungen keine ausreichenden Signale an die T-Zelle gegeben werden, wird diese inaktiviert (Jenkins and Schwartz, 1987). Als Folge zeigen diese Zellen eine deutlich reduzierte bzw. keine Effektorfunktion. Neben fehlender Kostimulation können auch koinhibitorische Moleküle wie CTLA-4 (*engl.*: cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4) oder PD-1 (*engl.*: programmed death-1) zu einem vergleichbaren Phänotyp führen (Probst et al., 2005). Bei Reduktion oder Wegfall von der Kostimulation können koinhibitorische Moleküle besonders stark ihren Toleranz-induzierenden Effekt zur Geltung bringen (Okazaki and Honjo, 2006). Anergie T-Zellen können selbst auf die



erneute Präsentation des gleichen Antigens in Anwesenheit von kostimulatorischen Molekülen nicht mehr reagieren, was zeigt, dass diese Form der Toleranz permanent ist (Hamilton-Williams et al., 2005).

Ähnlich wie bei der Anergie werden T-Zellen, welche Antigenkontakt aber keine Kostimulation hatten, durch den Prozess der klonalen Deletion eliminiert. Hierbei gehen T-Zellen durch den so genannten AICD (*engl.*: activation induced cell death) aufgrund von Selbsttötung zu Grunde. Insbesondere werden autoreaktive T-Zellen deletiert, die mehrmaligen Kontakt zu ihrem Selbstantigen hatten (Hernandez et al., 2001; Lenardo et al., 1999).

Eine andere Form der peripheren Toleranz ist die Regulation von T-Zell-Antworten durch unreife DCs. Gemeint ist hiermit der Vorgang, dass immature DCs Selbstantigene im Gewebe aufnehmen und im lymphatischen Gewebe an Antigen-spezifische autoreaktive T-Zellen präsentieren (Kurts et al., 1996; Steinman et al., 2003). Da diese DCs jedoch unreif sind und demnach keine ausreichenden kostimulatorischen Signale an die T-Zellen liefern können, werden diese durch Anergie bzw. Deletion eliminiert. Unter bestimmten Bedingungen können auf diese Weise auch regulatorische T-Zellen induziert werden (Jonuleit et al., 2001; Walker and Abbas, 2002).

Eine weitere Facette der peripheren Toleranz ist die Suppression durch regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Durch diese Zellen können sowohl autoreaktive T-Zellen als auch andere Formen von unerwünschten Immunreaktionen inhibiert werden (Groux et al., 1997).  $T_{reg}$  lassen sich in zwei Klassen unterteilen:  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, die sich durch die Expression von FoxP3 auszeichnen, gehören zu den natürlichen  $T_{reg}$  (Maloy and Powrie, 2001). Diese Population entsteht im Thymus. Die zweite große Gruppe von  $T_{reg}$  sind die so genannten induzierten regulatorischen T-Zellen (Jonuleit et al., 2001). Es wird vermutet, dass diese in der Peripherie in Anwesenheit geringer Antigenmengen durch Interaktion mit tolerogenen DCs oder natürlichen  $T_{reg}$  aus  $CD4^+$  T-Zellen gebildet werden (Apostolou and von Boehmer, 2004; Jonuleit et al., 2002).  $T_{reg}$  inhibieren andere T-Zellen bzw. andere Immunzellen entweder über direkten Zell-Kontakt oder über die suppressiven Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  (Schwartz, 2005; Takahashi and Sakaguchi, 2003).

## 1.5 Die lokale Immunregulation in der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers und leistet eine Vielzahl an Aufgaben: Sie spielt eine entscheidende Rolle in der Metabolisierung von Nährstoffen sowie bei der Detoxifikation. Darüber hinaus dient die Leber als Energiespeicher und erfüllt immunologische Aufgaben.

Durch die Leber zirkulieren große Blutvolumina aus dem Gastrointestinaltrakt und somit Nahrungsantigene, Toxine oder andere Fremdartigene. Da in der Leber ebenfalls T-Zellen mit potentiell passenden Rezeptoren gegen diese Antigene vorliegen, ist eine präzise Immunregulation hier von besonderer Bedeutung. Tendentiell herrscht in der Leber eher ein tolerogenes Umfeld (Crispe, 2003; Knolle and Limmer, 2001). Dies wurde ursprünglich entdeckt, weil Lebertransplantate trotz der MHC-Grenzen gut akzeptiert wurden und sogar die Akzeptanz von anderen Organen verbessert werden konnte, wenn deren abfließendes Blut über die Pfortader geleitet wurde (Boeckx et al., 1975; Calne et al., 1969). Diese ersten vielversprechenden Befunde aus der frühen Geschichte der Leberimmunologie deuten bereits die Signifikanz sowie die Komplexität der lokalen Immunregulation an. Heute ist klar, dass zur Realisierung dieser Funktion sowohl die besondere anatomische Architektur als auch die Vielzahl an immunologisch aktiven Zellen von großer Bedeutung sind.

### 1.5.1 Die Mikroanatomie der Leber

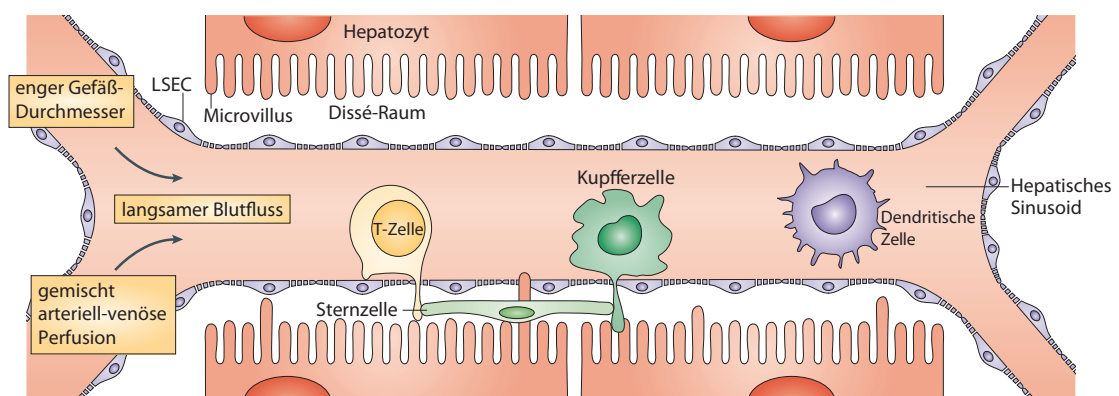
Über die hepatische Pfortader wird die Leber zu 80% mit venösem, nährstoffreichem Blut aus dem Gastrointestinaltrakt und zu 20% mit arteriellem Blut über die hepatische Leberarterie versorgt. Nach einigen Gefäßverästelungen in der Leber vermischt sich das venöse sowie arterielle Blut in den kleinen Blutgefäßen, den so genannten Sinusoiden. Diese haben etwa einen Durchmesser von 5-7  $\mu\text{m}$  und lassen die Leber aufgrund ihrer enormen Auffächerung als ein schwammartiges Organ erscheinen (MacPhee et al., 1995). Bedingt durch diese stark vergrößerte Oberfläche herrscht in den Sinusoiden ein sehr langsamer Blutfluss (25-250  $\mu\text{m/s}$ ). Die niedrige Flussgeschwindigkeit sowie der geringe Durchmesser ermöglichen eine enge Interaktion zwischen den passierenden Lymphozyten und den verschiedenen sinusoidalen Leberzellen, wie auch eine effiziente Aufnahme von Makromolekülen (Knolle and Gerken, 2000; Smedsrod, 2004).

Eine bedeutende Zellpopulation sind hierbei die sinusoidalen Endothelzellen (LSECs; *engl.*: liver sinusoidal endothelial cells), welche die Sinusoide auskleiden (Limmer et

al., 1998). Im Vergleich zu anderen Organen fehlt in der Leber die Basalmembran (Braet and Wisse, 2002), so dass die nächste Struktur im Sinusoid nach den LSECs der Dissé-Raum ist. Hier befinden sich zum einen extrazelluläre Matrix zum anderen aber auch die hepatischen Sternzellen (HSCs; *engl.*: hepatic stellate cells) (Knolle and Limmer, 2001). Direkt hinter dem Dissé-Raum befinden sich die Hepatozyten (**Abb. 1**). Deshalb wird diesem Raum auch die Funktion des Stoffaustausches zugeschrieben. Durch aktiv regulierte Poren (Fenestrae) in den LSECs können somit bestimmte kleine Moleküle per Diffusion aus dem Blut zu den Hepatozyten gelangen (Knolle and Gerken, 2000; Wisse et al., 1985). Makromoleküle hingegen werden von LSECs aufgenommen und durch Transzytose zu den Hepatozyten transportiert (Knolle and Limmer, 2003). Demnach stellt der Dissé-Raum auch eine Art Abfluß-Region dar: Hier wird die hepatische Lymphe gesammelt und über Lymphgefäße den Lymphknoten zugeführt. LSECs und HSCs sind demzufolge eine Art hepatische Barriere zwischen Blutstrom und Hepatozyten und schützen diese vor Pathogenen (Limmer et al., 1998). Interessanterweise lässt diese fein regulierte Barriere jedoch zu, dass T-Zellen Ausläufer durch die Fenestrae der LSECs bilden und demnach mit HSCs sowie Hepatozyten interagieren können.

### 1.5.2 Zellpopulationen der Leber

Zu den hepatischen Zellpopulationen zählen hauptsächlich Hepatozyten, Sternzellen, LSECs, Kupferzellen, dendritische Zellen und intrahepatische Lymphozyten (**Abb. 1**) (Bertolino et al., 2002). Sternzellen bilden einen besonderen Fokus in der vorliegenden Arbeit und werden deshalb in dem nächsten Kapitel detaillierter beschrieben.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines hepatischen Sinusoids; modifiziert nach (Thomson and Knolle, 2010).**

Die größte Zellpopulation in der Leber sind die Hepatozyten. Sie bilden die zelluläre Grundlage für die bedeutende Stoffwechselfunktion der Leber, indem sie viele wichtige metabolische wie auch entgiftende Aufgaben für den Gesamtorganismus übernehmen. Darüber hinaus erfüllen sie auch immunologische Aufgaben; so reagieren sie z.B. bei Entzündungen mit der Produktion von lokal sowie systemisch wirkenden Akute-Phase-Proteinen (Fey et al., 1989).

LSECs bilden den größten Anteil an professionellen APCs in der Leber. Insbesondere zeichnen sich diese Zellen durch ihre effiziente Antigenaufnahme aus dem Blut aus (Knolle and Limmer, 2003; Smedsrod, 2004). Um diese Aufgabe bewältigen zu können, exprimieren sie eine Reihe verschiedener Rezeptoren wie z.B. „Scavenger“-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren oder Fc-Rezeptoren. Zum einen wirken LSECs aufgrund ihrer physiologischen Anordnung in der Leber wie eine funktionelle Barriere zwischen dem Blutstrom und Hepatozyten. Zum anderen zeichnen sie sich aber auch durch ihre konstitutive Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie etwa ICAM-1 (*engl.*: intercellular adhesion molecule-1; CD54), VCAM-1 (*engl.*: vascular cell adhesion molecule-1; CD106) und L-SIGN aus und können deshalb mit passierenden Leukozyten interagieren. Dass es sich bei LSECs um professionelle APCs handelt, zeigt sich auch in ihrer konstitutiven Expression von MHC-I- und MHC-II- und den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD86, CD40 und ICOS-L (Knolle and Limmer, 2003). Neben der Rezeptor-vermittelten Antigenaufnahme können LSECs auch definierte Moleküle über ihre aktiv regulierten Fenestras bzw. selbst große Partikel über Transzytose durch sich hindurch schleusen (Steffan et al., 1986). Aufgenommene Antigene können von LSECs aber auch prozessiert und auf MHC-Molekülen an T-Zellen präsentiert werden (Lohse et al., 1996). Neben den konventionellen Präsentationswegen sind LSECs auch zur Kreuzpräsentation von Antigenen in der Lage (Limmer et al., 2000).

Mit den Kupfferzellen verfügt die Leber im Vergleich zum restlichen Organismus über eine große Population an organresidenten Makrophagen. Sie befinden sich vor allem in den periportalen Arealen und wandern durch die Sinusoide (MacPhee et al., 1992). Insbesondere besitzen sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose von Antigenen aus dem Blutstrom. Auf diese Weise repräsentieren sie eine wichtige Zellpopulation bei der Reinigung des gastrointestinalen Blutes (Filice, 1988). Darüber hinaus können sie aber auch mit T-Zellen interagieren und beeinflussen das immunologische Milieu der Leber (Klein et al., 2007).

Auch die dendritischen Zellen der Leber befinden sich im Periportalfeld (Thomson et al., 1999). Hepatische DCs nehmen kontinuierlich Antigene aus dem venösen Blut auf und präsentieren das prozessierte Antigen im drainierenden hepatischen Lymphknoten. Zu diesem Zweck migrieren DCs im Sinusoid von dem Blutstrom in den Dissé-Raum (Kudo et al., 1997; Matsuno et al., 1996). Von hier aus migrieren sie über lymphatische Gefäße in einen hepatischen Lymphknoten (Crispe, 2003) und tragen auf diese Weise zur Immunregulation bei. Allerdings weisen hepatische DCs im Vergleich zu DCs in anderen Organen eine deutlich schwächere stimulatorische Kapazität auf. Dies liegt insbesondere an dem tolerogenen Milieu der Leber mit seinen antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  (Banchereau et al., 2000).

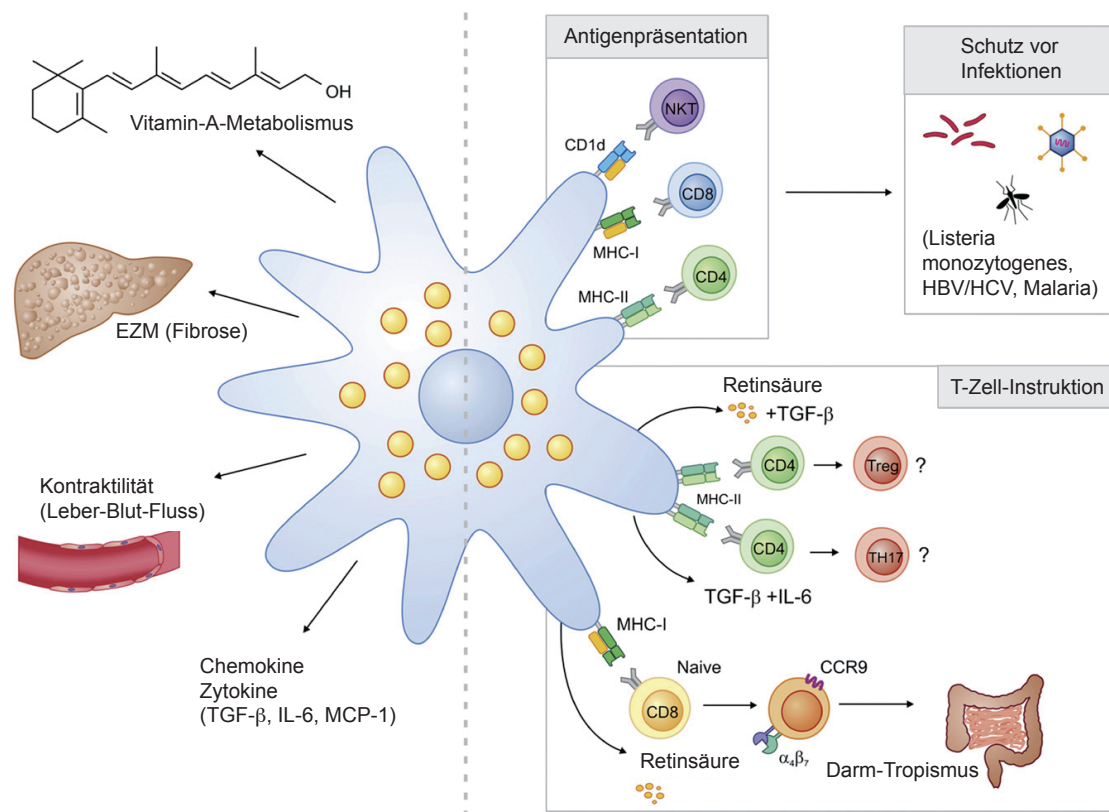
Auch die intrahepatischen Lymphozytenpopulationen zeigen Unterschiede im Vergleich zu lymphatischen Geweben. Einerseits ist in der Leber das Verhältnis zwischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen eindeutig auf die Seite der CD8<sup>+</sup> T-Zellen polarisiert. Andererseits lassen sich auch erheblich größere Mengen von Natürlichen Killerzellen (NK), NKT-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen finden (Crispe and Mehal, 1996; Mehal et al., 2001).

### 1.5.3 Hepatische Sternzellen

Hepatische Sternzellen (HSCs) sind Perizyten und befinden sich im Dissé-Raum zwischen LSECs und Hepatozyten (Blouin et al., 1977). Hier bilden sie mit ihren langen zytoplasmatischen Ausläufern ein sinusoidales zelluläres Netzwerk und kontrollieren so den Blutfluss durch die Kontraktion der sinusoidalen Gefäße (Friedman, 2008a). Unter physiologischen Umständen sind 5-8% aller Zellen der Leber HSCs. Diese so genannten ruhenden HSCs sind die größte Vitamin-A-speichernde Zellpopulation des Körpers und tragen zur Produktion und Degradation von extrazellulärer Matrix bei (**Abb. 2**).

Die Anwesenheit verschiedener Stimuli wie z.B. persistierender Inflammationen führt zur Aktivierung von HSCs und zu ihrer Differenzierung in kontraktile Myofibroblasten. Während dieses Prozesses verlieren HSCs ihre Vitamin-A-Vorräte und verändern ihre Morphologie (Muddu et al., 2007). Aktivierte HSCs fördern die Entstehung von Fibrose durch eine erhöhte Ablagerung extrazellulärer Matrix und eine reduzierte Degradation (Friedman, 2008b). Die Leberfibrose ist ein reversibler Wundheilungsprozess, welcher insbesondere durch die unphysiologisch erhöhte Ablagerung von extrazellulärer Matrix

gekennzeichnet ist. Im weiteren Verlauf kann diese Veränderung zu einer chronischen Lebererkrankung führen (Friedman, 2008b).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionen von hepatischen Sternzellen.** Auf der linken Seite sind die hauptsächlich nicht-immunologischen Eigenschaften von HSCs dargestellt. Auf der rechten Seite werden immunologische Funktionen gezeigt, insbesondere die Antigenpräsentation sowie T-Zell-Instruktion. EZM: Extrazelluläre Matrix; CCR9 und α<sub>4</sub>β<sub>7</sub>-Integrin: Darm-Homing-Rezeptoren; T<sub>reg</sub>: regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zelle; T<sub>H</sub>17: IL-17-produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zelle; modifiziert nach (Winau et al., 2008).

Neben ihren profibrotischen Eigenschaften beeinflussen HSCs durch die Freisetzung von löslichen Mediatoren aber auch aktiv die lokale Immunregulation. So fördern sie etwa die Chemotaxis und Adhäsion von Lymphozyten (Maher, 2001). Darüber hinaus besitzen HSCs auch potente innate Immunfunktionen (Paik et al., 2003). Durch ihre Expression der relevanten Moleküle zur Antigenpräsentation und ihre Eigenschaft zur Endo- bzw. Phagozytose können HSCs auch zur lokalen Induktion einer T-Zell-Immunität durch die Antigen-spezifische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen (Winau et al., 2007). Hierbei konnte auch der Prozess der Kreuzpräsentation beobachtet werden. Insgesamt tragen HSCs somit zum Schutz vor diversen Infektionen bei. Ebenso können HSCs über die Präsentation von Lipidantigenen auf CD1d-Molekülen NKT-Zellen aktivieren (**Abb. 2**).

HSCs beeinflussen aber nicht nur den Aktivierungsstatus von Lymphozyten, sondern auch deren Differenzierung: So konnte gezeigt werden, dass HSCs über die Freisetzung von Retinsäure auf naiven T-Zellen die Expression des Chemokinrezeptors CCR9 und des Integrins  $\alpha_4\beta_7$  induzieren, welche für das „T-Zell-Homing“ in Darm-assoziierte lymphatische Gewebe nötig sind (Iwata et al., 2004; Mora et al., 2003). Zudem können HSCs auch über die Sekretion von Retinsäure und TGF- $\beta$  regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) (Mucida et al., 2007; von Boehmer, 2007) und über freigesetztes TGF- $\beta$  und IL-6  $T_H17$  Zellen generieren (Bettelli et al., 2006) (**Abb. 2**). Ähnliche Ansätze zeigen sich auch in anderen Studien: So konnte etwa gezeigt werden, dass HSCs Alloantigen-spezifische T-Zellen in einer „mixed lymphocyte reaction“ eliminieren (Yu et al., 2004), DCs über IL-10 supprimieren (Lee et al., 2005) und hepatische Inselzell-Allotransplantate vor einer T-Zell-vermittelten Abstoßung schützen können (Chen et al., 2006).

So scheinen HSCs nach dem heutigen Stand der Forschung eine wichtige Rolle in der Leberimmunologie zu spielen und neben ihren immunstimulatorischen Eigenschaften durchaus auch inhibitorische Fähigkeiten zu besitzen.

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

Wie bei den einzelnen hepatischen Zellpopulationen bereits erwähnt wurde, ist die Leber ein überaus wichtiges Organ bei der Entstehung der peripheren Toleranz. Sie begünstigt ein eher immunsuppressives Milieu und inhibiert die Induktion von Immunität, um Immunreaktionen gegen Nahrungsantigene zu vermeiden (Crispe, 2003; Knolle and Limmer, 2001).

Wie hocheffizient und relevant dieser Mechanismus ist, konnte im Kontext von Organtransplantationen beobachtet werden: Interessanterweise spielt die MHC-Grenze bei Lebertransplantaten eine nur untergeordnete Rolle, da Abstoßungen allogener Transplantate im Vergleich zu anderen Organen deutlich seltener auftreten (Calne et al., 1969; Cantor and Dumont, 1967). Jedoch werden auch andere Organe selbst ohne Gabe von Immunsuppressiva besser akzeptiert, wenn deren abfließendes Blut über die Pfortader der Leber geleitet wurde (Boeckx et al., 1975). Ähnlich konnte auch gezeigt werden, dass gegen ein in die Pfortader injiziertes Antigen eine spezifische Toleranz entwickelt wurde (Cantor and Dumont, 1967).

Um Toleranz zu induzieren und solche Phänomene zu ermöglichen, besitzt die Leber mehrere Mechanismen: Eine besondere Bedeutung hat vor allem das immunsuppressive

---

Mikromilieu in der Leber. So lassen sich in der Leber hohe Konzentrationen von den immunsuppressiven Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$  finden. Diese können nicht nur direkt den jeweiligen Phänotyp verschiedener Zellen beeinflussen, sondern unterdrücken auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-12, IFN- $\gamma$  oder IL-6. Daneben führen sie zu erhöhten Werten von Prostaglandin E<sub>2</sub>, einer Herunterregulation von MHC-II-Molekülen und induzieren sowohl autokrin als auch parakrin eine erneute Freisetzung von IL-10 und TGF- $\beta$ .

Hierbei beschränkt sich die Produktion von den immunregulatorischen Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$  nicht nur auf einen spezifischen Zelltyp, sondern vielmehr wirken hier eine Vielzahl an Zellpopulationen mit, so z.B. Kupfferzellen, LSECs, hepatische DCs sowie Hepatozyten (Bissell et al., 1995; Goddard et al., 2004). IL-10 und IL-4 werden auch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezerniert, welche durch hepatische DCs bzw. LSECs in regulatorische T-Zellen differenziert wurden (Knolle et al., 1999; O'Connell et al., 2000). Residente NKT-Zellen produzieren zusätzlich noch IL-13 (Godfrey and Kronenberg, 2004).

Die hier beschriebenen Effekte sind teilweise auf eine so genannte Hyporeaktivität auf proinflammatorische Signale zurückzuführen. Da kontinuierlich bakterielle Bestandteile wie z.B. LPS (Lipopolysaccharid) mit dem Blut von dem Gastrointestinaltrakt in die Leber gelangen, reagiert die Leber mit einer Endotoxin-Toleranz auf diese Stimuli. Demzufolge zeigt die Leber im Allgemeinen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber proinflammatorischen Signalen und führt daher eher zu einem antiinflammatorischen Milieu (Nolan, 1981; Uhrig et al., 2005).

Ein weiterer Mechanismus bei der Induktion peripherer Toleranz in der Leber stellt die selektive Akkumulation von aktivierten T-Zellen und deren anschließende Elimination durch Apoptose dar (Huang et al., 1994; Mehal et al., 1999).

Eine besondere Rolle bei der Induktion peripherer Toleranz in der Leber spielen die LSECs. Sie generieren tolerante CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Kreuzpräsentation von löslichem Antigen. Typisch ist für diese LSEC-induzierten toleranten T-Zellen, dass sie selbst nach Restimulation keine Effektorfunktionen sowie keine Produktion von IL-2 oder IFN- $\gamma$  zeigen (Limmer et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass während dieses Vorgangs das koinhibitorische Molekül B7-H1, welches auf T-Zell-Seite an PD-1 bindet, über Bcl-2 ein Überlebenssignal in T-Zellen induziert (Diehl et al., 2008). Nach



Antigen-spezifischem Kontakt induzieren LSECs hingegen bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp (Knolle et al., 1999). Neben den hier geschilderten Antigen-spezifischen Mechanismen der Toleranzinduktion konnte aber auch gezeigt werden, dass LSECs durch das Inhibieren der APC-Funktion von DCs auf eine MHC-unabhängige Weise die Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verhindern können (Schildberg et al., 2008).

## 2. ZIELE DER ARBEIT

Die Leber ist ein wichtiges Organ bei der Induktion peripherer Toleranz. Neben anderen Mechanismen tragen auch MHC-unabhängige Effekte zur hepatischen Immuntoleranz bei. Etwa können sinusoidale Endothelzellen der Leber die Antigen-präsentierende Funktion von DCs inhibieren und demnach eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität verhindern.

Ähnlich wie LSECs befinden sich auch hepatische Sternzellen (HSCs) im Dissé-Raum. HSCs sind neben ihrer Bedeutung bei der Entstehung der Fibrose für ihre Funktion als hepatische Antigen-präsentierende Zelle bekannt. In der vorliegenden Dissertation sollte nun untersucht werden, ob HSCs neben ihrer immunogenen Funktion auch MHC-unabhängig die Entwicklung einer T-Zell-Immunität kontrollieren können.

Hieraus ergaben sich im Wesentlichen folgende zentrale Fragestellungen:

- Können HSCs die Proliferation und Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verhindern?
- Wie spezifisch ist dieser Effekt?
- Verändert sich diese Funktion in Abhängigkeit zur Aktivierung von HSCs?
- Über welchen Mechanismus wird diese Inhibition vermittelt?
- Wie robust ist die HSC-vermittelte Immunregulation?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Durchflusszytometer	CantoII, LSRII (BD, Heidelberg)
Einfriergerät, Kryo-	Qualifreeze (Nunc, Wiesbaden)
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® 3 cell (Bio-Rad, München)
ELISA-Lesegerät	Spectra MAX 250 (Molecular Devices, MWG BIOTECH, Ebersberg)
Entwicklermaschine	Curix 60 (AGFA, Morsel, Belgien)
Küvette, Quarzglas	10 mm Suprasil (Hellma, Müllheim)
Mikroskope	DM IL (Leica, Wetzlar), CKX41 (Olympus, Hamburg)
Mikrotiterplattenwaschhilfe	Nunc-Immuno™ Wash12; Nunc Brand Products (Nalge Nunc International, via neoLab, Heidelberg)
Perfusionspumpe	Masterflex (Novodirect, Kehl/Rhein)
Semidry Blotter	TE77 (Amersham über GE Healthcare, Freiburg)
Siebe, Metall-	Universität Bonn, Abt. Feinmechanik
Sonifikator, Stab-	UW2070/Sonoplus (Bandelin electronic, Berlin)
Spektralphotometer	Ultrospec 3100pro (Amersham Biosciences, Piscataway, USA); NanoDrop™ ND 1000 (NanoDrop Products, Wilmington, USA)
Taqman®	ABI-Prism® 7900HT (Applied Biosystems, Darmstadt)
Zählkammer	Neubauer (La Fontaine über Labotec, Labor-Technik, Göttingen)

##### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO)	Applichem, Darmstadt
L-Alanin (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Asparagin (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S)	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
CountBright™ absolute counting beads	Invitrogen, Karlsruhe
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $(\text{CH}_3)_2\text{OS}$ )	Merck, Darmstadt
DMEM-Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
ECL plus Western Blotting Detektionssystem	GE Healthcare, Freiburg
EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8$ )	Roth, Karlsruhe
Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )	Applichem, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
D(-)-Fruktose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
GBSS	PAA, Pasching, Österreich
D(+)-Glukose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200 mM) ( $\text{C}_5\text{H}_1\text{ON}_2\text{O}_3$ )	Cambrex, Verviers, Belgien
L-Glutaminsäure ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )	Applichem, Darmstadt
HBSS	PAN Biotech, Passau
Heparin	Ratiopharm, Ulm
HEPES ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ )	Roth, Karlsruhe
IMDM-Medium	Lonza, Verviers, Belgien
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Gerbu, Gaiberg
Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ketamin	Medistar, Ascheberg
Lipopolysaccharid (LPS; E.coli)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lymphozyten-Separationsmedium	Nycomed, Unterschleissheim
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Matrigel™ Matrix	BD, Heidelberg
β-Mercaptoethanol ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	Roth, Karlsruhe

---

---

Milchpulver	Applichem, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Seromed, Berlin
Nycodenz	Axis-Shield, Norwegen
Ovalbumin (OVA)	Serva, Heidelberg
OVA Peptid <sub>257-264</sub> (SIINFEKL) , 80% HPLC rein	Pineda, Berlin
Paraformaldehyd (PFA) ( $\text{H}(-\text{OCH}_2)_n\text{-OH}$ )	Fluca, Buchs
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix	Invitrogen, Karlsruhe
Proteingrößenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
QuantiBRITE™ PE Beads	BD, Heidelberg
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Serin ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$ )	Merck, Darmstadt
SIINFEKL, siehe OVA Peptid <sub>257-264</sub>	Pineda, Berlin
Stickstoff, flüssig	Linde, Wiesbaden
Sukrose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCL}_4$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Threonin ( $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$ )	Merck, Darmstadt
TMB-Substrat	Pierce, Bonn
Trichloressigsäure ( $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ )	Merck, Darmstadt

---

---

Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe
William's Medium E	PAN Biotech, Aidenbach
Xylazin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.3 Allgemeine Lösungen

#### 3.1.3.1 Medien

$\alpha$ ML-12-Medium	DMEM high Glucose (4500 mg/l) 3% (v/v) FCS 10 mM HEPES 10 <sup>5</sup> U Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
Hepatozyten-Medium	William's Medium E 10% (v/v) FCS 2 mM L-Glutamin 0,9 mg/l Insulin 100 nM Dexamethason 10 <sup>5</sup> U Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
HSC- / LX-2- Medium	DMEM high Glucose (4500 mg/l) 10% (v/v) FCS 10 <sup>5</sup> U Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
LSEC-Medium	DMEM high Glucose (4500 mg/l) 10% (v/v) FCS 2 mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
T-Zell- / B3Z- Medium	RPMI 1640 10% (v/v) FCS 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol 2 mM L-Glutamin 10 <sup>5</sup> U Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

---

**3.1.3.2 Puffer**

ACK-Lysepuffer	16,58 g NH <sub>4</sub> Cl 2 g KHCO <sub>3</sub> 74,4 mg Na <sub>2</sub> EDTA 2000 ml H <sub>2</sub> O pH 7,2-7,4
EDTA (0,5 M)	186,1 g EDTA ca. 20 g NaOH 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 7,8-8,0
ELISA: Blockierungspuffer	1% (w/v) BSA in PBS
ELISA: Coating-Puffer	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O (pH 9)
ELISA: Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween-20 in PBS
FACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS 2 mM EDTA 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub>
GBSS (Gey's balanced salt solution) (für Nycodenz-Lösung)	5 mM KCl 1,6 mM CaCl <sub>2</sub> 0,9 mM MgCl <sub>2</sub> 0,3 mM MgSO <sub>4</sub> 0,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,4) 2,7 mM NaHCO <sub>3</sub> 5,5 mM D(+)-Glukose 50 mM HEPES pH 7,4
HSC-Isolation: EGTA-Lösung	100 ml/l Enzypuffer (10x) 190 mg/l EGTA 900 mg/l Glucose

---

HSC-Isolation: Enzympuffer (10x)	80 g/l NaCl 4 g/l KCl 0,882 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g/l HEPES 3,5 g/l NaHCO <sub>3</sub> pH 7,38
HSC-Isolation: Enzympuffer	100 ml/l Enzympuffer (10x) 190 mg/l EGTA 560 mg/l CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O
Kollagenaselösung für Hepatozytenisolation	William's Medium E 0,4 M CaCl <sub>2</sub> 0,05% (w/v) Kollagenase
MACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS 2 mM EDTA pH 7,2
PBS (phosphate buffered saline)	80 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l NaHPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Perfusionspuffer für LSEC-Isolation	0,01 g L-Asparaginsäure 0,02 g L-Threonin 0,03 g L-Serin 0,04 g Glycin 0,05 g L-Alanin 0,13 g L-Glutaminsäure 0,13 g L-Glutamin 3,6 g D-(+)-Glukose 3,6 g D(-)-Fruktose 67,4 g Sukrose 0,22 g KCl 0,1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O

---



---

	0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 2,4 g HEPES 2,0 g $\text{NaHCO}_3$ 1000 ml $\text{H}_2\text{O}$ 0,05% (v/v) Kollagenase
Perfusionspuffer für Milz-DCs	0,04% (w/v) Kollagenase in GBSS
Präperfusionspuffer für Hepatozytenisolation	HBSS 0,5 mM EDTA 10 IE Heparin/ml
Saponin-Puffer	FACS-Puffer 0,5% (w/v) Saponin
Trypanblau-Lösung	10% (v/v) Trypanblau in PBS
Westernblot: Protein-Ladepuffer	0,58 M Sucrose 4% (w/v) SDS 0,04% (v/v) Bromphenolblau 62,5 mM Tris/HCl 60 mg/ml DTT pH 6,8
Westernblot: SDS-Laufpuffer	3 g Tris 14,4 g Glycin 1 g SDS 1000 ml $\text{H}_2\text{O}$
Westernblot: TBS/T (Tris buffered saline/Tween)	2,42 g Tris 8 g NaCl 0,1% (v/v) Tween 20 1000 ml $\text{H}_2\text{O}$ pH 7,6
Westernblot: Towbin-Puffer	SDS-Laufpuffer 20% (v/v) Methanol

---

### 3.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper gegen murine Epitope wurden verwendet. Diese waren konjugiert mit Biotin, einem Fluorochrom (FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC, AlexaFluor 647, AlexaFluor 450, AlexaFluor 405) oder wurden unkonjugiert eingesetzt.

FACS Antikörper:

Antigen	Isotyp	Klon	Hersteller
CD8 $\alpha$	Ratte IgG2a	53-6.7	eBioscience, San Diego
CD11c	Hamster IgG	N418	eBioscience, San Diego
CD16/32	Ratte IgG2b	2.4G2	eigene Herstellung
CD25	Ratte IgG1	PC61.5	eBioscience, San Diego
CD44	Ratte IgG2b	IM7	eBioscience, San Diego
CD54	Ratte IgG2b	YN1/1.7.4	eBioscience, San Diego
CD62L	Ratte IgG2a	MEL-14	eBioscience, San Diego
CD69	Hamster IgG	H1.2F3	eBioscience, San Diego
CD146	Ratte IgG2a	ME9F1	eigene Herstellung
IFN- $\gamma$	Ratte IgG1	XMG1.2	eBioscience, San Diego
IL-2	Ratte IgG2b	JES6-5H4	eBioscience, San Diego
Ki-67	Ratte IgG2a	TEC-3	Dako, Hamburg
V $\alpha$ 2 TCR	Ratte IgG2a	B20.1	eBioscience, San Diego
V $\beta$ 5 TCR	Maus IgG1	MR9-4	BD, Heidelberg
DesTCR	Ratte IgG1	Desiré	eigene Herstellung
Isotyp-Ak	Hamster IgG	G235-2356	BD, Heidelberg
Isotyp-Ak	Hamster IgG	eBio299Arm	eBioscience, San Diego
Isotyp-Ak	Maus IgG1	P3.6.2.8.1	eBioscience, San Diego
Isotyp-Ak	Ratte IgG1	eBRG1	eBioscience, San Diego
Isotyp-Ak	Ratte IgG2a	eBR2a	eBioscience, San Diego
Isotyp-Ak	Ratte IgG2b	A95-1	BD, Heidelberg
Isotyp-Ak	Ratte IgG2b	eB149/10H5	eBioscience, San Diego

ELISA Antikörper:

Antigen	Isotyp	Klon	Konjugation	Hersteller
IFN- $\gamma$	Ratte IgG1	R46A2	unkonjugiert	eBioscience, San Diego
IFN- $\gamma$	Ratte IgG1	XMG1.2	biotinyliert	eBioscience, San Diego
IL-2	Ratte IgG2a	JES6-1A12	unkonjugiert	eBioscience, San Diego
IL-2	Ratte IgG2b	JES6-5H4	biotinyliert	eBioscience, San Diego

funktionale Antikörper:

Antigen	Isotyp	Klon	Hersteller
CD54	Ratte IgG2b	YN1/1.7.4	eBioscience, San Diego
CD106	Ratte IgG2a	429	eBioscience, San Diego
IL-6	Ratte IgG1	MP5-20F3	eBioscience, San Diego
IL-10	Ratte IgG1	JES5-2A5	eBioscience, San Diego
TGF- $\beta$	Kaninchen IgG	polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden

Westernblot-Antikörper:

*Primärantikörper*

Antikörper	Konjugation	Hersteller
$\beta$ -Aktin, Kaninchen	unkonjugiert	Sigma, Steinheim
GFAP, Ziege	unkonjugiert	Abcam, Cambridge
N-Cadherin, Kaninchen	unkonjugiert	Santa Cruz, Heidelberg
$\alpha$ -SMA, Ziege	unkonjugiert	Sigma, Steinheim
Vimentin, Ziege	unkonjugiert	Abcam, Cambridge

*Sekundärantikörper*

Antikörper	Konjugation	Hersteller
Kaninchen anti-Ziege	HRP	Sigma, Steinheim
Ziege anti-Kaninchen	HRP	Sigma, Steinheim

### 3.1.5 Weitere Fluorochrome

Annexin V-APC Kit	BD, Heidelberg
CFSE (CFDA-SE)	Invitrogen, Karlsruhe
Hoechst-33258	Sigma, Steinheim
OVA-Alexa 647	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin-PE	BD, Heidelberg
Streptavidin-APC	BD, Heidelberg
Streptavidin-Alexa Fluor 488	BD, Heidelberg

### 3.1.6 Antikörper-beschichtete Partikel

anti-CD8 $\alpha$ (murin, MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD8 $\alpha$ (human, MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD11c (murin, MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD19 (murin, MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

---

anti-CD146 (murin, MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD3/28 (murin)	Invitrogen, Karlsruhe
anti-CD3/28 (human)	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.7 Enzyme

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
DNase I	Roche, Mannheim
Kollagenase A	Sigma, Steinheim
Kollagenase D	Roche, Mannheim
Peroxidase	Pierce, Bonn
Pronase E	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

### 3.1.8 Zytokine

IL-2 (rekombinant, murin)	Peptotech, Rocky Hill, USA
IFN- $\gamma$ (rekombinant, murin)	Peptotech, Rocky Hill, USA

### 3.1.9 Zelllinien

$\alpha$ ML-12	murine Hepatozyten-Zelllinie
B3Z	murines CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Hybridom, dessen T-Zell-Rezeptor spezifisch das OVA <sub>257-264</sub> Peptid präsentiert auf H2-K <sup>b</sup> erkennt
LX-2	humane hepatische Sternzellen

### 3.1.10 Mauslinien

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

C57BL/6	Inzuchtstamm mit dem MHC-Klasse-I-Haplotyp H-2K <sup>b</sup>
Balb/c	Inzuchtstamm mit dem MHC-Klasse-I-Haplotyp H-2K <sup>d</sup>
B6.CH-2 <sup>bm1</sup>	Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund; eine Punktmutation im

---

	MHC-Klasse-I-Molekül H-2K <sup>b</sup> verhindert die Bindung des OVA Peptids SIINFEKL (Clarke et al., 2000).
OT-1 x Rag <sup>-/-</sup>	Mauslinie mit transgenem CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Rezeptor; CD8 <sup>+</sup> T-Zellen exprimieren V $\alpha$ 2/V $\beta$ 5-T-Zell-Rezeptor, der das OVA <sub>257-264</sub> Peptid SIINFEKL auf H-2K <sup>b</sup> erkennt (Hogquist et al., 1994).
DesTCR	T-Zell-Rezeptor transgene Mäuse; CD8 <sup>+</sup> T-Zellen erkennen drei, auf H-2K <sup>b</sup> präsentierte, endogene Peptide (Schonrich et al., 1991).
CD54 <sup>-/-</sup>	CD54 (ICAM-1) knockout Stamm auf C57BL/6 Hintergrund (Xu et al., 1994).

### 3.1.11 Rekombinante Viren / Plasmide

Adeno-OVA-GFP	von Dr. Dirk Wohlleber (Institute für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie) zur Verfügung gestellt
CMV-CD54-Plasmid	von Dr. Linda Diehl (Institute für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie) zur Verfügung gestellt

### 3.1.12 Primer

muriner „ $\alpha$ -SMA Taqman® Gene Expression Assay“ (#Mm00725412_s1)	Applied Biosystems, Darmstadt
--	----------------------------------

### 3.1.13 Computersoftware

Excel 2011	Auswertung	Microsoft
FACS Diva	FACS-Messung	BD Biosciences
Flowjo V8.7.1	Analyse von FACS-Daten	Tree Star
Illustrator CS5	Graphische Aufbereitung	Adobe
Photoshop CS5	Graphische Aufbereitung	Adobe
Prism 4	Statistik, Graphische Aufbereitung	GraphPad Software
SPF	ELISA-Messung	Molecular Devices
Word 2011	Auswertung	Microsoft

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolation primärer muriner Zellen

Zur Aufreinigung von hepatischen Sternzellen (HSCs) wurden Mäuse im Alter von 6-12 Monaten verwendet, für alle anderen Isolationen 6-12 Wochen alte Tiere.

Zur Aufreinigung von HSCs und Hepatozyten wurden die Tiere mit 100-200 µl einer 3:1 Ketamin/Xylazin-Lösung (5% Ketamin, 20mg/ml Xylazin) narkotisiert. Für alle anderen Organentnahmen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation oder durch Inhalation von CO<sub>2</sub> getötet.

Im Anschluss wurden alle Tiere mit 70% Ethanol oberflächlich gesäubert und dann die Leibeshöhle unter semisterilen Bedingungen geöffnet. Anschließend wurden, wie im Folgenden beschrieben, verschiedene Gewebe entnommen.

### 3.2.2 Isolation von primären hepatischen Sternzellen

Nach Eröffnung des Peritonealraums wurde die Pfortader (Vena porta) freigelegt. Dann wurde eine Venenverweilkanüle in die Pfortader eingeführt, mit einer Klemme fixiert und die untere Hohlvene (Vena cava inferior) durchtrennt. Anschließend wurde die Leber mit einer EGTA-Lösung und dann mit einer Pronase-Lösung (80 ml Enzympuffer + 40 mg Pronase E) für jeweils 2 min mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min perfundiert. Im Anschluss folgte eine 3-4 minütige Perfusion mit einer Kollagenase-Lösung (120 ml Enzympuffer + 60 mg Kollagenase D) bei einer Geschwindigkeit von 5 ml/min. Nach der Perfusion wurde die Gallenblase von der Leber entfernt, die Leber entnommen und in der Rührlösung (100 ml Enzympuffer + 30 mg Pronase E + 30 mg Kollagenase D + 10 µg/ml DNase I) zerkleinert. Die Suspension wurde in einer 200 ml Gewindeflasche bei 400 rpm RT gerührt und nach 5-10 min durch ein Polyamidsieb filtriert. Anschließend wurde die Suspension in drei Waschschrritten jeweils mit HBSS + 10% FCS + DNase I in 50 ml Einmalröhrchen resuspendiert und zentrifugiert (7 min, 500 g, 4°C). Mittels Dichte-Zentrifugation wurden dann die HSCs aufgrund ihrer charakteristischen Dichte von den anderen Zellen der Leber getrennt. Hierfür wurde das Zellgemisch mit HBSS + 10% FCS auf 34 ml aufgefüllt, 13,5 ml 30% (w/v) Nycodenz-Lösung zugegeben und in vier 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspensionen wurden vorsichtig mit 1 ml HBSS + 10% FCS überschichtet und anschließend bei 1400 g bei 4°C für 24 min ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die HSC-enthaltende Interphase aufgenommen, zweimal mit 50 ml gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

Die isolierten HSCs wurden dann mit DMEM + 10% FCS in 24-Well-Zellkulturplatten ( $1 \times 10^5$  Zellen) kultiviert. Die Zellen wurden 24 h nach der Isolation gewaschen und zwischen Tag 1 und Tag 7 verwendet.

### 3.2.3 Isolation von primären Hepatozyten

Bis zur Perfusion wurde hier wie in Abschnitt 3.2.2 vorgegangen und dann mit dem Präperfusionspuffer für 10 min bei einer Geschwindigkeit von 4 ml/min perfundiert. Im Anschluss wurde mit einer 0,05% (w/v) Kollagenaselösung für weitere 10 min perfundiert und die Gallenblase entfernt. Die Leber wurde herauspräpariert und in einer Petrischale mit zwei Pinzetten in HBSS homogenisiert. Die Zellsuspension wurde dann durch ein Metallsieb gespült und zweimal für 2 min bei 50 g zentrifugiert. Schließlich wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen ausplattiert bzw. für weitere Analysen verwendet.

### 3.2.4 Aufreinigung von LSECs

Bis zur Perfusion wurde hier wie in Abschnitt 3.2.2 vorgegangen und die Leber dann mit dem Perfusionspuffer für LSEC-Isolation in einer Geschwindigkeit von 4 ml/min für etwa 10 s perfundiert. Anschließend wurde die Gallenblase entfernt, die Leber herauspräpariert und in GBSS überführt. Die perfundierten Lebern wurden mit Hilfe einer gekrümmten Schere in einer Petrischale ausgestrichen, in ein 50 ml Einmalröhrchen überführt und mit 0,05% (w/v) Kollagenase A in GBSS für 20-30 min bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Die Suspension wurde durch ein Metallsieb gedrückt und in zwei Waschschrritten jeweils mit GBSS resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 350 g, 20°C). Mittels Dichte-Zentrifugation wurden dann Parenchymzellen aus der Zellsuspension abgetrennt. Hierfür wurde das Zellgemisch im Verhältnis 1:1,23 in 30% (w/v) Nycodenz resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dann wurde mit 0,5 ml GBSS überschichtet und bei 1400 g bei 20°C für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Dichte-Zentrifugation wurde die Interphase in MACS-Puffer gewaschen und ME9F1<sup>+</sup> Zellen wurden mittels magnetischer Zellseparation isoliert (s. Abschnitt 3.2.9). Die reine LSEC-Fraktion wurde anschließend zentrifugiert, in LSEC-Medium aufgenommen und seine Zellzahl bestimmt. Die Kultivierung der LSECs erfolgte in Kollagen-beschichteten 24-Well- ( $1 \times 10^6$  Zellen) oder 96-Well-

Zellkulturplatten ( $1,6 \times 10^5$  Zellen). Die Zellen wurden 24 h nach der Isolation mit warmem PBS gewaschen und 48 h nach der Isolation für Experimente eingesetzt.

### **3.2.5 Etablierung einer Fibroblasten-Zelllinie aus Nierenzellen**

Zur Generierung einer Fibroblasten-Zelllinie aus Nierengewebe wurden murine Nieren in kleine Stücke zerschnitten und 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  in GBSS mit 0,05% (w/v) Kollagenase inkubiert. Anschließend wurden die Organfragmente durch ein Metallsieb gedrückt und zweimal mit GBSS resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 350 g,  $20^\circ\text{C}$ ). Es folgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Die verbleibenden Zellen wurden in LSEC-Medium resuspendiert und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in Kollagen-beschichteten 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. 24 h später wurden die adhärennten Zellen gewaschen und ab dann alle 48 h das Medium gewechselt. Nach 7-10 Tagen, sobald massive Zellklone sichtbar waren, wurden die Zellen 1:2 gesplittet und nach einer weiteren Passage in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen transferiert. Während der folgenden 3-5 Passagen wurde das LSEC-Medium mit 10% FCS, 1 mM Pyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren ergänzt.

### **3.2.6 Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz**

In die entnommene Milz wurde mit einer Kanüle GBSS mit 0,04% (w/v) Kollagenase injiziert und das Organ 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Metallsiebes vereinzelt, in 50 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 350 g,  $4^\circ\text{C}$ ).  $\text{CD11c}^+$  Zellen wurden durch magnetische Zellseparation isoliert (s. Abschnitt 3.2.9). Danach wurden die DCs pelletiert (5 min, 350 g,  $20^\circ\text{C}$ ), in T-Zell-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### **3.2.7 Isolation von $\text{CD8}^+$ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten**

Milzen sowie inguinale, axilläre und mesenterische Lymphknoten wurden aus Wildtyp-Mäusen, DesTCR Mäusen oder OT-I x  $\text{RAG}^{-/-}$  Mäusen entnommen. Nach der Entnahme der lymphatischen Organe wurden diese mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, mit PBS gewaschen und über Nylonwolle angereichert. Hierfür wurden die Zellen (von etwa 1-2 Milzen) in T-Zell-Medium aufgenommen und in eine mit 0,6 g Nylonwolle gefüllte 10 ml Spritze gegeben. Diese wurde zuvor zum Blockieren von unspezifischen Bindungen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit T-Zell-Medium



inkubiert. Nach Aufbringen der Zellsuspension wurde die Spritze verschlossen, mit warmem T-Zell-Medium aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die nicht-adhärenenten T-Zellen wurden schließlich mit 20 ml warmem T-Zell-Medium eluiert. Diese Zellsuspension wurde dann zentrifugiert (10 min, 350 g, 20°C), die CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch magnetische Zellseparation isoliert (s. Abschnitt 3.2.9) und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.2.8 Isolation von CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus der Milz

Nach Eröffnung des Peritonealraums wurde die Milz nach Trennung von Fettgewebe und Blutgefäßen in PBS überführt. Mit Hilfe eines Spritzenstempels wurde die Milz durch ein Sieb gedrückt, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min, 350 g, 20°C). Im Anschluss wurden CD19<sup>+</sup> B-Zellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert und deren Zellzahl bestimmt.

### 3.2.9 Isolation von Zellpopulationen durch magnetische Zellseparation (MACS)

10<sup>8</sup> Zellen wurden mit 0,5 ml kaltem MACS-Puffer und nach Herstellerangaben je nach Art der zu isolierenden Zellpopulation mit 25-50 µl Mikrobeads gegen den jeweiligen Selektionsmarker für 15-20 min bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit kaltem MACS-Puffer gewaschen und in 3 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann durch ein Nygonsieb filtriert und über den AutoMACS unter Verwendung des Programms „Possel“ aufgereinigt.

### 3.2.10 Bestimmung von Zellzahlen

Die jeweilige Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit der Trypanblau-Lösung gemischt und hiervon wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen der Zellen in den 4 großen Eckquadraten. Bei der Zählung wurden nur vitale, das heißt nicht blau eingefärbte Zellen berücksichtigt. Die Zellzahl ergibt sich nach der Formel:

Gesamtzahl der Zellen [1/ml] =

gezählte lebende Zellen/4 x 10 [Verdünnungsfaktor] x 10<sup>4</sup> [Kammerfaktor]

### 3.2.11 Kokultur-Experimente

Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gelabelt (s. Abschnitt 3.2.13.3) und mit Milz-DCs oder  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln in An- bzw. Abwesenheit von HSCs bzw. der humanen HSC-Zelllinie LX-2 für 3 Tage in T-Zell-Medium kultiviert. Die Zellen wurden in einem T-Zell/DC/HSC-Verhältnis von 40/1/4, einem T-Zell/Partikel/HSC-Verhältnis von 10/4/1 oder einem T-Zell/Partikel/LX-2-Verhältnis von 10/4/2,5 kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der CFSE-Verdünnung in CD8<sup>+</sup> Hoechst-33258<sup>-</sup> Zellen durchflusszytometrisch analysiert und mit Hilfe der Software FlowJo quantifiziert.

DCs wurden mit TCR-transgenen T-Zellen kultiviert. Je nach Art der T-Zellen wurden die DCs unbehandelt eingesetzt oder mit dem Antigen OVA (1 mg/ml) bzw. dem Peptid SIINFEKL (1  $\mu$ M) für 30 min inkubiert, zweimal in 50 ml PBS gewaschen (10 min, 350 g, 20°C) und dann in der Kokultur eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden HSCs 7 Tage nach Isolation verwendet. In verschiedenen Experimenten wurden anstelle eines Zellrasens aus HSCs,  $\alpha$ ML-12, primäre B-Zellen, primäre Nieren-Fibroblasten oder LSECs verwendet. Zur Immobilisierung der B-Zellen wurden entsprechende Wells mit Poly-L-Lysin in PBS für 3 h beschichtet. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in einigen Experimenten durch die Zelllinie B3Z ersetzt.

In Transwell-Experimenten wurden 24-Well Transwell-Einsätze (0,4  $\mu$ m Porengröße; Greiner) verwendet, um Hepatozyten von HSCs, T-Zellen und  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln bzw. um HSCs von T-Zellen und  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln getrennt zu kultivieren. Zur Fixierung von primären HSCs wurden diese für 10 min mit 0,008% Glutaraldehyd in PBS inkubiert und danach zweimal mit PBS gewaschen.

### 3.2.12 Propagation und Kryokonservierung von Zelllinien

Die Kultivierung der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen. Suspensions- und adhärenzte Zellen wurden je nach Wachstumseigenschaften 1:2 bis 1:20 gesplittet. Adhärenzte Linien wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA abgelöst.

Zur Kryokonservierung eukaryotischer Zellen wurden 10-20x10<sup>6</sup> Zellen/Ansatz zentrifugiert und das Zellpellet in 0,5-1 ml vorgekühltem FCS/10% DMSO vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 1 ml Kryoröhrchen überführt und bei -80°C in einem Einfrierbehälter eingefroren, welcher Isopropanol enthält. Nach

12 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden die eingefrorenen Zellen zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.2.13 Durchflusszytometrie**

#### **3.2.13.1 Färbung von Oberflächenantigenen**

Die Zellen wurden zur Oberflächenfärbung in FACS-Puffer in einer Konzentration von  $0,5\text{-}5 \times 10^6/\text{ml}$  resuspendiert und davon jeweils  $100\ \mu\text{l}$  in ein FACS-Röhrchen oder in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (3 min, 500 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ),  $50\text{-}100\ \mu\text{l}$  der entsprechenden Antikörper-Lösung in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:500 zu den Zellen gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Fc $\gamma$ -Rezeptoren wurden durch Zugabe von  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD16/CD32-Antikörper (2.4G2) blockiert. Wurden biotinylierte Antikörper eingesetzt, so wurden die Proben nach einem Waschschrift mittels FACS-Puffer (3 min, 500 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ) mit Streptavidin-Konjugaten in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:700 für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Um tote Zellen auszuschließen, wurde 1-2 min vor der Analyse am Durchflusszytometer Hoechst-33258 in einer Endkonzentration von  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben. Zur Färbung von Annexin V wurde das „APC Annexin V Kit“ verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren.

Um Zellen nach einer Oberflächenfärbung für eine spätere Analyse zu erhalten bzw. vor einer intrazellulären Färbung, erfolgte eine Fixierung mit 2% (w/v) Paraformaldehyd für 20 min bei RT. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (3 min, 500 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ).

#### **3.2.13.2 Färbung von intrazellulären Proteinen**

Nach der Fixierung wurden die Zellen zur Permeabilisierung, je nach zu färbendem Antigen, in Saponin-Puffer (IFN- $\gamma$ , IL-2) bzw. PBS/0,25% (v/v) Triton X-100 (Ki-67) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Saponin- bzw. FACS-Puffer gewaschen (3 min, 500 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ), die in Saponin-Puffer bzw. PBS verdünnten Antikörper zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mehrmals mit Saponin- bzw. FACS-Puffer gewaschen. Zur Detektion unkonjugierter primärer Antikörper wurden die Zellen in einem weiteren Schritt mit einem Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörper

inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern wurden die Zellen erneut gewaschen und schließlich durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.2.13.3 Zellmarkierung mit CFSE zur Analyse der Proliferation**

Die zu markierenden Zellen wurden in einer Konzentration von  $1-10 \times 10^6$  Zellen/ml in warmem PBS resuspendiert. Die Färbung erfolgte unter Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  CFSE für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Anschließend wurde freier Farbstoff durch Zugabe von FCS gebunden und die Zellen zweimal mit 50 ml kaltem PBS gewaschen (10 min, 350 g,  $20^\circ\text{C}$ ).

### **3.2.13.4 Bestimmung von absoluten Zellzahlen am Durchflusszytometer**

Zur Bestimmung absoluter Zellzahlen in einer Probe wurde vor der Messung am Durchflusszytometer eine definierte Anzahl an Mikropartikeln (CountBright™ absolute counting beads) zu jeder Probe gegeben. Die absoluten Zellzahlen wurden wie folgt berechnet:  $\text{Zellen}_{\text{total}} = (\text{Beads}_{\text{total}} \times \text{Zellen}_{\text{Probe}}) / \text{Beads}_{\text{Probe}}$ .

### **3.2.13.5 Bestimmung der absoluten Molekülzahl pro Zelle am Durchflusszytometer**

Zur Bestimmung der absoluten Molekülzahl pro Zelle wurde auf Zellen das zu untersuchende Antigen mit einem monoklonalen Antikörper gefärbt (s. 3.2.13.1), welcher nachweislich nur ein Epitop bindet und in einem 1:1 Verhältnis mit dem Fluorochrom PE konjugiert ist. Die so gefärbten Zellen werden zusammen mit QuantiBRITE™ PE Beads durchflusszytometrisch analysiert und die anfallenden Daten nach Angaben des Herstellers ausgewertet.

### **3.2.14 Sandwich-ELISA zur Messung von Zytokin-Konzentrationen**

Die 96-Well ELISA-Mikrotiterplatte wurde zunächst 2 h mit einer Verdünnung des Primärantikörpers (1:500) in ELISA-Coating-Puffer bei RT beschichtet. Im Anschluss wurde die Platte dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und für 30 min mit ELISA-Blockierungspuffer blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden die Zellkulturüberstände sowie eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des entsprechenden, rekombinanten Zytokins aufgetragen und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Platte gewaschen und der Sekundärantikörper (1:500 in PBS) für 1 h bei RT auf die Platte gegeben. Nach

erneutem Waschen wurde Avidin-Meerrettich-Peroxidase (HRP) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS zugegeben und die Platte 30 min bei RT inkubiert. Erneut wurde fünfmal gewaschen und dann TMB-Substrat zugefügt. Mittels ELISA-Lesegerät wurde dann im Laufe der nächsten Minuten mehrmals die optische Dichte gemessen.

### 3.2.15 Westernblot

Frische Zelllysate von murinen hepatischen Sternzellen wurden in Protein-Ladepuffer aufgenommen, 10 min bei 95°C erhitzt und für 5 min mittels Ultraschall homogenisiert. Die Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe des Reaktionskits „DC Protein Assay“ nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für die Elektrophorese wurde die Laufkammer mit SDS-Laufpuffer befüllt, das SDS-Polyacrylamidgel mit gleichen Proteinmengen sowie dem Proteingrößenstandard beladen und die Proteine durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt. Mit Hilfe einer Blotkammer wurden dann die getrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (GE Healthcare) überführt. Die PVDF-Membran wurde dafür zuerst mit Methanol befeuchtet und kurz in Towbin-Puffer äquilibriert. Die PVDF-Membran, sowie in Towbin-Puffer eingelegtes Filterpapier, wurden in der Semidry-Blotkammer geschichtet und die Proteine mit Hilfe einer angelegten Spannung von dem Gel auf die Membran übertragen. Nach Blocken von unspezifischen Bindungen mit 10% (w/v) Milchpulver in TBS/T und Waschen mit TBS/T wurde der Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in TBS/T mit 5% (w/v) BSA zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde nun der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper in TBS/T + 10% (w/v) Milchpulver für 1 h auf die Membran gegeben. Die HRP wurde schließlich mit dem „ECL plus Western Blotting Detektionssystem“ nach Angaben des Herstellers entwickelt und die Chemilumineszenz über einen Röntgenfilm detektiert.

### 3.2.16 Real-Time-PCR

RNA wurde mit Hilfe des „RNeasy Kits“ nach Angaben des Herstellers aus primären Zellen isoliert und mittels „SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit“ in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Zur Analyse der relativen  $\alpha$ -SMA Expression wurde der  $\alpha$ -SMA „Taqman® Gene Expression Assay“ (#Mm00725412\_s1) verwendet. Die Real-Time-PCR wurde mit 10 ng cDNA und dem „Platinum SYBRGreen® qPCR Supermix“ für 40 Zyklen (95°C für 15 s und 60°C für 1 min) auf einem ABI-Prism 7900HT

durchgeführt. Die Werte wurden gegen 18s normalisiert und anhand der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode quantifiziert.

### **3.2.17 Induktion einer Leberfibrose durch Gabe von Tetrachlorkohlenstoff**

Zur Isolation von *in vivo* aktivierten hepatischen Sternzellen wurde eine Leberfibrose in 12 Monate alten Mäusen induziert. Hierfür wurde den Mäusen zweimal wöchentlich 0,5  $\mu\text{l}$  Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCL}_4$ ) pro g Körpergewicht für 6 Wochen intraperitoneal appliziert. Das  $\text{CCL}_4$  wurde in sterilem Mineralöl auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Kontrollmäuse wurden nur mit Mineralöl injiziert.

### **3.2.18 Statistische Analysen**

Die Fehlerabweichungen sind als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

---

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 HSCs verhindern die Proliferation von naiven T-Zellen

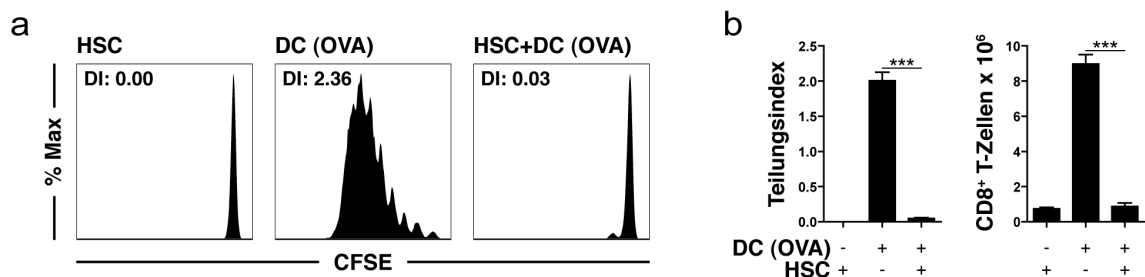
Hepatische Sternzellen (HSCs) können zu der lokalen Induktion von T-Zell-Immunität durch Antigenpräsentation zu CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beitragen (Winau et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob HSCs auch immunregulatorische Eigenschaften besitzen und Antigen-unspezifisch die Entwicklung einer T-Zell-Immunität kontrollieren können.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Rolle von HSCs während der Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch andere Antigen-präsentierende Zellen (APCs) untersucht. Hierfür wurden murine HSCs, H-2K<sup>b</sup> OVA-beladene Milz-DCs und Ovalbumin (OVA)-spezifische H-2K<sup>b</sup>-restringierte OT-1 T-Zellen kokultiviert und das Proliferationsverhalten der T-Zellen analysiert. Um auszuschließen, dass eine Aufnahme von Milz-DC-assoziiertem OVA durch HSCs ebenfalls zu einer T-Zell-Proliferation führte, wurden HSCs aus B6.CH-2<sup>bm1</sup> Mäusen isoliert. Diese Mäuse tragen eine Punktmutation in dem H-2K<sup>b</sup>-Molekül, welches die Bindung von OVA-Peptiden verhindert. Demzufolge konnten T-Zellen in diesem *in vitro* System ihr spezifisches Antigen nur auf Milz-DCs erkennen; folglich konnten T-Zellen nur durch DCs aktiviert werden.

Zuerst wurde nun die Proliferation der kokultivierten T-Zellen betrachtet. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen markiert. Sobald er in gebundener Form an intrazelluläre Proteine vorliegt, ist dieser Farbstoff stabil und wird im Zuge jeder Zellteilung gleichmäßig auf die entstehenden Tochterzellen verteilt. Der zelluläre CFSE-Gehalt kann dann mittels Durchflusszytometer analysiert und das gemessene Proliferationsprofil zur detaillierteren Quantifizierung herangezogen werden.

Wurden nun CFSE-markierte naive CD8<sup>+</sup> OT-1 T-Zellen und OVA-präsentierende Milz-DCs alleine kokultiviert, so resultierte dies nach 3 Tagen in einer starken T-Zell-Proliferation (**Abb. 3a**). Diese Versuchsgruppe diente in allen weiteren Experimenten als Positivkontrolle. Hingegen zeigten H-2<sup>bm1</sup> HSCs aufgrund ihrer dysfunktionalen MHC-I-Molekülexpression keine stimulierende Wirkung auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Wurden jedoch DCs mit OT-1 T-Zellen in der Anwesenheit von HSCs kokultiviert, so war die DC-vermittelte T-Zell-Proliferation stark beeinträchtigt (**Abb. 3a**). Ähnlich wie die semiquantitativen Proliferationsprofile verhielten sich auch die Teilungsindizes (**Abb.**

**3b).** Diese Werte lassen sich aus den Proliferationsprofilen berechnen und geben die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen einer Zelle aus der Ausgangspopulation an. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich auch, wenn man die absolute Zellzahl aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach 3 Tagen Kokultur durchflusszytometrisch analysierte (**Abb. 3b**). So konnte in Ansätzen aus HSCs und T-Zellen keine Expansion, hingegen bei einer Kokultur aus DCs und T-Zellen eine stark erhöhte Zellzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Passend zu den vorherigen Befunden zeigte sich auch hier, dass die Anwesenheit von HSCs zu einer signifikant verminderten Expansion von T-Zellen führte.

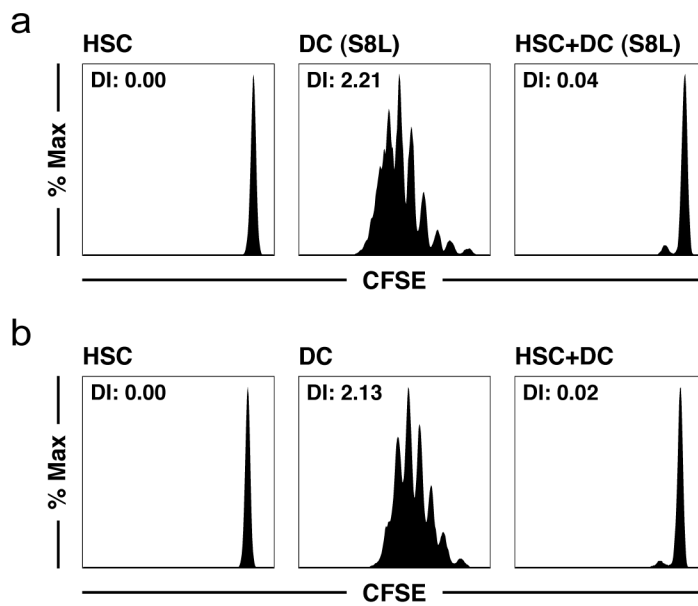


**Abbildung 3: HSCs verhindern die Proliferation von naiven T-Zellen stimuliert durch Antigen-präsentierende DCs.** (a) CFSE-markierte naive H-2K<sup>b</sup>-restringierte OT-1 T-Zellen wurden mit OVA-beladenen (1 mg/ml) H-2K<sup>b</sup> Milz-DCs in der An- oder Abwesenheit von H-2<sup>bm1</sup> HSCs kokultiviert. Hierbei konnten H-2<sup>bm1</sup> HSCs, aufgrund einer Punktmutation im H-2K<sup>b</sup> Molekül, kein OVA an OT-1 T-Zellen präsentieren. Die T-Zell-Proliferation wurde nach drei Tagen mittels durchflusszytometrischer Analyse der CFSE-Verdünnung in CD8<sup>+</sup> Zellen gemessen. DI bezeichnet den Teilungsindex (division index), der für das jeweilige Experiment mittels FlowJo Software berechnet wurde. (b) Teilungsindizes sowie absolute Zellzahl von T-Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten wurden nach drei Tagen Koinkubation mit Milz-DCs ± HSCs bestimmt. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten gezeigt, mit \*\*\*p≤0,001.

Der hier beschriebene HSC-vermittelte inhibitorische Effekt beruht jedoch auf einem *in vitro* System, bei dem prozessiertes Antigen von DCs an CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert wird. Somit wäre es auch denkbar, dass die Anwesenheit von HSCs zu einer reduzierten Antigenprozessierung in DCs führt und damit die T-Zell-Aktivierung indirekt beeinträchtigt. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden die MHC-I-Moleküle von DCs exogen mit dem OVA-Peptid SIINFEKL beladen. Auf diese Weise wurden die OVA-Aufnahme, dessen Prozessierung sowie Kreuzpräsentation umgangen. CD8<sup>+</sup> OT-1 T-Zellen, die mit SIINFEKL-beladenen DCs kokultiviert wurden, verhielten sich jedoch wie bei DCs nach OVA-Stimulation: In reiner Anwesenheit von HSCs proliferierten die T-Zellen nicht, eine starke Expansion zeigte sich hingegen in der



Kokultur mit DCs (**Abb. 4a**). Die Koinkubation von HSCs, SIINFEKL-beladenen DCs und T-Zellen führte jedoch auch hier zu dem Ausbleiben einer T-Zell-Proliferation.

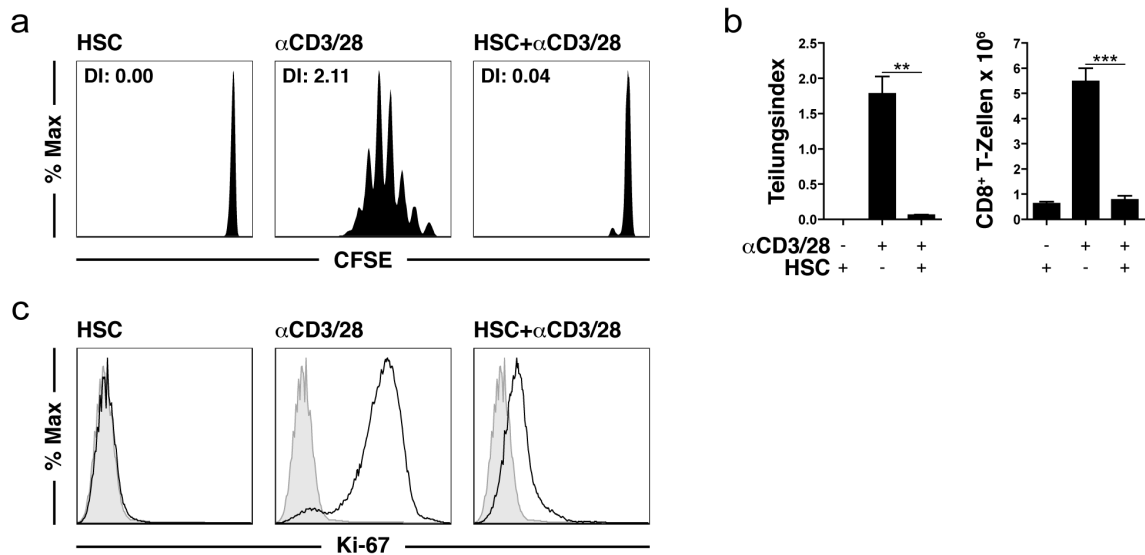


**Abbildung 4: Die HSC-Veto-Funktion beeinträchtigt nicht die APC-Funktion von DCs.** (a) H-2K<sup>b+</sup> Milz-DCs wurden mit SIINFEKL (S8L; 1 µM) beladen und drei Tage mit naiven CFSE-markierten OT-1 T-Zellen ± H-2<sup>bm1</sup> HSCs kultiviert. Anschließend wurde die T-Zell-Proliferation anhand der CFSE-Fluoreszenz in CD8<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (b) CFSE-Verdünnung von naiven CD8<sup>+</sup> H-2K<sup>b</sup>-restringierten DesTCR T-Zellen, welche endogen exprimierte Peptide auf H-2K<sup>b</sup> erkennen, nach 3 Tagen Inkubation mit H-2K<sup>b</sup> Milz-DCs ± H-2<sup>d</sup> HSCs. Histogramme zeigen ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Experiment sollte der beschriebene inhibitorische Effekt auch für endogene Peptide belegt werden. Hierfür wurden transgene CD8<sup>+</sup> Des-TCR T-Zellen verwendet, die endogene Antigene erkennen, welche auf H-2K<sup>b</sup> präsentiert werden. Diese transgenen T-Zellen wurden zusammen mit H-2<sup>b</sup> DCs in An- oder Abwesenheit von H-2<sup>d</sup> HSCs koinkubiert. Demnach wurden diese T-Zellen nur durch die endogenen Peptide aktiviert, die auf DCs präsentiert wurden. Auch in diesem Experiment resultierte die Anwesenheit von HSCs in einer deutlichen Suppression der T-Zell-Proliferation (**Abb. 4b**). Hiermit konnte gezeigt werden, dass HSCs die durch Antigen-präsentierende DCs hervorgerufene Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl für exogene als auch endogene Antigene supprimieren. Allerdings war daraus nicht ersichtlich, ob hierfür HSCs mit DCs interagieren, um deren APC-Funktion zu beeinträchtigen, oder ob HSCs direkt auf T-Zellen wirken und somit deren Aktivierung verhindern.

Um dies zu klären, wurden die T-Zellen durch artifizielle APCs stimuliert, welche aus αCD3/28-beschichteten Partikeln bestanden und somit zu einer direkten T-Zell-

Aktivierung führen. Auch hier diente die Kokultur aus HSCs und T-Zellen als Negativkontrolle. Jedoch führten die  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikel zu einer starken Proliferation und Expansion von naiven T-Zellen, welche in Anwesenheit von HSCs nahezu komplett aufgehoben wurde (**Abb. 5a+b**). Dieser Befund wies eindeutig auf einen direkten Effekt von HSCs auf T-Zellen hin.

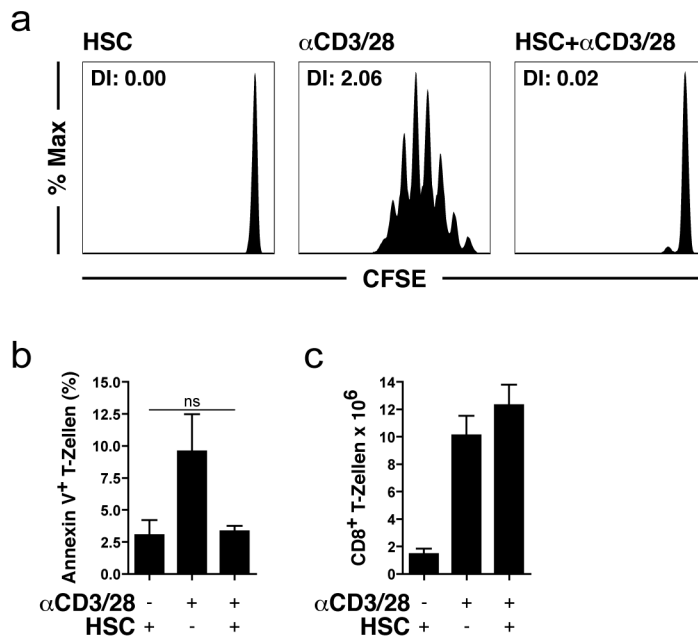


**Abbildung 5: HSCs verhindern die Proliferation von naiven T-Zellen stimuliert durch  $\alpha$ CD3/28-beschichtete Partikel.** (a) CFSE-markierte naive H-2<sup>b</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von H-2<sup>b</sup> HSCs mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln kultiviert. Nach drei Tagen wurde die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Proliferation anhand des Profils der CFSE-Verdünnung durchflusszytometrisch ermittelt und (b) der Teilungsindex sowie die absolute CD8<sup>+</sup> Zellzahl bestimmt. Für Zellen in (a) wurden die intrazellulären Mengen von Ki-67 bestimmt (durchgezogene Linie). Unstimulierte naive T-Zellen sind als grau gefüllte Histogramme dargestellt. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, mit \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Phänotypisch fiel der beschriebene HSC-vermittelte inhibitorische Effekt durch eine nahezu vollständige Suppression der T-Zell-Proliferation auf. Deshalb sollte untersucht werden, ob T-Zellen durch die Anwesenheit von HSCs gar nicht erst in den Zellzyklus eintreten. Hierfür wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den jeweiligen Kokulturen mit dem intrazellulären Marker Ki-67 gefärbt, welcher spezifisch von Zellen im Zellzyklus stark hochreguliert wird (Endl and Gerdes, 2000). Tatsächlich zeigte sich, dass die Anwesenheit von HSCs im Vergleich zu einer T-Zell-Aktivierung ohne HSCs eindeutig zu einer signifikanten Reduktion der Ki-67-Expression in T-Zellen führte (**Abb. 5c**). So scheint bei T-Zellen die Anwesenheit von HSCs den Eintritt in den Zellzyklus zu verhindern.

Um ausschließen zu können, dass dieser immunregulatorische Effekt auf spezifische genetische Faktoren der unterschiedlichen Mauslinien zurückzuführen war, wurde der

beschriebene Versuchsaufbau auch mit Zellen von H-2<sup>d</sup> Mäusen durchgeführt. Jedoch konnten auch in diesem System HSCs die  $\alpha$ CD3/28-induzierte T-Zell-Proliferation effizient unterdrücken (**Abb. 6a**). Dies spricht dafür, dass es sich hierbei um einen generellen Mechanismus handelt und nicht um einen spezifischen Effekt, der auf einem genetischen Hintergrund basiert.



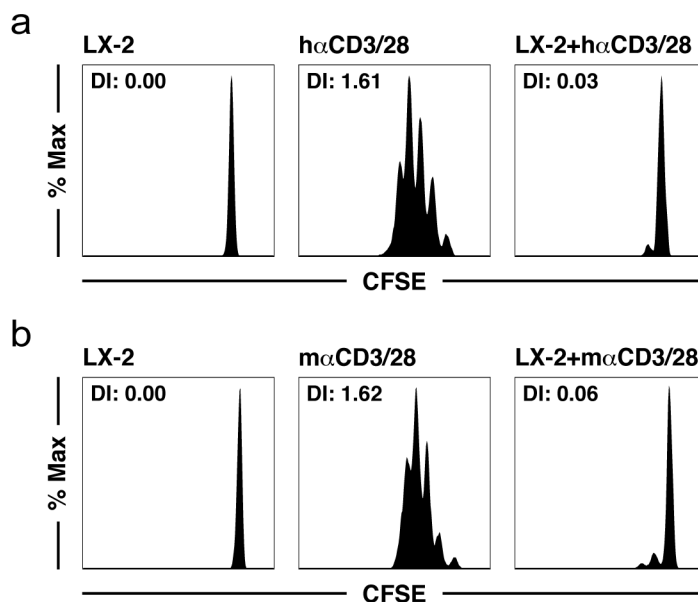
**Abbildung 6: Der HSC-Veto-Effekt ist vom genetischen Hintergrund unabhängig, induziert keine Apoptose und wirkt nur auf naive T-Zellen.** (a) Naive H-2<sup>d</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von H-2<sup>d</sup> HSCs mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln kultiviert und nach drei Tagen wurde deren Proliferation bestimmt. (b) H-2<sup>b</sup> T-Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln  $\pm$  H-2<sup>b</sup> HSCs kultiviert. Anschließend wurde bei den jeweiligen T-Zellen der Grad an Apoptose-positiven Zellen (Annexin V<sup>+</sup>) bestimmt. (c) CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln für 3 Tage stimuliert. Die voraktivierten T-Zellen wurden für 3 weitere Tage unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation  $\pm$  H-2<sup>b</sup> HSCs kultiviert und deren absolute Zellzahl durchflusszytometrisch analysiert. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten gezeigt; ns: nicht signifikant.

Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende T-Zell-Proliferation wäre eine gezielte Elimination der T-Zellen durch HSCs. Um dies auszuschließen, wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von HSCs erneut mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln inkubiert und dann die Apoptoserate der T-Zellen mittels intrazellulärer Annexin V-Färbung bestimmt. Hierbei zeigten sich bei HSC-koinkubierten T-Zellen keine erhöhten Mengen an Annexin V-positiven Zellen, was eindeutig gegen eine gerichtete Apoptoseinduktion bei T-Zellen sprach (**Abb. 6b**).

Wichtig ist zu erwähnen, dass die HSC-vermittelte Inhibition der T-Zell-Proliferation in bisherigen Experimenten nur an naiven T-Zellen betrachtet wurde. Deshalb wurde nun

im Folgenden untersucht, ob auch bereits voraktivierte  $CD8^+$  T-Zellen durch HSCs beeinträchtigt werden können. Daher wurden T-Zellen mittels  $\alpha CD3/28$ -Stimulation voraktiviert und dann in An- bzw. Abwesenheit von  $\alpha CD3/28$ -Partikeln bzw. HSCs inkubiert. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen konnte die Expansion von voraktivierten T-Zellen nicht durch HSCs reduziert werden (**Abb. 6c**). Dies deutet darauf hin, dass der beschriebene inhibitorische Effekt nur auf naive T-Zellen wirkt.

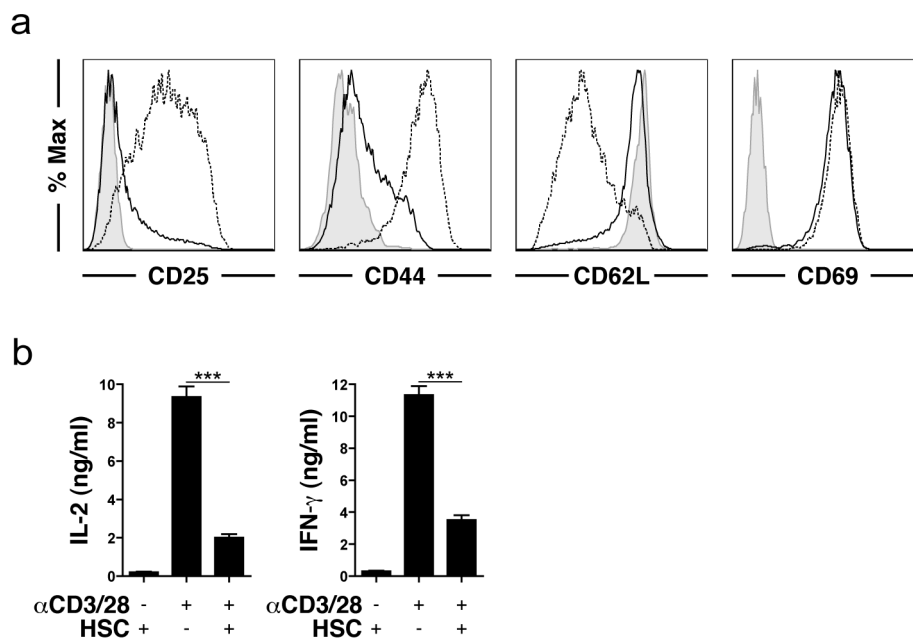
Von besonderem Augenmerk ist, dass der antiproliferative Effekt von HSCs auch im humanen System erkennbar war: Dazu wurden humane  $CD8^+$  T-Zellen mit bzw. ohne die humane Sternzelllinie LX-2 und humanen  $\alpha CD3/28$ -beschichteten Partikeln für 3 Tage koinkubiert. Auch hier zeigte sich nur in der Gruppe mit T-Zellen und  $\alpha CD3/28$ -beschichteten Partikeln eine eindeutige Proliferation (**Abb. 7a**). Die Anwesenheit von HSCs verhinderte also auch im humanen System eine relevante T-Zell-Proliferation. Interessanterweise waren sogar humane HSCs in der Lage, murine T-Zellen zu inhibieren (**Abb. 7b**). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für primäre humane HSCs erhoben werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt demonstrieren diese Ergebnisse die Spezies-unabhängige Fähigkeit von HSCs, die T-Zell-Funktion zu kontrollieren. Dies beschreibt demnach einen neuen immunregulatorischen Mechanismus: die HSC-Veto-Funktion.



**Abbildung 7: Der HSC-Veto-Effekt ist Spezies-unabhängig.** (a) Die humane Sternzelllinie LX-2 wurde mit humanen CFSE-markierten  $CD8^+$  T-Zellen und Partikeln, beschichtet mit humanen  $\alpha CD3/28$ -Antikörpern (h $\alpha CD3/28$ ), kultiviert. (b) Alternativ wurden LX-2 mit naiven murinen  $H-2^b$  T-Zellen und murinen  $\alpha CD3/28$ -beschichteten Partikeln (m $\alpha CD3/28$ ) kultiviert. Nach drei Tagen wurde jeweils die  $CD8^+$  T-Zell-Proliferation am Durchflusszytometer bestimmt. Es ist ein repräsentatives Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

## 4.2 HSCs beeinträchtigen die T-Zell-Aktivierung

Um die HSC-Veto-Funktion nun weiter zu charakterisieren, wurde im Folgenden die Expression von Aktivierungsmarkern auf den koinkubierten T-Zellen betrachtet. Hierfür wurden T-Zellen phänotypisch verglichen, welche mit  $\alpha$ CD3/28-Partikeln bzw.  $\alpha$ CD3/28-Partikeln und HSCs inkubiert wurden. Nach 24 h Kokultur reduzierten HSCs die Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors) sowie CD44 (Adhäsionsmolekül), welche Zeichen für das Fortschreiten einer initialen T-Zell-Aktivierung sind (**Abb. 8a**).



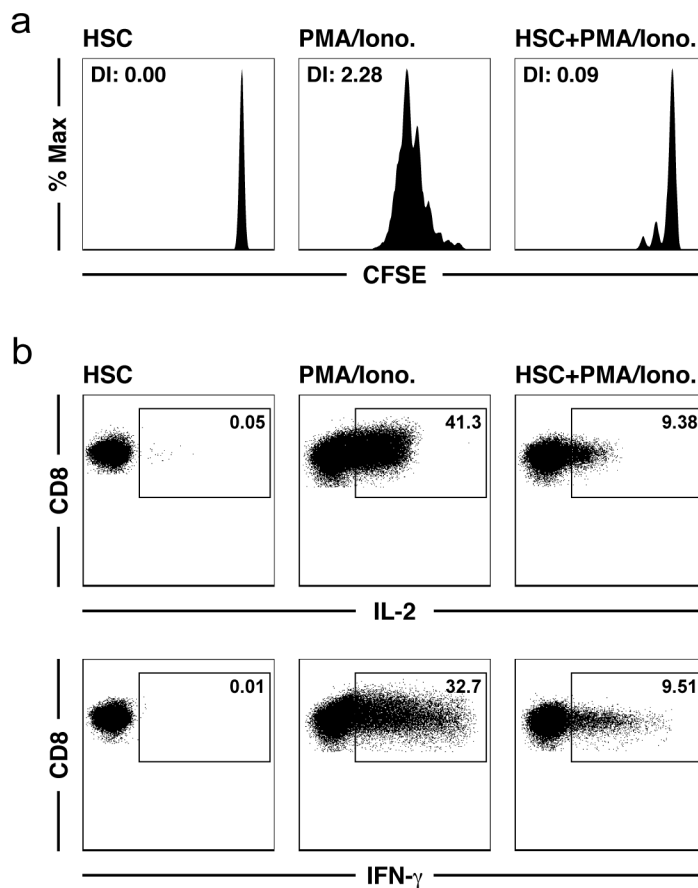
**Abbildung 8: HSCs reduzieren die T-Zell-Aktivierung stimuliert durch  $\alpha$ CD3/28-beschichtete Partikel.** (a) Naive CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln in Anwesenheit (durchgezogene Linie) oder Abwesenheit (gestrichelte Linie) von H-2<sup>b</sup> HSCs kultiviert. Nach 24 h wurde auf CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen die Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD25, CD44, CD62L und CD69 analysiert. Unstimulierte T-Zellen sind als grau gefüllte Histogramme dargestellt. (b) Die Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  von Zellen in (a) wurden nach 24 h Kokultur mittels ELISA analysiert. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten dargestellt, mit \*\*\* $p \leq 0,001$ .

CD8<sup>+</sup> T-Zellen ohne Kontakt zu HSCs zeigten eine deutlich erhöhte Expression dieser Oberflächenmarker. Das auf naiven T-Zellen stark exprimierte CD62L (L-Selektin) wird hingegen während der T-Zell-Aktivierung aufgrund proteolytischer Spaltung massiv herunterreguliert. Passend zu der Expression von CD25 und CD44, konnten bei T-Zellen nach  $\alpha$ CD3/28-Stimulation auf HSCs ausschließlich hohe Level an CD62L, vergleichbar mit naiven T-Zellen, detektiert werden (**Abb. 8a**). So wiesen jedoch  $\alpha$ CD3/28-stimulierte T-Zellen ohne HSCs signifikant geringere Mengen an CD62L auf.

Keine Unterschiede zeigten sich bei der Expression von CD69, einem sehr frühen Aktivierungsmarker (**Abb. 8a**).  $\alpha$ CD3/28-stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sowohl allein als auch zusammen mit HSCs erhöhte Expressionslevel von CD69.

Zur weiteren Charakterisierung der HSC-Veto-Funktion auf T-Zellen wurde auch die Produktion von T-Zell-spezifischen Zytokinen untersucht. Hierfür wurden T-Zellen unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation in An- oder Abwesenheit von HSCs kultiviert und das nach 24 h sezernierte IL-2 bzw. IFN- $\gamma$  mittels ELISA detektiert. In Übereinstimmung mit den Aktivierungsmarkern konnte für auf HSC-kultivierte T-Zellen eine verminderte Freisetzung von beiden Zytokinen festgestellt werden (**Abb. 8b**). Hingegen konnte beobachtet werden, dass T-Zellen ohne Kontakt zu HSCs hohe Mengen an IL-2 und IFN- $\gamma$  produzierten. Allerdings zeigte sich auch, dass die HSC-vermittelte Reduktion der Zytokinproduktion nicht vollständig war. Diese Daten bestätigen die bereits beschriebenen durchflusszytometrischen Ergebnisse der Aktivierungsmarker. Darüber hinaus deuten sie darauf hin, dass die kokultivierten T-Zellen während der Inkubation zuerst eine initiale Aktivierung durchliefen, welche dann durch die HSC-Veto-Funktion eingedämmt wurde.

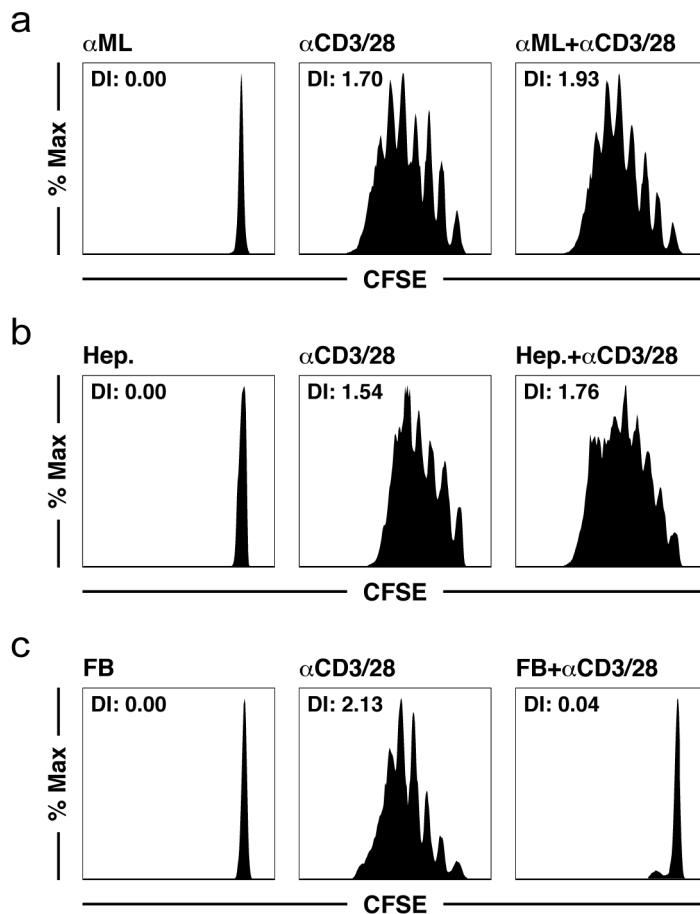
Da diese Ergebnisse implizieren, dass es trotz der Anwesenheit von HSCs zu einer initialen T-Zell-Aktivierung kommt, sollte untersucht werden, ob der Veto-Effekt proximal oder distal im T-Zell-Signalweg wirkt. Dazu wurden HSC-kokultivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit den Substanzen PMA und Ionomycin stimuliert, die im Vergleich zu der  $\alpha$ CD3/28-Stimulation im distalen Bereich des Signalweges der T-Zell-Aktivierung eingreifen. Wie erwartet, führte dieser extrem starke Stimulus zu einer heftigen T-Zell-Proliferation (**Abb. 9a**). Hingegen zeigte sich der HSC-Veto-Effekt selbst unter diesen Bedingungen als äußerst beständig; so war allenfalls eine minimale T-Zell-Expansion sichtbar. Darüber hinaus produzierten PMA/Ionomycin-stimulierte T-Zellen in der Anwesenheit von HSCs auf Einzelzellebene auch signifikant geringere Mengen an IL-2 und IFN- $\gamma$  (**Abb. 9b**). Insgesamt stellen diese Ergebnisse eine neue Funktion von HSCs als vermittelnde Veto-Zelle dar, welche die Proliferation und Zytokinexpression von T-Zellen kontrolliert.



**Abbildung 9: HSCs reduzieren die T-Zell-Aktivierung stimuliert durch PMA/Ionomycin.** (a) Naive  $CD8^+$   $H-2^b$  T-Zellen wurden mit CFSE markiert und für 3 Tage  $\pm$   $H-2^b$  HSCs unter PMA/Ionomycin-Stimulation (5 ng/ml, 1  $\mu$ M) kultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde mittels CFSE-Verdünnung in  $CD8\alpha^+$  Zellen analysiert. (b) Für Zellen in (a) wurden die intrazellulären Mengen an IL-2 und IFN- $\gamma$  bestimmt. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

### 4.3 Spezifität der HSC-Veto-Funktion

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die beschriebene Inhibition der T-Zell-Proliferation eine gemeinsame Besonderheit aller Leberzellen ist. Aus diesem Grund wurde nun untersucht, ob Hepatozyten auch als Veto-Zellen fungieren können. In Anlehnung an die vorangegangenen Experimente, wurden hierfür naive  $CD8^+$  T-Zellen mit der murinen Hepatozytenzelllinie ( $\alpha$ ML) und  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln kokultiviert und die T-Zell-Proliferation nach 3 Tagen untersucht. Die verwendete murine Hepatozytenzelllinie konnte die  $\alpha$ CD3/28-induzierte T-Zell-Proliferation jedoch nicht kontrollieren. So teilten sich T-Zellen, unabhängig von der Anwesenheit von  $\alpha$ ML, in gleichem Ausmaß (**Abb. 10a**). Auch primäre murine Hepatozyten waren nicht in der Lage die T-Zell-Proliferation zu beeinflussen. Hier zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede in der Expansionsrate von T-Zellen (**Abb. 10b**).



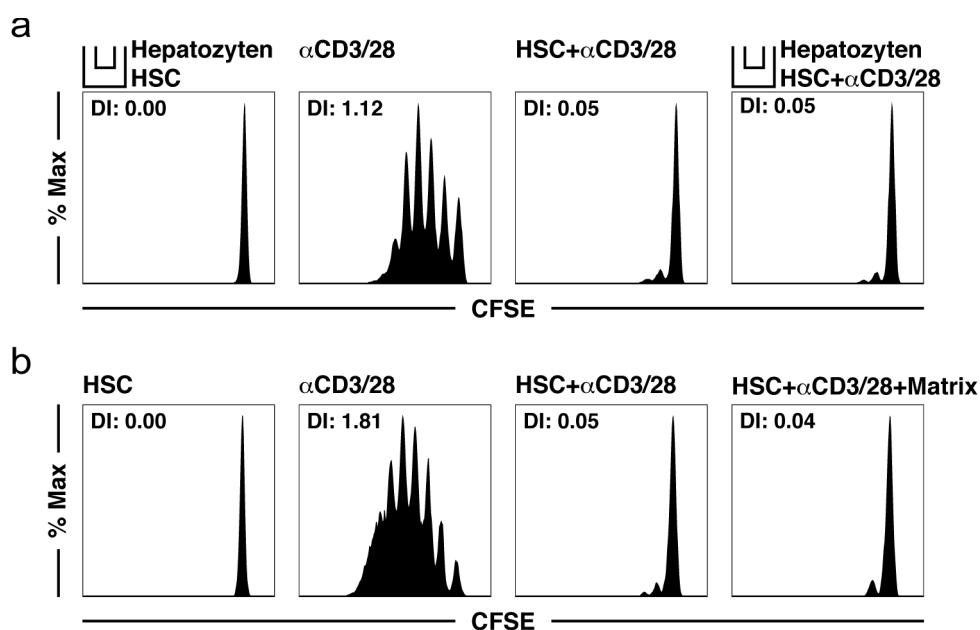
**Abbildung 10: Hepatozyten besitzen keine Veto-Funktion.** (a) Die murine Hepatozytenzelllinie  $\alpha$ ML bzw. (b) primäre murine Hepatozyten wurden mit naiven CFSE-markierten  $CD8^+$  H-2<sup>b</sup> T-Zellen mit oder ohne  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln inkubiert. Nach drei Tagen wurde die T-Zell-Proliferation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (c) Eine Nieren-Fibroblastenlinie (FB) wurde aus C57BL/6 Mäusen generiert, zusammen mit naiven  $CD8^+$  H-2<sup>b</sup> T-Zellen  $\pm$   $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln kultiviert und drei Tage später die jeweilige T-Zell-Proliferation gemessen. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Auf der Suche nach weiteren Zellen, welche vergleichbar mit HSCs die T-Zell-Aktivierung regulieren können, zeigten primäre Nierenfibroblasten einen ähnlichen Veto-Effekt. Unter Verwendung eines Zellrasens aus murinen Nierenfibroblasten konnte die  $\alpha$ CD3/28-induzierte Proliferation naiver T-Zellen komplett verhindert werden (**Abb. 10c**). Diese Daten sprechen dafür, dass Stromazellen aus völlig unterschiedlichen Organen eine ähnliche immunregulatorische Funktion übernehmen könnten. Zusammengefasst sagen diese Daten aber auch aus, dass die Veto-Funktion nicht ein generelles Charakteristikum von allen Leber-residenten Zellen ist.

Da die Veto-Funktion zwar von HSCs, aber nicht von Hepatozyten ausgeübt werden konnte und Hepatozyten die Differenzierung von HSCs beeinflussen (Sawitzka et al.,



2009), sollte im Folgenden untersucht werden, ob Hepatozyten die inhibitorische Funktion von HSCs modulieren können. Um dies zu klären, wurde ein „Transwell-System“ verwendet, welches mit Hilfe einer Membran eine obere Kammer von einer unteren Kammer voneinander trennt. Die eingesetzte Membran war hierbei nicht durchlässig für Zellen, sondern nur für lösliche Moleküle. Unter Verwendung dieses Systems wurden HSCs in der unteren Kammer und primäre Hepatozyten in der oberen Kammer kultiviert. In die untere Kammer wurden zusätzlich  $\alpha$ CD3/28-beschichtete Partikel und CFSE-markierte naive  $CD8^+$  T-Zellen beigefügt und deren Proliferation nach 3 Tagen analysiert. Bei dem Vergleich der Proliferationsprofile zeigten  $\alpha$ CD3/28-stimulierte T-Zellen in beiden Gruppen das gleiche Verhalten (**Abb. 11a**).



**Abbildung 11: HSC-Veto-Funktion ist unabhängig von Hepatozyten und extrazellulärer Matrix.** (a)  $H-2^b$  Hepatozyten wurden in einem 24-Well Transwell-Einsatz ( $0,4 \mu\text{m}$  Porengröße) von  $H-2^b$  HSCs separiert, welche in der unteren Kammer kultiviert wurden. Zusammen mit den HSCs wurden naive CFSE-markierte  $CD8^+$   $H-2^b$  T-Zellen  $\pm$   $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln kultiviert. Drei Tage später wurde die Proliferation von  $CD8\alpha^+$  T-Zellen bestimmt. Als Kontrolle wurde die  $\alpha$ CD3/28-Stimulation in dem Transwell-System ausgelassen bzw. es wurden T-Zellen mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln  $\pm$  HSCs inkubiert. (b)  $H-2^b$  HSCs wurden auf Matrigel kultiviert (Matrix; bestehend aus Laminin, Kollagen Typ IV und Entaktin). Unter An- bzw. Abwesenheit der HSCs auf Matrigel wurden  $CD8^+$   $H-2^b$  T-Zellen  $\pm$   $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln koinkubiert und nach drei Tagen die T-Zell-Proliferation gemessen. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Demzufolge konnte also durch Hepatozyten keine Reduktion des HSC-Veto-Effektes auf T-Zellen beobachtet werden. Allerdings machen diese Daten nur eine Aussage über einen möglichen Effekt von löslichen Mediatoren, welche von Hepatozyten sezerniert werden, da HSCs und Hepatozyten in dem beschriebenen „Transwell-System“ getrennt

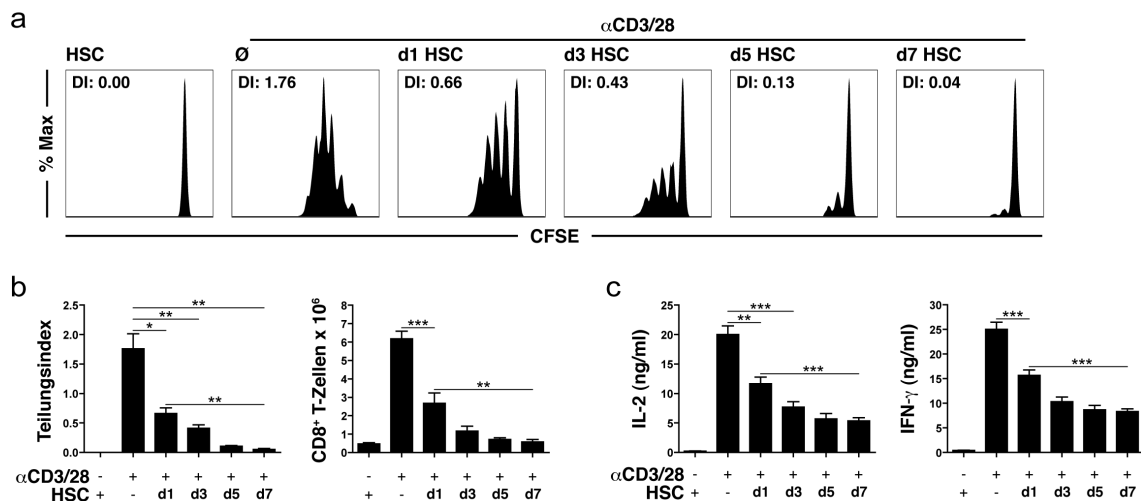
vorlagen. Ein Einfluss von direktem Hepatozyten-HSC-Kontakt auf die Veto-Funktion von HSCs konnte in diesem Experiment also nicht ausgeschlossen werden.

So sollte in einem nächsten Schritt der direkte Hepatozyten-HSC-Kontakt untersucht werden, genauer gesagt, ob differenzierende Signale von extrazellulärer Matrix die Veto-Funktion von HSCs beeinflussen könnten. Um dies beurteilen zu können, wurden HSCs auf Matrigel, einer Mischung aus Laminin, Kollagen Typ IV und Entaktin, kultiviert. Die in dieser Mischung enthaltenen Substanzen stellen wichtige Komponenten der extrazellulären Matrix da. Vergleichbar mit den vorherigen Experimenten, wurden zu den auf Matrigel kultivierten HSCs wieder T-Zellen und  $\alpha$ CD3/28-beschichtete Partikel gegeben und die T-Zell-Expansion untersucht. Doch auch die untersuchten extrazellulären Bestandteile hatten keinen mildernden Einfluss auf die HSC-Veto-Funktion in der  $\alpha$ CD3/28-induzierten T-Zell-Proliferation (**Abb. 11b**).

#### 4.4 Der Veto-Effekt korreliert mit der Aktivierung von HSCs

Auf Plastik kultiviert, werden HSCs über die Zeit *in vitro* aktiviert. Hierbei verändern sich die HSCs morphologisch, aber auch funktional und exprimieren z.B. „Smooth Muscle Antigen“ (SMA). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Veto-Funktion von HSCs mit deren Aktivierungsstatus korreliert.

Hierfür wurden frisch isolierte murine HSCs für 1-7 Tage auf Plastik kultiviert und damit unterschiedlich stark aktiviert und differenziert. Anschließend wurde deren immunsuppressive Fähigkeit auf  $CD8^+$  T-Zellen analysiert. Interessanterweise zeigte sich, dass eine *in vitro* Kultur der HSCs über mehrere Tage von einer Zunahme der inhibitorischen Funktion auf die T-Zell-Proliferation begleitet wurde (**Abb. 12a+b**). An Tag 1 nach der Isolation zeigte sich nur eine schwache Suppression der T-Zell-Aktivierung. Hingegen war die Suppression 7 Tage nach Isolation besonders stark ausgeprägt. Zusätzlich wurde für jeden untersuchten HSC-Aktivierungsstatus auch die Zytokinsekretion der jeweiligen kokultivierten T-Zellen gemessen (**Abb. 12c**). Hierbei konnte man von Tag 1 bis Tag 7 für IL-2 und IFN- $\gamma$  eine fortschreitende Abnahme der Zytokinmenge feststellen.



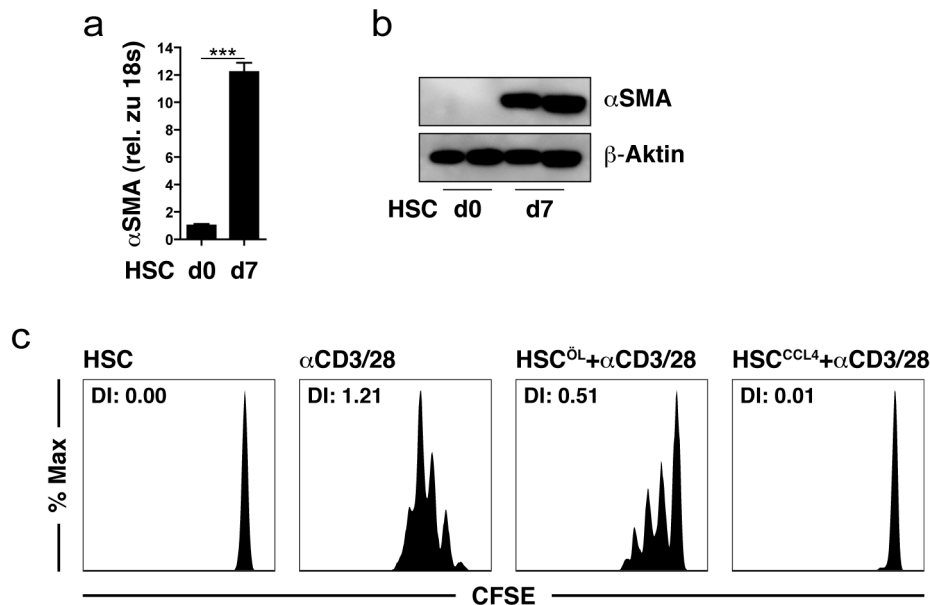
**Abbildung 12: Die Inhibition der T-Zell-Proliferation korreliert mit der Aktivierung von HSCs.** (a) H-2<sup>b</sup> HSCs wurden isoliert und für 1-7 Tage kultiviert und somit unterschiedlich stark aktiviert. Zu den HSCs in verschiedenen Aktivierungsstadien wurden CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen und αCD3/28-beschichtete Partikel gegeben. Drei Tage später wurde die T-Zell-Proliferation, (b) der zugehörige Teilungsindex als auch die absolute CD8<sup>+</sup> Zellzahl bestimmt. (c) Die Zytokinexpression von IL-2 und IFN-γ von T-Zellen nach Kontakt mit HSCs zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro* Kultur wurde mittels ELISA analysiert. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, mit \*p≤0,05, \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001.

Um den Aktivierungsstatus der HSCs zu bestätigen, wurde die Expression des Markers α-SMA mittels RT-PCR bestimmt. Die α-SMA-Expressionspegel korrelieren generell eng mit der phänotypischen Aktivierung der HSCs und sind ein besonders geeigneter Aktivierungsmarker. Bei HSCs an Tag 7 nach Isolation konnte im Vergleich zu Tag 0 ein 12-facher Anstieg der α-SMA Expression gemessen werden (**Abb. 13a**).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden auch die Proteinmengen von SMA mittels Westernblot analysiert. In Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen, konnte in HSCs direkt nach Isolation kein α-SMA gemessen werden, hingegen wurden an Tag 7 große Mengen detektiert (**Abb. 13b**).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob HSCs nach geeigneter Aktivierung auch *in vivo* als Veto-Zellen agieren können. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Plastik-vermittelten Aktivierung von HSCs und dem zunehmenden Veto-Effekt um einen *in vitro* Artefakt handelt. Um dieses Problem zu beantworten, wurden aus fibrotischen Mäusen *in vivo* aktivierte HSCs isoliert. Zur Induktion einer Fibrose wurde Mäusen für 6 Wochen zweimal wöchentlich Tetrachlorkohlenstoff (CCL<sub>4</sub>) injiziert. In dieser Zeit entwickelten die Mäuse eine fortschreitende Fibrose, die zu einer starken Aktivierung von HSCs führt. Nach 6 Wochen wurden aus den fibrotischen Mäusen schließlich HSCs isoliert. Diese wurden nicht wie in allen bisherigen

Experimenten erst *in vitro* aktiviert, sondern direkt auf ihre HSC-Veto-Funktion hin getestet. In Einklang mit den *in vitro* generierten Daten zeigte sich, im Gegensatz zu den HSCs aus nicht fibrotischen Kontrollmäusen, auch bei *in vivo* aktivierten HSCs eine komplett unterdrückte T-Zell-Expansion (Abb. 13c). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Aktivierung von HSCs zwingend notwendig ist, um die Funktion einer Veto-Zelle zu erlangen und dass diese während der Leberfibrose wirksam ist.



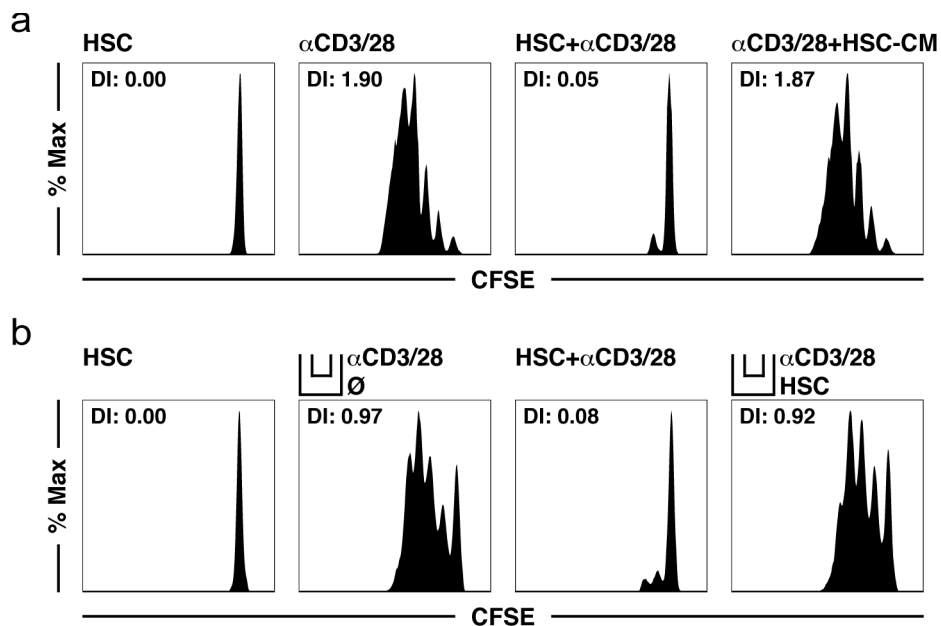
**Abbildung 13: *In vitro* sowie *in vivo* aktivierte HSCs besitzen Veto-Funktion.** (a, b) HSCs wurden aus C57BL/6 Mäusen aufgereinigt und direkt nach der Isolation bzw. nach *in vitro* Kultur für 7 Tage wurden Proteine und RNA extrahiert. Hiermit wurden mittels (a) RT-PCR und (b) Westernblot die relativen Expressionslevel von  $\alpha$ -SMA bestimmt. Bei der RT-PCR wurde gegen 18s normalisiert.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle für den Westernblot verwendet. (c) Bei C57BL/6 Mäusen wurde mittels i.p. Injektion von CCL<sub>4</sub> in Mineralöl über 6 Wochen eine Fibrose induziert. Kontrolltiere erhielten nur Mineralöl. Aus den fibrotischen Tieren wurden HSCs isoliert und zusammen mit CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen und  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln kokultiviert. Nach drei Tagen wurde die T-Zell-Proliferation bestimmt. Es sind jeweils ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, mit \*\*\* $p \leq 0,001$ .

#### 4.5 Die HSC-Veto-Funktion basiert auf physikalischem Kontakt

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob die Veto-Funktion von HSCs auf physikalischer Interaktion oder löslichen Mediatoren beruht. In diesen Experimenten sollte geklärt werden, ob für den HSC-Veto-Effekt direkter Kontakt zwischen T-Zellen und HSCs nötig ist oder ob HSCs Moleküle sezernieren, welche immunsuppressiv auf T-Zellen wirken. Dazu wurden T-Zellen mit konditioniertem Medium von aktivierten HSCs inkubiert und die  $\alpha$ CD3/28-induzierte T-Zell-Proliferation bestimmt. Unter diesen Bedingungen mit konditioniertem Medium lagen jedoch nach 3 Tagen die

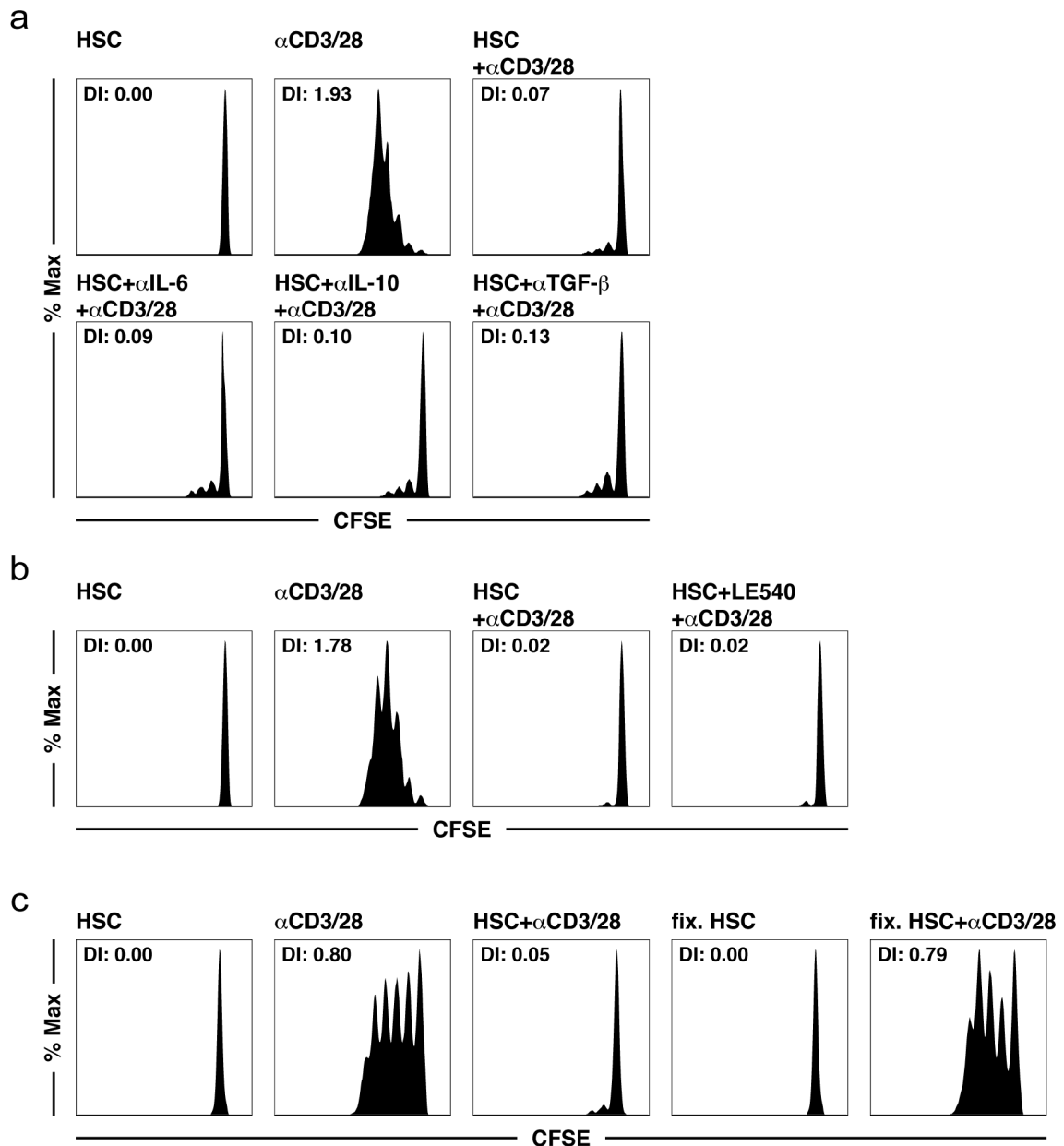
gleichen Proliferationsprofile wie bei frischem Medium vor (**Abb. 14a**). Demzufolge führte konditionierter Überstand von aktivierten HSCs nicht zur Inhibition der T-Zell-Proliferation.

Es ist vorstellbar, dass bestimmte Moleküle mit geringer Halbwertszeit den HSC-Veto-Effekt vermitteln bzw. definierte Konzentrationen vorliegen müssen. Deshalb wurde im Folgenden ein „Transwell-System“ verwendet, um eine zelluläre Kommunikation über lösliche Mediatoren ohne direkten Zellkontakt zu ermöglichen. In diesen Experimenten wurden HSCs in der unteren Kammer kultiviert, getrennt von T-Zellen unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation bzw. T-Zellen ohne Stimulation in der oberen Kammer. Vergleichbar zu den Experimenten mit konditioniertem Überstand, konnte auch hier kein Effekt auf die T-Zell-Proliferation erkannt werden (**Abb. 14b**). Sowohl T-Zellen, die separiert von HSCs in einem „Transwell-Einsatz“ vorlagen, als auch allein kultivierte T-Zellen wurden durch eine  $\alpha$ CD3/28-Stimulation gleichermaßen aktiviert. Anhand dieser beiden Experimente konnte gezeigt werden, dass physikalischer Kontakt zu T-Zellen unbedingt nötig ist, damit der HSC-Veto-Effekt zur Geltung kommen kann.



**Abbildung 14: Die HSC-Veto-Funktion basiert auf physikalischem Kontakt.** (a) CFSE-markierte naive  $CD8^+$   $H-2^b$  T-Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln und HSC-konditioniertem Medium (HSC-CM) kokultiviert. Drei Tage später wurde die T-Zell-Proliferation bestimmt. (b) CFSE-markierte  $CD8^+$   $H-2^b$  T-Zellen wurden unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation in einem 24-Well Transwell-Einsatz (0,4  $\mu$ m Porengröße), getrennt von  $H-2^b$  HSCs in der unteren Kammer, kultiviert. Als Kontrolle wurden  $CD8^+$   $H-2^b$  T-Zellen entweder ohne HSCs in dem Transwell-System stimuliert bzw. in direktem Kontakt mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln und HSCs inkubiert. Anhand der CFSE-Verdünnung wurde nach drei Tagen die Proliferation der T-Zellen analysiert. Jeweils ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Ausserdem sollte ein Beitrag von lokal hochkonzentrierten löslichen Mediatoren zur Inhibition der Proliferation von T-Zellen ausgeschlossen werden. Deshalb wurden im Folgenden die typischen immunregulatorischen Moleküle IL-6, IL-10 und TGF- $\beta$  auf eine eventuelle Beteiligung bei der T-Zell-Suppression getestet (**Abb. 15a**).



**Abbildung 15: Kontakt mit lebenden HSCs ermöglicht den Veto-Effekt, immunregulatorische lösliche Moleküle nicht.** (a) CFSE-Verdünnung in naiven CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen nach einer Inkubation von 3 Tagen mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln sowie H-2<sup>b</sup> HSCs zusammen mit den neutralisierenden Antikörpern  $\alpha$ IL-6 (30  $\mu$ g/ml),  $\alpha$ IL-10 (30  $\mu$ g/ml) und  $\alpha$ TGF- $\beta$  (30  $\mu$ g/ml). (b) Kokultur aus naiven CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation  $\pm$  H-2<sup>b</sup> HSCs in Anwesenheit des Rezeptor-Antagonisten LE540 (1  $\mu$ mol/l in DMSO) bzw. DMSO allein. Die Proliferaton der T-Zellen wurde nach 3 Tagen anhand des CFSE-Gehaltes in CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen bestimmt. (c) H-2<sup>b</sup> HSCs wurden mit Glutaraldehyd fixiert, und mit CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen  $\pm$   $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln inkubiert und nach 3 Tagen die T-Zell-Proliferation bestimmt. Es ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Hierfür wurden entsprechende neutralisierende Antikörper zu Kokulturen aus HSCs und naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation gegeben und die T-Zell-Proliferation betrachtet. Allerdings zeigte keiner der verwendeten neutralisierenden Antikörper eine Reduktion des HSC-Veto-Effektes.

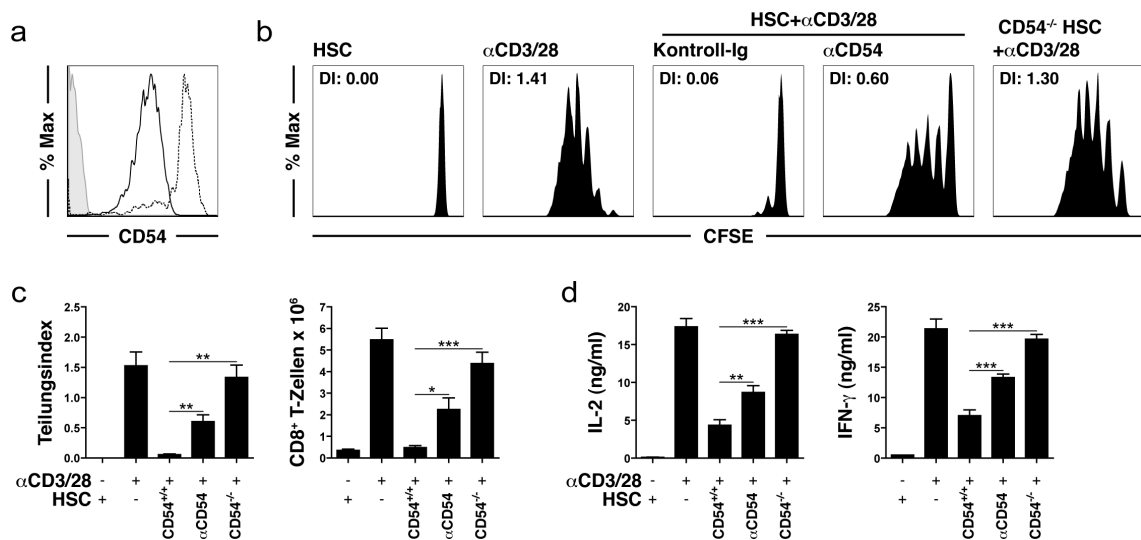
Im Weiteren sollte eine mögliche Beteiligung von Vitamin A untersucht werden. Naive HSCs sind dafür bekannt, große Mengen an Vitamin A zu speichern und diese im Laufe ihrer Aktivierung auszuschütten. Da sich insbesondere bei aktivierten HSCs eine stark ausgebildete HSC-Veto-Funktion manifestierte, wäre eine Beteiligung von lokal freigesetztem Vitamin A durchaus denkbar. Um dies zu überprüfen, wurde der Antagonist LE540 verwendet, welcher die Bindung des Vitamin A-Metaboliten Retinsäure an seinen Rezeptor blockiert. So wurde LE540 zu Kokulturen aus HSCs und  $\alpha$ CD3/28-stimulierten T-Zellen gegeben und deren Aktivierung untersucht (**Abb. 15b**). Allerdings führte die Anwesenheit des Retinsäure-Antagonisten LE540 zu keiner Veränderung in der Veto-Funktion. Insgesamt unterstreichen alle diese Ergebnisse, dass der immunregulatorische Effekt durch HSCs nicht über lösliche Mediatoren vermittelt wird, sondern über Kontakt zur Zellmembran.

Um im Folgenden zusätzliche Details über den molekularen Mechanismus der HSC-Veto-Funktion zu erhalten, sollte geklärt werden, ob lebende HSCs für eine Suppression nötig sind. Hierdurch sollte herausgefunden werden, ob für eine T-Zell-Inhibition kontinuierlich suppressive Oberflächenmoleküle produziert werden müssen bzw. ob deren Orientierung und Funktionalität auf der Zellmembran von Bedeutung ist. Zur Untersuchung dieser Frage wurden HSCs mit Glutaraldehyd fixiert und dann wie gewohnt in der Kokultur eingesetzt, um deren immunregulatorische Funktion zu überprüfen. Interessanterweise proliferierten  $\alpha$ CD3/28-stimulierte T-Zellen unter Anwesenheit von fixierten HSCs wie in deren Abwesenheit, hingegen zeigten lebende HSCs den gewohnten inhibitorischen Effekt (**Abb. 15c**). Demnach lässt sich folgern, dass tote bzw. fixierte HSCs kein immunregulatorisches Potential besitzen; nur lebende Zellen scheinen diese Funktion ausüben zu können. Dies weist darauf hin, dass der Veto-Effekt nicht nur auf nahem Zellkontakt basiert, sondern auch auf einer funktionalen wechselseitigen Interaktion zwischen T-Zellen und HSCs beruht.

#### 4.6 Die CD54-Expression ist essentiell für die HSC-vermittelte Effektorfunktion

In den vorangegangenen Experimenten kristallisierte sich die nahe physikalische Zell-Interaktion zu lebenden HSCs als die Hauptbedingung für eine erfolgreiche HSC-Veto-

Funktion heraus. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob das Adhäsionsmolekül CD54 bei der inhibitorischen Funktion von HSCs involviert war. CD54 ist ein essentielles Molekül für die Vermittlung von T-Zell-Interaktionen und ist während diesen Interaktionen dynamisch reguliert (Wang and Springer, 1998). Zuerst wurde daher untersucht, ob CD54 auf HSCs abhängig von den Kulturbedingungen differentiell reguliert wurde. Hierfür wurden HSCs in Kontakt zu T-Zellen unter Kontroll- bzw. stimulierenden Bedingungen kultiviert und anschließend die CD54-Expression von HSCs durchflusszytometrisch analysiert. Tatsächlich zeigte sich eine unterschiedliche Regulation. So regulierten HSCs nach Kontakt mit  $\alpha$ CD3/28-stimulierten T-Zellen CD54 hoch (Abb. 16a). Hingegen zeigten HSCs aus der Kontrollgruppe, nach Kokultur mit T-Zellen ohne Stimulation, keine erhöhten Mengen an CD54.



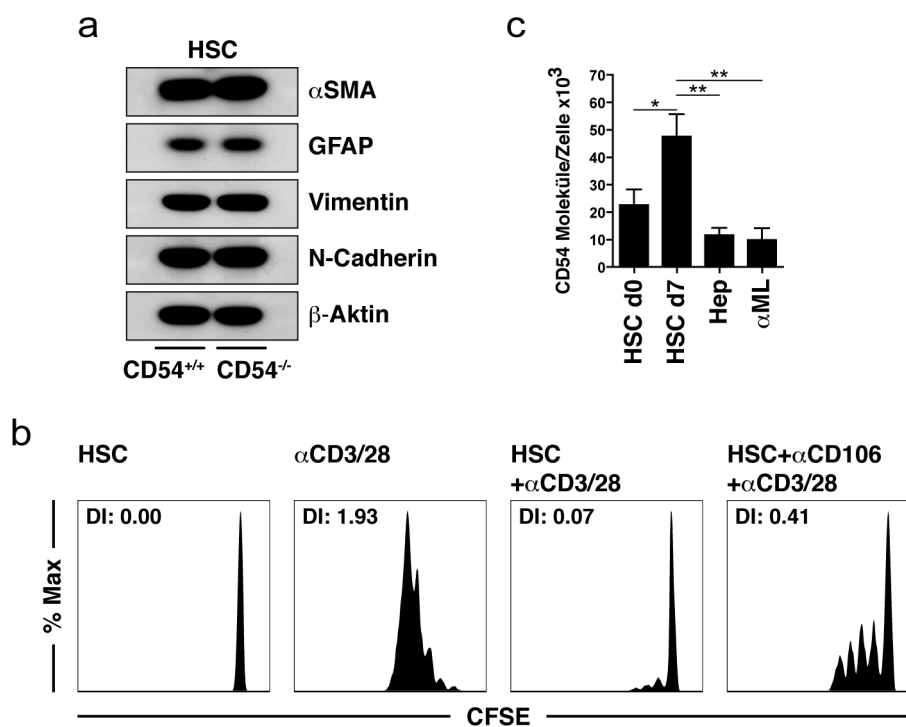
**Abbildung 16: Die HSC-Veto-Funktion ist CD54-abhängig.** (a) H-2<sup>b</sup> HSCs wurden mit naiven CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen zusammen mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln (gestrichelte Linie) bzw. ohne Partikel (durchgezogene Linie) kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre CD54-Expression analysiert. Die Isotypkontrolle ist als grau gefülltes Histogramm dargestellt. (b) CFSE-markierte naive CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln und H-2<sup>b</sup> HSCs zusammen mit dem blockierenden Antikörper  $\alpha$ CD54 (30  $\mu$ g/ml) oder einem Kontroll-Antikörper (Kontroll-Ig) kokultiviert. Alternativ wurden HSCs aus CD54<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und in der Kokultur eingesetzt. Anhand der CFSE-Verdünnung wurde nach drei Tagen die T-Zell-Proliferation bzw. (c) Teilungsindex und absolute Zellzahl bestimmt. (d) Die Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  von Zellen in (b) wurde mittels ELISA analysiert. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, mit \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Um nun zu überprüfen, ob auch die CD54-Expression bei dem Veto-Effekt involviert war, wurden für weitere Kokultur-Experimente HSCs von CD54-Knockout Mäusen verwendet bzw. wurde CD54 mit spezifischen neutralisierenden Antikörpern blockiert. In beiden Situationen wurde eine Aufhebung des Veto-Effektes von HSCs auf die



T-Zell-Proliferation erkennbar (**Abb. 16b**). Die semiquantitativen Proliferationsprofile wurden hierfür ebenfalls mittels einer Bestimmung der Teilungsindizes sowie der absoluten Zellzahlen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach 3 Tagen verifiziert (**Abb. 16c**). Beeindruckender Weise zeigte sich bei Verwendung von CD54<sup>-/-</sup> Mäusen ein fast vollständiges Fehlen der HSC-Veto-Funktion. Auch auf Zytokinebene für IL-2 und IFN- $\gamma$  zeigte sich die beschriebene CD54-Abhängigkeit (**Abb. 16d**).

Speziell bei CD54<sup>-/-</sup> HSCs blieb der Veto-Effekt völlig aus. Da aber auch gezeigt werden konnte, dass der inhibitorische Effekt von vorangegangener HSC-Aktivierung abhängig war, sollte nun überprüft werden, ob *in vitro* aktivierte CD54<sup>-/-</sup> bzw. CD54<sup>+/+</sup> HSCs tatsächlich den gleichen aktivierten Phänotyp zeigen. Somit galt es, eine geringere Aktivierung der CD54<sup>-/-</sup> HSCs auszuschließen, um die unterschiedlichen Fähigkeiten zur Ausübung der Veto-Funktion zu validieren.



**Abbildung 17: Der CD54-Expressionspegel entscheidet über den Veto-Effekt.** (a) HSCs wurden aus CD54<sup>+/+</sup> und CD54<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert, 7 Tage *in vitro* kultiviert und deren Protein in einem Westernblot eingesetzt. Hierbei wurden die Marker  $\alpha$ SMA, GFAP, Vimentin und N-Cadherin analysiert.  $\beta$ -Aktin fungierte als Ladekontrolle. (b) CFSE-markierte naive CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen wurden unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation mit H-2<sup>b</sup> HSCs in der Anwesenheit des blockierenden Antikörpers  $\alpha$ CD106 (30  $\mu$ g/ml) auf ihre T-Zell-Proliferation untersucht. (c) Die absolute Anzahl von CD54-Molekülen pro Zelle wurde durchflusszytometrisch mithilfe der QuantiBRITE PE Partikel für folgende Zellen bestimmt: H-2<sup>b</sup> HSCs an Tag 7 bzw. direkt nach Isolation, H-2<sup>b</sup> primäre Hepatozyten und die murine Hepatozytenzelllinie  $\alpha$ ML. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, mit \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

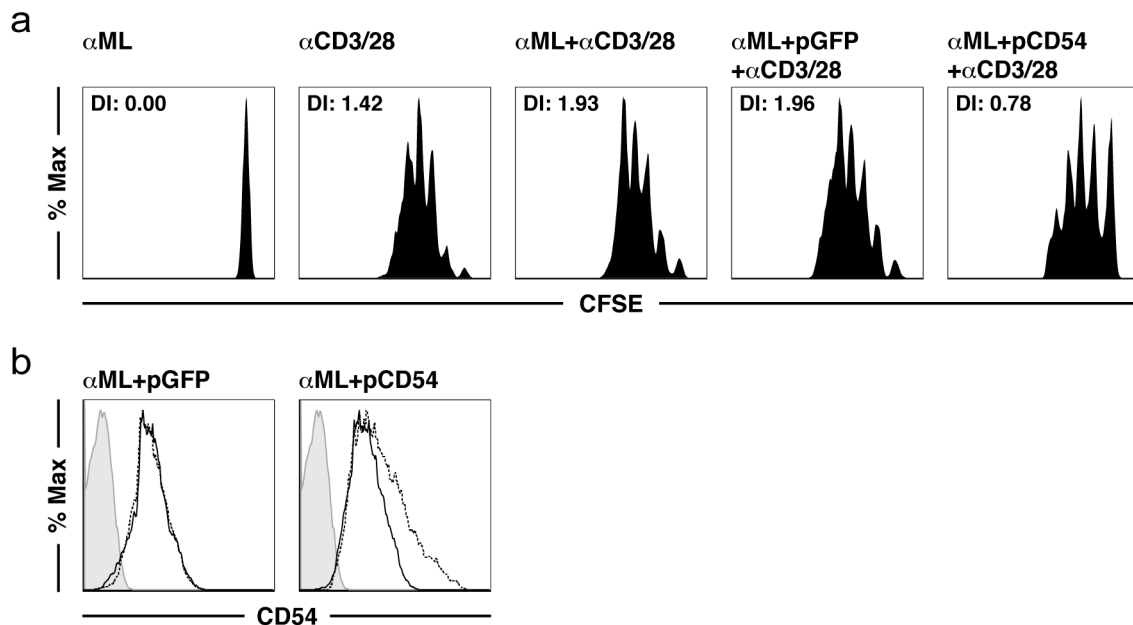
Zur Analyse der jeweiligen Aktivierungsstadien der aktivierten HSCs wurden die Marker  $\alpha$ -SMA, GFAP, Vimentin und N-Cadherin verwendet (**Abb. 17a**). Insbesondere  $\alpha$ -SMA und GFAP sind weit verbreitete HSC-Marker, wobei bei einer Aktivierung von HSCs mit erhöhten Mengen an  $\alpha$ -SMA und einer erniedrigten GFAP-Expression zu rechnen ist. Bei einer vergleichenden Analyse der *in vitro* aktivierten CD54<sup>-/-</sup> bzw. CD54<sup>+/+</sup> HSCs im Westernblot wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Markern festgestellt (**Abb. 17a**). Somit konnte gezeigt werden, dass beide Zellpopulationen den gleichen Aktivierungsstatus hatten. Gleichzeitig bestätigten diese Daten, dass die Expression von CD54 der kritische Parameter für die HSC-vermittelte Veto-Funktion ist.

CD106, ein weiteres Adhäsionsmolekül, wird ebenfalls konstitutiv von HSCs exprimiert und ist dafür bekannt, das Überleben von aktivierten T-Zellen zu fördern (Paessens et al., 2008). Deshalb wurde auch ein möglicher Beitrag von CD106 auf die HSC-Veto-Funktion untersucht. In diesem Versuch wurde ein neutralisierender Antikörper gegen CD106 in der Kokultur aus HSCs und  $\alpha$ CD3/28-stimulierten T-Zellen eingesetzt. Die resultierende Expansion von naiven T-Zellen unterschied sich jedoch nur geringfügig (**Abb. 17b**). So wurde gefolgert, dass CD106 nur auf untergeordnete Weise zu dem HSC-Veto-Effekt beitrug.

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die jeweiligen Expressionspegel von CD54 direkt mit der Veto-Funktion korrelieren. Zur Quantifizierung der absoluten Anzahl an CD54-Molekülen pro Zelle wurde mittels Durchflusszytometer eine Partikel-basierte Kalibrationsmethode verwendet. Mit Hilfe dieser Methode wurde festgestellt, dass aktivierte HSCs an Tag 7 nach Isolation zweimal so viele CD54-Moleküle im Vergleich zu frisch isolierten HSCs exprimierten (**Abb. 17c**). Interessanterweise korrelierte die Menge an CD54-Molekülen direkt mit dem Grad der Veto-Funktion von aktivierten bzw. naiven HSCs. Wie erwartet, hatten primäre murine Hepatozyten sowie die Hepatozytenzelllinie  $\alpha$ ML eine signifikant geringere Anzahl an CD54-Molekülen pro Zelle im Vergleich zu primären murinen HSCs. Demzufolge erklären diese Daten auch das bereits beschriebene Fehlen der Veto-Funktion bei Hepatozyten.

In einem nächsten Schritt sollte nun auch funktional bewiesen werden, dass die Expressionspegel von CD54 entscheidend für die Inhibition von vermittelnden Veto-Zellen waren. Demnach wurde mittels einer Transfektion die CD54-Expression in der Hepatozytenzelllinie  $\alpha$ ML erhöht und deren suppressive Funktion getestet. Wie bereits beschrieben, zeigten unbehandelte  $\alpha$ ML keinen einschränkenden Einfluss auf die

Proliferation von T-Zellen (**Abb. 18a**). Jedoch erlangten CD54-transfizierte  $\alpha$ ML eine gewisse inhibitorische Kapazität gegenüber der  $\alpha$ CD3/28-induzierten Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Anstieg der inhibitorischen Funktion fiel hier zwar eher mäßig aus, korrelierte aber mit einem relativ geringen Anstieg der CD54-Expressionslevel nach Transfektion (**Abb. 18b**). Insgesamt lieferten diese Daten Hinweise für eine zentrale Rolle hoher CD54-Expressionspegel bei der Entfaltung der Veto-Funktion von HSCs.

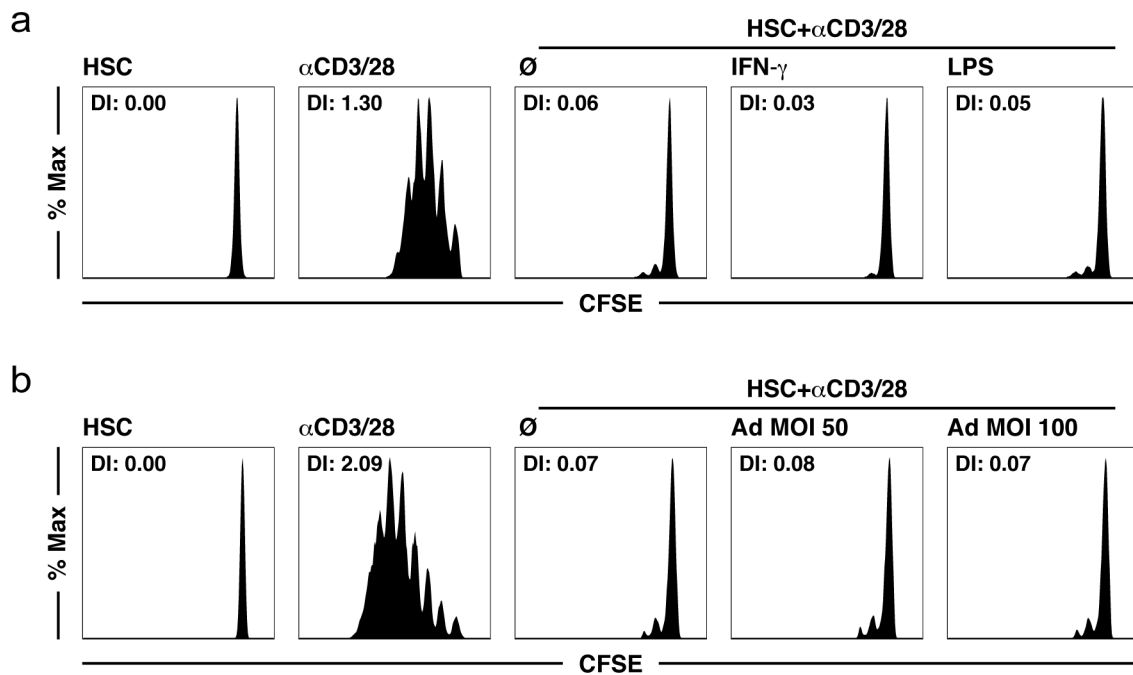


**Abbildung 18: Überexpression von CD54 begünstigt Veto-Effekt.** (a) Die murine Hepatozytenzelllinie  $\alpha$ ML wurde mit einem CD54-Plasmid (pCD54) oder einem Kontroll-Plasmid (pGFP) transfiziert. Die behandelten bzw. unbehandelten  $\alpha$ ML wurden mit CFSE-markierten CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen  $\pm$   $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln inkubiert. Nach drei Tagen wurde die T-Zell-Proliferation bestimmt. (b) Die pCD54- bzw. pGFP-transfizierten  $\alpha$ ML (gestrichelte Linien) wurden durchflusszytometrisch auf ihre CD54-Expression untersucht. Unbehandelte  $\alpha$ ML sind mit einer durchgezogenen Linie dargestellt, Isotypkontrollen als grau gefüllte Histogramme. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

#### 4.7 Beständigkeit der HSC-Veto-Funktion

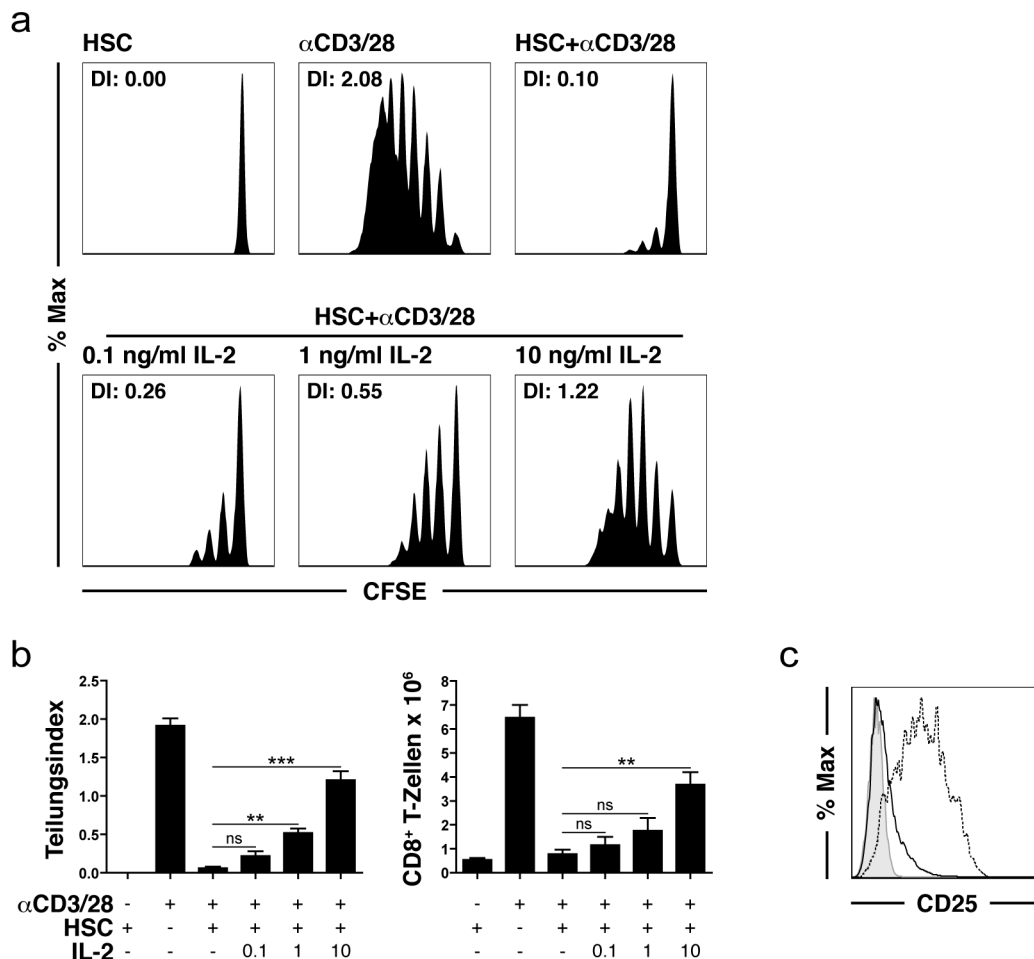
Nachdem bisher untersucht wurde, welche Auswirkungen der HSC-Veto-Effekt hat und wie er funktioniert, sollte hier nun erörtert werden, wie robust diese Funktion ist. Für diese Untersuchungen wurden HSCs mit dem proinflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$  oder mit dem „Toll-like“ Rezeptor 4 Liganden Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und anschließend die inhibitorische Kapazität der HSCs untersucht. Unabhängig von diesen Behandlungen verhinderten HSCs in allen Gruppen eine signifikante Proliferation der T-Zellen (**Abb. 19a**). Demzufolge reichte die beschriebene Stimulation nicht aus bzw. war nicht geeignet, um die inhibitorische Funktion von HSCs aufzuheben.

Darüber hinaus wurden auch mit Adenovirus infizierte HSCs untersucht. Selbst mit Adenovirus-infizierte HSCs zeigten keine Veränderungen in der T-Zell-Proliferation unter  $\alpha$ CD3/28-Stimulation und somit keine veränderte inhibitorische Funktion (**Abb. 19b**). Diese Ergebnisse machten einerseits deutlich, dass die Veto-Funktion extrem stabil ist. Andererseits passen diese Ergebnisse auch zu der Beobachtung, dass CD54 eine essentielle Rolle in der HSC-vermittelten Inhibition spielt, da die verwendeten Stimuli dafür bekannt sind, die Expressionspegel von CD54 zu erhöhen.



**Abbildung 19: Die HSC-Veto-Funktion widersteht proinflammatorischen Signalen.** (a) Kokulturen aus CFSE-markierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen  $\pm$   $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln  $\pm$  H-2<sup>b</sup> HSCs wurden durch IFN- $\gamma$  (50 U/ml) bzw. LPS (10 ng/ml) ergänzt und die T-Zell-Proliferation wurde untersucht. (b) CFSE-Verdünnung von CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen nach Inkubation mit Adenovirus (Ad)-infizierten H-2<sup>b</sup> HSCs sowie  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln für 3 Tage. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Bemerkenswerterweise ist die beschriebene Inhibition der T-Zell-Proliferation einer Induktion von Anergie durch tolerogene APCs sehr ähnlich. Daher wurde getestet, ob IL-2, welches dafür bekannt ist Anergie zu brechen (Schwartz, 2003), die HSC-Veto-Funktion überwinden kann. Hierfür wurden HSCs mit verschiedenen Konzentrationen an IL-2 zusammen mit  $\alpha$ CD3/28-stimulierten T-Zellen kultiviert. Tatsächlich wirkte exogen zugegebenes IL-2 dosisabhängig der inhibitorischen Funktion von HSCs auf die T-Zell-Proliferation bzw. Expansion entgegen (**Abb. 20a+b**). In diesen Experimenten konnte eindeutig gezeigt werden, dass IL-2 den Veto-Effekt von HSCs brechen kann. Jedoch waren hierzu nur relativ hohe Konzentrationen von IL-2 in der Lage.



**Abbildung 20: Exogenes IL-2 bricht HSC-Veto-Funktion.** (a) CFSE-Verdünnung von naiven CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen nach Inkubation mit αCD3/28-beschichteten Partikeln ± H-2<sup>b</sup> HSCs unter Zugabe von exogenem rekombinanten IL-2 in verschiedenen Konzentrationen (0,1-10 ng/ml). Nach drei Tagen wurde die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch analysiert und (b) der zugehörige Teilungsindex bzw. die absolute CD8<sup>+</sup> Zellzahl bestimmt. (c) Naive CD8<sup>+</sup> H-2<sup>b</sup> T-Zellen wurden unter αCD3/28-Stimulation zusammen mit CD54<sup>-/-</sup> HSCs (gestrichelte Linie) bzw. CD54<sup>+/+</sup> HSCs (durchgezogene Linie) inkubiert. Anschließend wurde auf CD8α<sup>+</sup> T-Zellen die Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 analysiert. Unstimulierte T-Zellen sind als grau gefülltes Histogramm dargestellt. Es sind ein repräsentatives bzw. die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, mit \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001, ns: nicht signifikant.

Da IL-2 über den IL-2R (CD25) von T-Zellen erkannt wird, schien IL-2 also an den gering exprimierten Mengen von CD25 auf den mit HSCs kokultivierten αCD3/28-stimulierten T-Zellen anzugreifen. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob CD54 die Expression von CD25 herunterreguliert, um somit die IL-2-Signale zu reduzieren. Hierfür wurde die CD25-Expression von T-Zellen nach Kokultur mit CD54<sup>-/-</sup> bzw. CD54<sup>+/+</sup> HSCs und αCD3/28-Stimulation betrachtet. Wie bereits beschrieben, wiesen T-Zellen auf Wildtyp HSCs nur eine geringe Expression an CD25 auf (**Abb. 20c**). Hingegen zeigte sich ein komplett anderes Bild nach der Kokultur mit CD54<sup>-/-</sup> HSCs:

eine signifikante Hochregulation von CD25. Mechanistisch betrachtet, scheint so die CD54-Expression auf HSCs die Expressionsmengen von CD25 auf T-Zellen zu beeinflussen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von CD54 auf Veto-Zellen, wie z.B. HSCs, eine Auto-Kostimulation von T-Zellen durch IL-2 verhindert. Dies wird erreicht, indem die Expression von CD25 auf niedrigem Level gehalten wird.

---

## 5. DISKUSSION

### 5.1 HSCs besitzen eine starke Veto-Funktion und sind nur schwache APCs

Die Leber liefert einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. So begünstigen viele verschiedene hepatische Zellpopulationen eher eine Induktion der T-Zell-Toleranz als die Entstehung von T-Zell-Immunität in der Leber. Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen sind hierbei völlig unterschiedlich und reichen von der klonalen Deletion über die Induktion von Anergie bzw. die Generierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen bis hin zur Defunktionalisierung von hepatischen DCs (Thomson and Knolle, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen (HSCs) mit einem neuen Mechanismus zur lokalen Immunregulation in der Leber beitragen: dem HSC-Veto-Effekt. Hierbei verhindern HSCs durch eine CD54-abhängige direkte Interferenz mit der T-Zell-Aktivierung effizient das immunogene Priming von CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

HSCs sind hauptsächlich für ihre Bedeutung bei der Entstehung von Fibrose (Friedman, 2008b) und für ihren Beitrag zur lokalen Induktion einer T-Zell-Immunität durch die Antigenpräsentation zu CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bekannt (Winau et al., 2007). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob HSCs auch T-Zell-Antworten kontrollieren können und somit ebenfalls immunregulatorische Eigenschaften besitzen. Hierfür wurde die Bedeutung von HSCs während der Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch andere Antigen-präsentierende Zellen (APCs) untersucht.

Um hierbei eindeutig zwischen einer HSC-vermittelten inhibitorischen Funktion und der eigenen Antigen-präsentierenden Funktion von HSCs differenzieren zu können, wurden HSCs aus B6.CH-2<sup>bm1</sup> bzw. H-2<sup>d</sup> Mäusen isoliert. Die DCs hingegen stammten aus H-2<sup>b</sup> Mäusen. Demnach konnte gewährleistet werden, dass H2-K<sup>b</sup>-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen ihr spezifisches Antigen nur auf DCs erkennen konnten.

Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Anwesenheit von HSCs nicht mehr durch Antigen-präsentierende DCs aktiviert wurden. Diese Inhibition der T-Zell-Aktivierung trat sowohl bei der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen, aber auch bei der Präsentation von endogenen Peptiden bzw. Peptid-beladenen MHC-I-Molekülen auf. Auf diese Weise konnte eindeutig ausgeschlossen werden, dass der HSC-vermittelte inhibitorische Effekt auf einer beeinträchtigten Antigenprozessierung in DCs basierte. Ein weiterer Hinweis dafür, dass nicht eine veränderte APC-Funktion

der Antigen-präsentierenden DCs Grundlage für den regulatorischen Effekt war, zeigt sich darin, dass im Gegensatz zu naiven T-Zellen voraktivierte T-Zellen nicht durch HSCs in ihrer Aktivierung inhibiert wurden.

Um abschließend zu klären, ob der HSC-Veto-Effekt die T-Zell-Aktivierung direkt beeinträchtigt oder indirekt, über die APC-Funktion von DCs, wurden DCs gegen artifizielle APCs ausgetauscht. Solche artifiziellen APCs bestehen aus  $\alpha$ CD3/28-beschichteten Partikeln und führen somit zu einer direkten T-Zell-Aktivierung. Überraschenderweise konnten HSCs selbst diese T-Zell-Stimulation und sogar die noch wesentlich stärkere Aktivierung mittels PMA/Ionomycin unterdrücken. Diese Befunde zeigen eindeutig, dass HSCs eine direkte Wirkung auf T-Zellen ausüben können. Besonders beeindruckend ist, dass selbst ein starker Stimulus im distalen T-Zell-Signalweg, wie er durch die Behandlung mit PMA/Ionomycin erreicht wird, völlig aufgehoben werden kann. Dies unterstreicht in besonderem Maße die Stärke des HSC-Veto-Effektes.

Da es sich bei HSCs bewiesenermaßen um stark immunsuppressive Zellen handelt, stellte sich nun jedoch die Frage, inwieweit ihre Eigenschaft als Veto-Zelle dann in Konkurrenz bzw. Widerspruch zu ihrer eigenen APC-Funktion steht. Im Prinzip können HSCs als APCs für CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und natürliche Killer T-Zellen agieren (Winau et al., 2007). Eine potente Eigenschaft als professionelle APC würde jedoch den lokalen immunsuppressiven Effekt der HSC-Veto-Funktion gänzlich aufheben. Allerdings ist hierbei unklar, wie effizient die HSCs im Vergleich zu anderen hepatischen Zellen als APCs fungieren. Dies ist von besonderem Interesse, da sie sich in dem Raum von Dissé befinden und somit in direkter Nachbarschaft zu den sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSECs), die eine gut charakterisierte Population an potenten Leber-residenten APCs darstellen (Limmer et al., 2000).

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Mäuse mit Fluorochrom-konjugiertem bzw. reinem OVA injiziert und anschließend HSCs und LSECs isoliert. Unter diesen Bedingungen der direkten *in vivo* Konkurrenz waren HSCs weniger effizient in der Aufnahme von zirkulierendem Antigen aus dem Blut als LSECs (Schildberg et al., 2011). Nur DCs besitzen die Fähigkeit sogar dann als APCs zu fungieren, nachdem sie nur kleine Antigenmengen aufgenommen haben. Sie benutzen die Rezeptor-vermittelte Endozytose zur Aufnahme von Antigenen in intrazelluläre Kompartimente. Diese zellulären Strukturen sind auf die Kreuzpräsentation spezialisiert; in Kombination mit



einer Antigen-Persistenz in diesen Kompartimenten führen sie zu einer effizienten und verlängerten Antigenpräsentation (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2008). Andere Zellen, wie etwa Makrophagen oder LSECs, müssen mehr Antigen aufnehmen, um es in ähnlicher Weise kreuzpräsentieren zu können (Kamphorst et al., 2010; Schurich et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass, verglichen mit DCs, die Antigenprozessierung in diesen Zellen weniger effizient ist, jedoch durch eine erhöhte Antigenaufnahme kompensiert wird.

Deshalb wurde als nächstes die relative Effizienz von HSCs zur Kreuzpräsentation von Antigen an CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Hier zeigte sich eindeutig, dass HSCs auch in der Kreuzpräsentation nach *in vivo* Aufnahme von zirkulierendem Antigen erneut den LSECs unterlegen waren (Schildberg et al., 2011). Diese Ergebnisse bescheinigen, dass HSCs nicht über eine mit DCs vergleichbare Fähigkeit zur Antigenprozessierung verfügen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass nachgeschaltete zelluläre Mechanismen, wie etwa die Peptidprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum, die APC-Funktion verbessern, wenn in HSCs bereits die Antigenaufnahme ineffizient ist.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie konnte ebenfalls zeigen, dass primäre HSCs, wenn überhaupt, selbst nach Stimulation mit exogenem IFN- $\gamma$  nur eine geringe APC-Funktion für CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzen (Ichikawa et al., 2011). Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse eine Hierarchie in der Kapazität der APC-Funktion: DCs sind am effizientesten in der Antigenprozessierung, Makrophagen und LSECs kompensieren eine ineffiziente Antigenprozessierung durch eine hohe Antigenaufnahme und HSCs zeigen sowohl eine geringe Antigenaufnahme als auch eine ineffiziente Antigenprozessierung (Schildberg et al., 2011).

Somit stellen diese Daten eine prominente Rolle für HSCs als Leber-residente APCs zweifelsfrei infrage. Diese Ergebnisse sollen zwar nicht abstreiten, dass HSCs in der Lage sind als APCs zu agieren, dennoch handelt es sich hierbei um eine eher untergeordnete Rolle. Eine derart mäßige Aktivität als APC steht somit auch nicht in Widerspruch zu der Veto-Funktion von HSCs. Demzufolge handelt es sich bei HSCs um Leberzellen, die als schwach immunogene APCs, vereint mit einem starken immunregulatorischen Effekt, in der Summe das tolerogene Umfeld der Leber mitgestalten. Insgesamt konnte durch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass auch HSCs als eine weitere tolerogene Zellpopulation zur lokalen Immunregulation in der Leber beitragen.

## 5.2 Veto-Effekt ist eventuell ein Charakteristikum von mesenchymalen Zellen

Somit reihen sich HSCs in eine lange Liste an tolerogenen gewebsständigen Zellen ein, welche über unterschiedliche Mechanismen ihre inhibitorischen Wirkungen vermitteln. Interessanterweise konnten jenseits der Leber ähnliche immunsuppressive Effekte wie bei dem HSC-Veto-Effekt beobachtet werden. Unter mehreren Bedingungen wurde auch bei mesenchymalen Stammzellen (MSCs; *engl.*: mesenchymal stem cell) aus dem Knochenmark eine Inhibition der Proliferation von T-Zellen sowie der Entstehung von Effektorfunktionen beobachtet (Keating, 2006; Le Blanc and Ringden, 2007). So konnte unter Zuhilfenahme von der immunsuppressiven Kapazität von MSCs erfolgreich eine immunvermittelte Schädigung im Tiermodell verhindert werden (Le Blanc and Ringden, 2007). Noch beeindruckender konnte das Potenzial dieser zellvermittelten Immunsuppression durch die Behandlung eines an Graft-versus-host-disease (*engl. für*: Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) erkrankten Patienten mithilfe eines Knochenmark-Transplantates demonstriert werden (Le Blanc et al., 2004).

Obwohl in verschiedenen Studien ähnliche Phänomene festgestellt wurden, so scheinen sich die ursächlichen molekularen Mechanismen dieser inhibitorischen Funktionen deutlich voneinander zu unterscheiden. Bereits die Verwendung von unterschiedlich hergestellten MSCs bzw. der Vergleich von humanen und murinen MSCs führte zu fraglichen Resultaten. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass sowohl lösliche immunregulatorische Moleküle wie IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , NO oder Prostanoiden (Di Nicola et al., 2002; Djouad et al., 2007; Klyushnenkova et al., 2005; Le Blanc et al., 2003; Rasmusson et al., 2005; Sato et al., 2007), Tryptophandegradation durch Indolamin 2,3-Dioxygenase (Meisel et al., 2004) als auch direkter physikalischer Kontakt (Beyth et al., 2005; Krampera et al., 2003; Potian et al., 2003) als Ursache für die Inhibition der T-Zell-Aktivierung dargestellt werden. Selbst die Bewertung der MSC-vermittelten Immunregulation aus funktioneller Perspektive führte in mehreren Studien zu völlig unterschiedlichen Erklärungsansätzen: So wurde angenommen, dass MSCs entweder die T-Zell-Proliferation hemmen, die Interaktion zwischen T-Zellen und APCs behindern oder etwa regulatorische APCs generieren, welche zur Inhibition der T-Zell-Funktion führen (Beyth et al., 2005; Jones et al., 2007; Krampera et al., 2003).

Jedoch besitzen nicht nur HSCs und MSCs die Fähigkeit als inhibitorische Zellen zu agieren, auch Fibroblasten zeigen solche Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit konnte der an HSCs beschriebene Veto-Effekt auch für Fibroblasten aus der Niere bestätigt werden. Diese Daten stehen in Einklang mit einer Studie, in der gezeigt wurde, dass der beschriebene suppressive Effekt nicht auf MSCs begrenzt ist, sondern dass es sich hierbei um eine generelle Eigenschaft von Stromazellen handelt (Jones et al., 2007). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Stromazellen aus unterschiedlichen Organen inflammatorische Prozesse im Gewebe regulieren können. Eine solche Regulation ist hierbei nicht auf bestimmte Organsysteme beschränkt. So konnte sogar gezeigt werden, dass Stromazellen einen essentiellen Beitrag für die Toleranzinduktion im Thymus leisten (Kyewski and Klein, 2006). Stromazellen spielen aber auch in sekundären lymphatischen Geweben eine entscheidende Rolle: Einerseits induzieren Stromazellen hier regulatorische DCs, welche dann NO-vermittelt die Proliferation von T-Zellen regulieren (Zhang et al., 2004). Andererseits kontrollieren Stromazellen über eine direkte Zell-Interaktion den T-Zell-Pool aber auch unmittelbar (Lukacs-Kornek et al., 2011).

Vergleichbar mit der Funktion der bisher beschriebenen Stromazellen konnte in einer früheren Untersuchung herausgearbeitet werden, dass auch sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSECs) eine immunregulatorische Funktion besitzen (Schildberg et al., 2008). Hierbei zeigte sich, dass LSECs naive T-Zellen sowohl indirekt, über eine Beeinträchtigung der APC-Funktion von DCs, als auch direkt inhibieren können. Somit scheinen LSECs zusammen mit HSCs eine funktionale Barriere in der Leber zu bilden, welche die lokale Induktion von T-Zell-Immunität verhindert. Wie bereits gezeigt, sind Hepatozyten hierzu nicht in der Lage. Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich hierbei um eine Eigenschaft von Stromazellen handelt und nicht um einen generellen zellulären Effekt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehrere Stromazell-ähnliche Zellpopulationen einen immunregulatorischen Effekt ausbilden. Die spezifischen zellulären und molekularen Grundlagen differieren hierbei jedoch stark und demonstrieren, wie äußerst komplex diese Funktion zu sein scheint. Demzufolge scheint es ein schwieriges Unterfangen zu sein, einen universellen Mechanismus für alle Zelltypen zu finden, die eine solche Immunregulation vermitteln.

### 5.3 Molekularer Mechanismus: CD54 als Basis für HSC-Veto-Effekt

Spezifisch für HSCs konnte in einer früheren Untersuchung gezeigt werden, dass sie allospezifische T-Zell-Antworten in einer „mixed lymphocyte reaction“ (MLR; *engl. für*: gemischte Lymphozytenreaktion) inhibieren konnten. Diese Immunsuppression basierte auf der B7-H1-vermittelten Induktion einer Apoptose bei T-Zellen (Yu et al., 2004). Weitere molekulare Mechanismen, welche der beeinträchtigten T-Zell-Antwort zugrunde lagen, wurden in dieser Studie jedoch nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie konnte hingegen gezeigt werden, dass HSCs direkt mit der Aktivierung von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen interferieren. Eine Beteiligung von B7-H1 konnte unter Verwendung von HSCs aus B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Bei dem in dieser Arbeit beschriebenen inhibitorischen Effekt auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte auch keine Induktion von Apoptose gefunden werden. So wurde die Vitalität von T-Zellen in Kokultur mit HSCs in keinsten Weise verschlechtert. Im Gegenteil, die Anwesenheit von HSCs führte eher zu einem verlängerten Überleben von T-Zellen. Diese Unterschiede könnten daran liegen, dass Yu *et al.* die inhibitorischen Eigenschaften von HSCs in einem *in vivo* Transplantationsmodell untersucht hatten. Da hierbei, anders als in einem *in vitro* Experiment, auch unspezifische Interaktionen und sekundäre Effekte auftreten, ist ein direkter Vergleich zwischen beiden experimentellen Ansätzen schwierig.

Hingegen konnte in Übereinstimmung mit Studien aus der MSC-Forschung (Beyth et al., 2005; Krampera et al., 2003; Potian et al., 2003), auch für den HSC-Veto-Effekt die Beteiligung eines physikalischen Kontaktes beobachtet werden. Dies schließt einerseits lösliche immunregulatorische Mediatoren aus, was auch durch die Verwendung von blockierenden Antikörpern bekräftigt werden konnte. Andererseits deutet dies auf einen Mechanismus hin, der auf einem membranständigen Molekül beruht.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die beschriebene Inhibition der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung strikt von der CD54-Expression abhängt. CD54 ist bekannt als ein starkes proinflammatorisches Molekül, welches die Adhäsion von Leukozyten unter Normalzustand sowie unter inflammatorischen Bedingungen vermittelt (Wang and Springer, 1998). Daher stellt sich die Frage: Wie kann CD54 dann ebenfalls als ein wirksames immuninhibitorisches Molekül agieren? Mehrere Erklärungen sind hierbei möglich: Eine Möglichkeit wäre, dass die CD54-Expression auf HSCs, die als

---

vermittelnde Veto-Zellen wirken, zu einer Umverteilung seines Liganden LFA-1 (*engl.*: lymphocyte function-associated antigen 1) führen könnte. LFA-1 ist normalerweise für die Übertragung der Signale vom T-Zell-Rezeptor verantwortlich (Perez et al., 2003). Eine Umverteilung von LFA-1 weg von den T-Zell-Rezeptoren, welche mit Peptid-beladenen MHC-Molekülen auf APCs interagieren, würde letztendlich zu einem Ausbleiben der Aktivierung bei T-Zellen führen. Diese Annahme wird ebenfalls durch folgende Beobachtungen unterstützt: Erstens machen T-Zellen in der Kokultur mit HSCs eine schwache initiale Stimulation durch, was sich durch eine Hochregulation von dem Aktivierungsmarker CD69 und der Freisetzung von kleinen Zytokinmengen zeigt. Zweitens sind T-Zellen in einer Kokultur mit HSCs schlussendlich jedoch nicht ausreichend stimuliert, um in den Zellzyklus bzw. in ein Programm zur Differenzierung in Effektorzellen einzutreten.

Eine weitere Möglichkeit, weshalb die Expression von CD54 auch immunregulatorisch wirken könnte, wäre das Herstellen einer engen physikalischen Interaktion zwischen HSCs und den jeweiligen T-Zellen durch CD54. Dies könnte inhibitorische Mediatoren mit einer auf Kurzstrecken begrenzten biologischen Aktivität dazu verhelfen ihre regulatorische Funktion unter diesen Bedingungen zur Geltung zu bringen. Allerdings konnten keine Hinweise für eine Beteiligung von klassischen immunregulatorischen Molekülen wie IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  oder Retinsäure gefunden werden. Die engen physikalischen Interaktionen zwischen HSCs und T-Zellen könnten jedoch auch den Austausch von regulatorischen Molekülen über Nanotubes bzw. Exosomen ermöglichen. Ein solcher Vorgang wurde erst kürzlich für regulatorische T-Zellen bei der Suppression der Funktion von DCs beschrieben (Bopp et al., 2007).

Ein gemeinsames Charakteristikum von all diesen Erklärungsansätzen für die immunregulatorische Funktion von CD54 ist, dass CD54 nicht auf der Zelle exprimiert wird, welche auch das Antigen für die T-Zelle präsentiert. In anderen Worten, die CD54-Expression in *trans* scheint immunregulatorische Effekte zu haben, hingegen fördert die Expression von CD54 in *cis* die Ausbildung einer T-Zell-Immunität. Diese Dichotomie kann die scheinbar widersprüchlichen Funktionen von CD54 erklären, welche sowohl eine Inflammation bzw. T-Zell-Immunität begünstigen, aber auch die Hemmung der T-Zell-Aktivierung fördern.

#### 5.4 Weitere mögliche sekundäre Mechanismen der Veto-Funktion

Die hier beschriebene vermittelnde Veto-Funktion von HSCs stellt eine neue Form der Immunregulation dar, die bisher noch nicht beschrieben wurde. Dieser Effekt unterscheidet sich deutlich von der klonalen Deletion von bereits aktivierten T-Zellen durch HSCs, wie in früheren Veröffentlichungen gezeigt werden konnte (Yu et al., 2004). Darüber hinaus ist diese Form der Immunregulation nicht abhängig von löslichen inhibitorischen Molekülen wie IL-10 oder TGF- $\beta$ . Allerdings ähnelt die Veto-Funktion einer T-Zell-Anergie, die durch eine unvollständige Stimulation mit APCs ausgelöst wird (Schwartz, 2003). Die Entstehung der HSC-Veto-Funktion ist hingegen bestimmt durch eine anfängliche gegenseitige Interaktion zwischen HSCs und T-Zellen, welche durch APCs stimuliert werden. Diese Wechselwirkung resultiert schließlich in T-Zellen, deren Proliferation bzw. Eintritt in ein Programm zur Differenzierung komplett inhibiert wurden.

Erste Ansätze einer solchen Wechselwirkung wurden in einer früheren Studie berichtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  bei HSCs zu einer deutlich verstärkten Expression von B7-H1 führt. Die erhöhte B7-H1-Expression auf den HSCs konnte in dieser Studie Transplantate aus Pankreasinseln gegenüber einer T-Zell-vermittelten Abstoßung schützen (Yang et al., 2009). In eigenen Experimenten konnte auch ein Beitrag von IFN- $\gamma$  bei der Regulation von CD54 auf HSCs und folglich auf die Veto-Funktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten sind konsistent mit einem generellen Beitrag von IFN- $\gamma$  auf die immunregulatorische Kapazität von HSCs. Wie bereits beschrieben, konnte hingegen für das Adhäsionsmolekül CD106 keine entscheidende Rolle in dem HSC-Veto-Effekt beobachtet werden. Allenfalls ist der Beitrag von CD106 von untergeordneter Relevanz. Weshalb sich CD54 und CD106 hier so unterschiedlich verhalten, darüber lässt sich mit dem gegenwärtigen Kenntnisstand nur spekulieren. So könnte etwa die Bindung von CD54 und seinem Liganden auf T-Zellen von größerer funktioneller Bedeutung sein als bei CD106.

Eindeutig ist an dieser Stelle jedenfalls, dass der HSC-Veto-Effekt auf physikalischem Kontakt basiert. Neben CD54 könnten somit auch andere membranständige Moleküle einen Einfluss auf die regulatorische Funktion haben. Eine mögliche Molekülklasse, die in dem hier verwendeten Modell relevant sein könnte, ist die Siglec-Familie (Crocker et al., 2007; Pillai et al., 2011). Die Siglec-Subtypen regulieren auf unterschiedlichste

Weise das Immunsystem und sind sowohl auf Immunzellen als auch auf Stromazellen exprimiert. Jedoch konnte in ersten Experimenten, in denen versucht wurde Siglecs zu blockieren, keine Beteiligung dieser Molekülklasse gefunden werden. Dennoch bedarf diese Fragestellung weiterer Experimente zur abschließenden Beurteilung.

Der Bedarf an zellulärer Nähe könnte aber auch bedeuten, dass die Zelloberflächen um Faktoren konkurrieren, welche für die Proliferation von T-Zellen wichtig sind. Eine Möglichkeit wäre, dass sowohl HSCs als auch T-Zellen versuchen IL-2 zu binden und demzufolge eine Art Wettstreit entsteht. IL-2 ist insbesondere aufgrund seiner zentralen Rolle in dem hier vorgestellten Phänomen ein interessanter Kandidat: Erstens kann der HSC-Veto-Effekt, ähnlich wie die T-Zell-Anergie, durch exogenes IL-2 aufgehoben werden. Zweitens ist IL-2 auch zur Proliferation von aktivierten T-Zellen nötig (Feau et al., 2011). Ein vergleichbarer Mechanismus wurde auch für die Konkurrenz von regulatorischen T-Zellen um IL-2 berichtet (Scheffold et al., 2005). Jedoch konnte nicht nur bei der Expansion von T-Zellen, sondern auch bereits bei deren Aktivierung eine signifikante Inhibition durch HSCs beobachtet werden. Auch wenn die bedeutsame Rolle von IL-2 sicher nicht von der Hand zu weisen ist, benötigen T-Zellen während des Primings nicht unbedingt dieses Zytokin (D'Souza and Lefrancois, 2003; Feau et al., 2011). Somit scheint eine Konkurrenz von HSCs und T-Zellen um IL-2 und dessen folgerichtiger Entzug auf T-Zell-Seite zumindest nicht die alleinige Erklärung zu sein.

Wie erwähnt, könnte die enge physikalische Interaktion zwischen HSCs und T-Zellen jedoch auch den Austausch von immunregulatorischen Molekülen über Nanoporen bzw. Exosomen ermöglichen. Eine solche Funktion konnte bereits anhand einer Inhibition der DC-Funktion durch regulatorische T-Zellen demonstriert werden (Bopp et al., 2007). Nanoporen könnten somit durch den Transfer von kleinen immunsuppressiven Molekülen in die T-Zellen zu deren Suppression führen. Geeignete Kandidaten für solche transferierbare Regulatoren wären z.B. cAMP und Adenosin (Bopp et al., 2007; Linnemann et al., 2009).

Exosomen können ebenfalls mit inhibitorischen Molekülen beladen werden. Hierbei handelt es sich um kleine Membranvesikel, welche von nahezu allen Körperzellen abgegeben werden können (Bobrie et al., 2011; Pant et al., 2011). Interessanterweise ist auch beschrieben, dass Exosomen das für den Veto-Effekt essentielle Molekül CD54 auf ihrer Oberfläche tragen und somit zielgerichtet mit T-Zellen interagieren können

---

(Nolte-'t Hoen et al., 2009). Exosomen enthalten darüber hinaus auch miRNA (Pant et al., 2011). Über den Transfer von miRNA auf T-Zellen wäre somit eine Interferenz mit der T-Zell-Aktivierung auf Transkriptionsebene möglich.

Zusammengefasst, ist bei dem HSC-Veto-Effekt neben anderen Mechanismen auch z.B. ein Transfer von inhibitorischen Molekülen zwischen HSCs und T-Zellen denkbar. Die entscheidende Basis für solche sekundäre Mechanismen ist aber auch hier die möglichst enge Interaktion der beiden Zelltypen.

### **5.5 Relevanz und Regulation des Veto-Effektes *in vivo***

Funktionell betrachtet, schreibt der Veto-Effekt den HSCs eine Art „Pfortnerfunktion“ für das hepatische parenchymale Gewebe zu. Aufgrund ihrer schwachen APC-Funktion und der gleichzeitigen immunsuppressiven Eigenschaften sind HSCs eine wichtige Zellpopulation bei der Induktion lokaler Toleranz in der Leber. Da naive T-Zellen eine erhebliche Population in der Leber darstellen (Cose et al., 2006) und DCs in den Raum von Dissé in Richtung Portalfeld wandern (Matsuno et al., 1996), besetzen HSCs offenbar eine strategische Position, um mit der Aktivierung von naiven T-Zellen durch hepatische DCs zu interferieren. So bilden HSCs zusammen mit LSECs eine nicht nur regional, sondern auch funktional optimal positionierte Barriere. Beide Zelltypen sind in der Lage, die Aktivierung von T-Zellen zu unterdrücken und daher die Parenchymzellen der Leber gegenüber inflammatorischen Prozessen zu schützen. Allerdings scheinen HSCs nicht die tolerogene *in vivo* Antigenpräsentation durch LSECs zu beeinflussen, da die Kreuzpräsentation durch LSECs in einer Rekrutierung von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Leber resultiert (von Oppen et al., 2009). Somit interferieren HSCs mit der immunogenen Antigenpräsentation in der Leber, hingegen nicht mit der tolerogenen. Da HSCs von LSEC-interagierenden T-Zellen räumlich getrennt sind, könnte dies auch ein Grund für den fehlenden immunregulatorischen Effekt von HSCs auf LSEC-stimulierte T-Zellen sein.

Persistierende hepatische Inflammationen werden von der Entwicklung einer Fibrose begleitet. Diese fibrotischen Veränderungen wiederum sind durch die Aktivierung und Proliferation von HSCs verursacht, welche zu Myofibroblasten differenzieren und extrazelluläre Matrix produzieren (Friedman, 2008b). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist es diese Aktivierung, gefolgt von einer gesteigerten

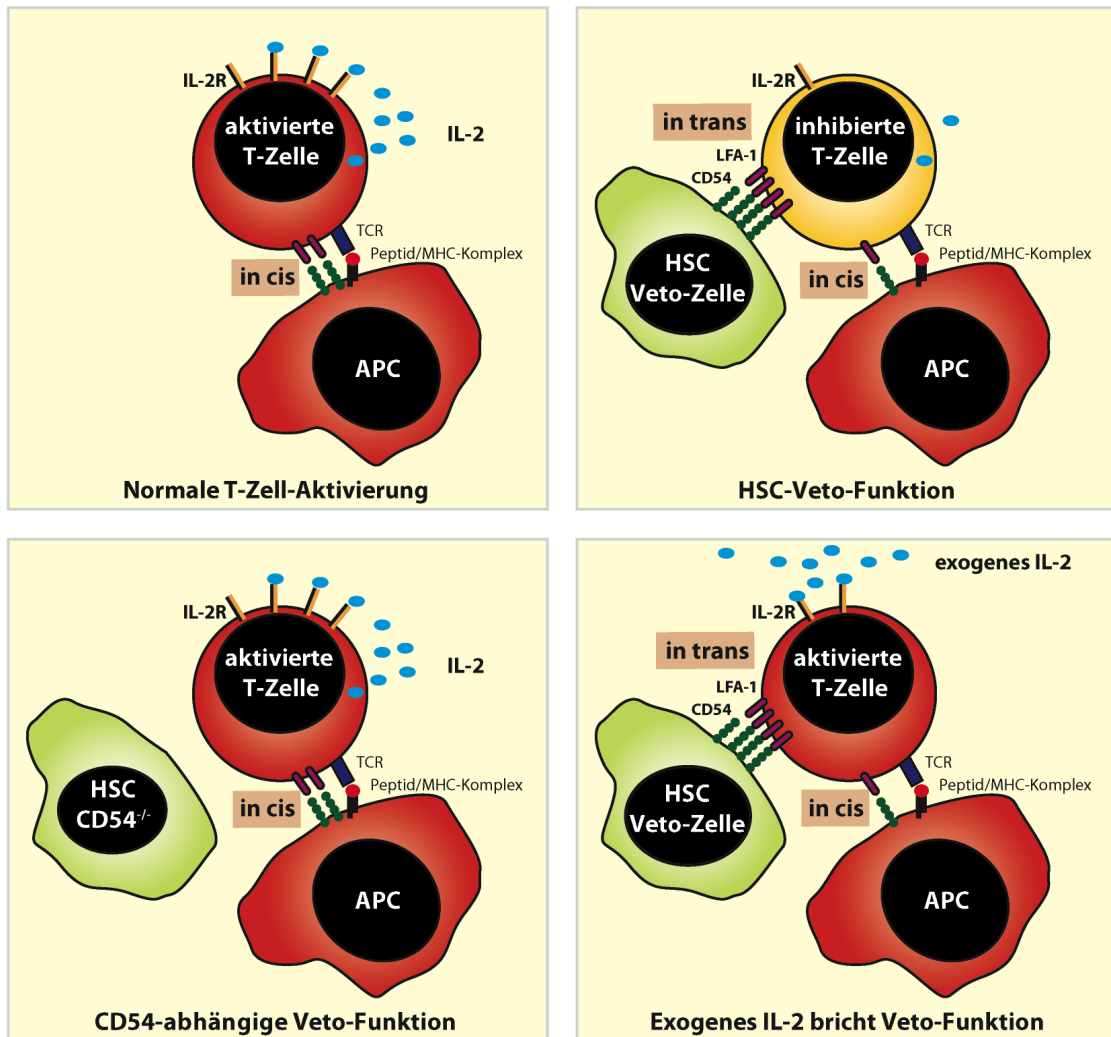


Expression von CD54 (Hellerbrand et al., 1996), welche die Fähigkeit von HSCs erhöht als vermittelnde Veto-Zellen zu funktionieren. Daher ist es wahrscheinlich, dass die erhöhte CD54-Expression auf HSCs vor einer selbst-amplifizierenden Rückkopplungsschleife schützt, in der eine Inflammation eine weitere lokale T-Zell-Stimulation und Expansion antreibt. Eine solche Rückkopplung würde zu einer Verschlimmerung der lokalen Inflammation und zu einem verstärkten fibrotischen Prozess führen.

Interessanterweise zeigen Hepatozyten keinen Veto-Effekt auf die T-Zell-Aktivierung, obwohl sie geringe Mengen von CD54 exprimieren. Offenbar verfügen Hepatozyten über andere Mechanismen der aktiven Regulation der Aktivierung von T-Zellen, wie z.B. der Induktion klonaler Deletion nach Antigenpräsentation oder der suizidalen Emperipolese (Benseler et al., 2011). Dies spiegelt eine besondere Rolle für HSCs bei der Inhibition der T-Zell-Stimulation wider.

Darüber hinaus konnte mithilfe einer neuen durchflusszytometrischen Partikel-basierten Kalibrationsmethode zum ersten Mal die absolute Anzahl an CD54-Molekülen pro Leberzelle quantifiziert werden. Diese quantitative Methode bestätigte zum einen die geringe CD54-Expression auf Hepatozyten, zum anderen demonstrierte sie aber auch, dass bereits eine Verdopplung der CD54-Expression zu einer starken Zunahme der HSC-vermittelten Immunsuppression führte. Somit deuten diese Daten darauf hin, dass CD54 seine inhibitorischen Effekte nur dann ausüben kann, wenn seine Expression über einem definierten absoluten Niveau liegen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD54 einen physikalischen Kontakt zwischen HSCs und T-Zellen vermittelt, welcher Bedingung für die HSC-vermittelte Suppression ist. Demzufolge resultiert eine erhöhte Expression von CD54 in einer verstärkten Veto-Funktion bei HSCs. Zur besseren Veranschaulichung sind diese grundlegenden molekularen Mechanismen des HSC-Veto-Effektes in Abbildung 21 dargestellt.

Auch mit Blick auf andere Gebiete der Medizin zeigen diese Daten, dass aufgrund einer absoluten Quantifizierung von Molekülen auf der Zelloberfläche Schwellenwerte für bestimmte zelluläre Funktionen definiert werden können. So ermöglicht diese Herangehensweise es nachzuvollziehen, welche Oberflächenmoleküle in welcher absoluten Menge für eine bestimmte Funktion vorliegen müssen.



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der HSC-vermittelten Veto-Funktion zur Inhibition der naiven T-Zell-Aktivierung.

Bemerkenswerterweise kann exogenes IL-2 auch den HSC-induzierten Veto-Effekt auf die Stimulation von T-Zellen überwinden, ähnlich wie die T-Zell-Anergie durch exogenes IL-2 gebrochen werden kann (Schwartz, 2003). Dieses Ergebnis impliziert, dass die lokale IL-2-Freisetzung von Gedächtnis- oder vorher aktivierten T-Zellen den vermittelnden Veto-Effekt von HSCs brechen kann. Zur Unterstützung dieses Ansatzes konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich eine T-Zell-Immunität in der Leber entwickelte, wenn Tiere kurz vor dem Experiment vakziniert wurden. Hierbei führte die zeitlich abgestimmte Vakzinierung zu einer hepatischen Akkumulation von T-Zellen, welche in der Lage waren, lokal IL-2 freizusetzen (Dikopoulos et al., 2004).

Dass der HSC-Veto-Effekt, der sich gegenüber anderen proinflammatorischen Stimuli recht robust zeigt, durch IL-2 gebrochen werden kann, passt gut zu dem gegenwärtigen Stand in der Literatur: Auch die LSEC-induzierte Toleranz wird durch exogenes IL-2

---

überwunden (Schurich et al., 2010). Demzufolge können unter hohen Konzentrationen an IL-2 generell die lokalen tolerogenen Mechanismen in der Leber gebrochen werden. Hierfür würde eine hepatische Infiltration mit einer größeren Anzahl an aktivierten CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausreichen, wie sie während einer chronischen Inflammation zusammen mit einer persistierenden viralen Infektion durchaus beobachtet werden kann (Heydtmann and Adams, 2009).

Demzufolge handelt es sich bei dem HSC-Veto-Effekt um einen immunregulatorischen Mechanismus, der ähnlich wie Antigen-abhängige toleranzinduzierende Mechanismen durch IL-2 reguliert wird. Dass die HSC-Veto-Funktion durch IL-2 gebrochen werden kann und z.B. auch aktivierte Zellen nicht supprimiert werden, macht systemisch gesehen durchaus großen Sinn: Sobald also eine kritische Anzahl an Effektor T-Zellen in der Leber existiert, wird die inhibitorische Funktion abgeschaltet und ausschließlich die immunologische Kontrolle der Leber durch residente DCs aufrechterhalten. Demzufolge wird garantiert, dass die Leber neben ihrer Aufgabe zur Toleranzinduktion auch eine immunologische Abwehr gegenüber Pathogenen leisten kann.

Insgesamt unterstützen die hier präsentierten Ergebnisse die Existenz einer funktionalen Barriere in der Leber: Sinusoidale Zellen, insbesondere HSCs und LSECs, inhibieren die lokale Stimulation von T-Zellen durch entweder direkte Hemmung der T-Zell-Aktivierung oder durch das Beeinträchtigen der DC-Funktion. Dies trifft für Hepatozyten nicht zu. Diese Barriere könnte die lokale Induktion von T-Zell-Immunität in der entzündeten Leber verhindern. Damit würde Autoimmunität verhindert und eine exzessive selbstverstärkende T-Zell-vermittelte Inflammation in der hepatischen Fibrose abgemildert werden. Allerdings lässt diese Barriere die wichtigen angeborenen Immunfunktionen der Leber unverändert, welche die Ausdehnung von infektiösen Mikroorganismen kontrollieren (Gao et al., 2008). Interessanterweise kann diese Barriere durch exogenes IL-2 aufgehoben werden, welches als therapeutisches Prinzip das Potential hätte, die lokalen tolerogenen Mechanismen außer Kraft zu setzen. Dies könnte während vieler persistierender viraler Infektionen oder in Patienten mit hepatozellulärem Karzinom zu einer Verstärkung der T-Zell-Immunität verwendet werden.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1998). Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 282, 1338-1341.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine* 199, 1401-1408.
- Arnold, B. (2002). Levels of peripheral T cell tolerance. *Transpl Immunol* 10, 109-114.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Benseler, V., Warren, A., Vo, M., Holz, L.E., Tay, S.S., Le Couteur, D.G., Breen, E., Allison, A.C., van Rooijen, N., McGuffog, C., *et al.* (2011). Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16735-16740.
- Bertolino, P., McCaughan, G.W., and Bowen, D.G. (2002). Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 80, 84-92.
- Betelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Betelli, 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. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* 117, 2233-2238.
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105, 2214-2219.
- Bissell, D.M., Wang, S.S., Jarnagin, W.R., and Roll, F.J. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 96, 447-455.
- Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 72, 441-455.
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 12, 1659-1668.
- Boeckx, W., Sobis, H., Lacquet, A., Gruwez, J., and Vandeputte, M. (1975). Prolongation of allogeneic heart graft survival in the rat after implantation on portal vein. *Transplantation* 19, 145-149.
- 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.

- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmethofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., *et al.* (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1303-1310.
- Braet, F., and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 1, 1.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.
- Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R., and Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nature immunology* 9, 558-566.
- Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Ashby, B.S., Herbertson, B.M., Millard, P.R., and Davis, D.R. (1969). Toleragenic effects of porcine liver allografts. *Br J Surg* 56, 692-693.
- 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. *Annual review of immunology* 20, 29-53.
- Chen, C.H., Kuo, L.M., Chang, Y., Wu, W., Goldbach, C., Ross, M.A., Stolz, D.B., Chen, L., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2006). In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 44, 1171-1181.
- Clarke, S.R., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunology and cell biology* 78, 110-117.
- Cose, S., Brammer, C., Khanna, K.M., Masopust, D., and Lefrancois, L. (2006). Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *European journal of immunology* 36, 1423-1433.
- 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.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7, 255-266.
- Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., and Mescher, M.F. (2005). Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174, 4465-4469.
- D'Souza, W.N., and Lefrancois, L. (2003). IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* 171, 5727-5735.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193, 233-238.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.

- 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.
- Dikopoulos, N., Wegenka, U., Kroger, A., Hauser, H., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (2004). Recently primed CD8+ T cells entering the liver induce hepatocytes to interact with naive CD8+ T cells in the mouse. *Hepatology* 39, 1256-1266.
- Djouad, F., Charbonnier, L.M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., and Noel, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25, 2025-2032.
- Endl, E., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257, 231-237.
- Feau, S., Arens, R., Togher, S., and Schoenberger, S.P. (2011). Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nature immunology* 12, 908-913.
- Fey, G.H., Hattori, M., Northemann, W., Abraham, L.J., Baumann, M., Braciak, T.A., Fletcher, R.G., Gauldie, J., Lee, F., and Reymond, M.F. (1989). Regulation of rat liver acute phase genes by interleukin-6 and production of hepatocyte stimulating factors by rat hepatoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 557, 317-329; discussion 329-331.
- Filice, G.A. (1988). Antimicrobial properties of Kupffer cells. *Infect Immun* 56, 1430-1435.
- Friedman, S.L. (2008a). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88, 125-172.
- Friedman, S.L. (2008b). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134, 1655-1669.
- Gallucci, S., and Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13, 114-119.
- Gao, B., Jeong, W.I., and Tian, Z. (2008). Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47, 729-736.
- Germain, R.N. (2001). The art of the probable: system control in the adaptive immune system. *Science* 293, 240-245.
- Gett, A.V., and Hodgkin, P.D. (1998). Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9488-9493.
- Gett, A.V., and Hodgkin, P.D. (2000). A cellular calculus for signal integration by T cells. *Nat Immunol* 1, 239-244.
- Goddard, S., Youster, J., Morgan, E., and Adams, D.H. (2004). Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *The American journal of pathology* 164, 511-519.
- Godfrey, D.I., and Kronenberg, M. (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114, 1379-1388.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Guermonez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.

- Hamilton-Williams, E.E., Lang, A., Benke, D., Davey, G.M., Wiesmuller, K.H., and Kurts, C. (2005). Cutting edge: TLR ligands are not sufficient to break cross-tolerance to self-antigens. *Journal of immunology* *174*, 1159-1163.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* *19*, 47-64.
- Hellerbrand, Wang, S.C., Tsukamoto, H., Brenner, D.A., and Rippe, R.A. (1996). Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* *24*, 670-676.
- 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. *The Journal of experimental medicine* *194*, 707-717.
- Heydtmann, M., and Adams, D.H. (2009). Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology* *49*, 676-688.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I.N. (1994). The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* *1*, 741-749.
- Ichikawa, S., Mucida, D., Tyznik, A.J., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2011). Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *Journal of immunology* *186*, 5549-5555.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* *8*, 89-95.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* *21*, 527-538.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* *20*, 197-216.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* *165*, 302-319.
- Jones, S., Horwood, N., Cope, A., and Dazzi, F. (2007). The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* *179*, 2824-2831.
- 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. *The Journal of experimental medicine* *196*, 255-260.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., and Enk, A.H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* *22*, 394-400.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews. Immunology* *2*, 251-262.
- Kamphorst, A.O., Guermonprez, P., Dudziak, D., and Nussenzweig, M.C. (2010). Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *Journal of immunology* *185*, 3426-3435.
- Ke, Y., and Kapp, J.A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* *184*, 1179-1184.
- Keating, A. (2006). Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* *13*, 419-425.

- 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.
- Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, D.W., Deans, R.J., and McIntosh, K.R. (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* *12*, 47-57.
- Knolle, P.A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* *174*, 21-34.
- Knolle, P.A., and Limmer, A. (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., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1999). Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* *116*, 1428-1440.
- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* *101*, 3722-3729.
- Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T., and Ogawa, M. (1997). A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* *185*, 777-784.
- Kurts, C., Heath, W.R., Carbone, F.R., Allison, J., Miller, J.F., and Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* *184*, 923-930.
- Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (1998). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* *188*, 409-414.
- Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., and Klein, L. (2002). Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol* *23*, 364-371.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* *24*, 571-606.
- Lanzavecchia, A. (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* *8*, 348-354.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringden, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* *363*, 1439-1441.
- Le Blanc, K., and Ringden, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* *262*, 509-525.
- Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringden, O. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* *57*, 11-20.
- Lee, W.C., Yu, M.C., Chiang, Y.J., Wang, H.C., Lu, L., and Qian, S. (2005). Liver stellate cells suppress dendritic cells through IL-10. *Transplantation proceedings* *37*, 10-11.
- Lenardo, M., Chan, K.M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* *17*, 221-253.



- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348-1354.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hammerling, G.J. (1998). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol* 28, 2395-2406.
- Linnemann, C., Schildberg, F.A., Schurich, A., Diehl, L., Hegenbarth, S.I., Endl, E., Lacher, S., Muller, C.E., Frey, J., Simeoni, L., *et al.* (2009). Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology* 128, e728-737.
- 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.
- Lukacs-Kornek, V., Malhotra, D., Fletcher, A.L., Acton, S.E., Elpek, K.G., Tayalia, P., Collier, A.R., and Turley, S.J. (2011). Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nature immunology* 12, 1096-1104.
- 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.
- Maher, J.J. (2001). Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 21, 417-426.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2, 816-822.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S., and Uehara, Y. (1996). A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 183, 1865-1878.
- Mehal, W.Z., Azzaroli, F., and Crispe, I.N. (2001). Immunology of the healthy liver: old questions and new insights. *Gastroenterology* 120, 250-260.
- Mehal, W.Z., Juedes, A.E., and Crispe, I.N. (1999). Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 163, 3202-3210.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619-4621.
- Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Roseblatt, M., and Von Andrian, U.H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424, 88-93.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317, 256-260.
- Muddu, A.K., Guha, I.N., Elsharkawy, A.M., and Mann, D.A. (2007). Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 695-714.
- Nolan, J.P. (1981). Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology* 1, 458-465.

- Nolte-'t Hoen, E.N., Buschow, S.I., Anderton, S.M., Stoorvogel, W., and Wauben, M.H. (2009). Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* *113*, 1977-1981.
- 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.
- Okazaki, T., and Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* *27*, 195-201.
- 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.
- Paessens, L.C., Singh, S.K., Fernandes, R.J., and van Kooyk, Y. (2008). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) provide co-stimulation in positive selection along with survival of selected thymocytes. *Mol Immunol* *45*, 42-48.
- Paik, Y.H., Schwabe, R.F., Bataller, R., Russo, M.P., Jobin, C., and Brenner, D.A. (2003). Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* *37*, 1043-1055.
- Pant, S., Hilton, H., and Burczynski, M.E. (2011). The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*.
- Perez, O.D., Mitchell, D., Jager, G.C., South, S., Murriel, C., McBride, J., Herzenberg, L.A., Kinoshita, S., and Nolan, G.P. (2003). Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nature immunology* *4*, 1083-1092.
- Pillai, S., Netravali, I.A., Cariappa, A., and Mattoo, H. (2011). Siglecs and Immune Regulation. *Annual review of immunology*.
- Potian, J.A., Aviv, H., Ponzio, N.M., Harrison, J.S., and Rameshwar, P. (2003). Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* *171*, 3426-3434.
- Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., and van den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* *6*, 280-286.
- Pulendran, B., Palucka, K., and Banchereau, J. (2001). Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* *293*, 253-256.
- Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* *305*, 33-41.
- Rock, K.L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* *249*, 918-921.
- Rosette, C., Werlen, G., Daniels, M.A., Holman, P.O., Alam, S.M., Travers, P.J., Gascoigne, N.R., Palmer, E., and Jameson, S.C. (2001). The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: a revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* *15*, 59-70.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* *109*, 228-234.

- Sawitza, I., Kordes, C., Reister, S., and Haussinger, D. (2009). The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology* 50, 1617-1624.
- Scheffold, A., Huhn, J., and Hofer, T. (2005). Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol* 35, 1336-1341.
- Schildberg, F.A., Hegenbarth, S.I., Schumak, B., Scholz, K., Limmer, A., and Knolle, P.A. (2008). Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *European journal of immunology* 38, 957-967.
- Schildberg, F.A., Kurts, C., and Knolle, P.A. (2011). Prominent regulatory but weak antigen-presenting cell function of hepatic stellate cells. *Hepatology* 54, 1108.
- 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.
- Schurich, A., Berg, M., Stabenow, D., Bottcher, J., Kern, M., Schild, H.J., Kurts, C., Schuette, V., Burgdorf, S., Diehl, L., *et al.* (2010). Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of immunology* 184, 4107-4114.
- Schurich, A., Bottcher, J.P., Burgdorf, S., Penzler, P., Hegenbarth, S., Kern, M., Dolf, A., Endl, E., Schultze, J., Wiertz, E., *et al.* (2009). Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology* 50, 909-919.
- Schwartz, R.H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184, 1-8.
- Schwartz, R.H. (1997). T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9, 351-357.
- Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334.
- Schwartz, R.H. (2005). Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 6, 327-330.
- Shaw, A.S., and Dustin, M.L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6, 361-369.
- Smedsrod, B. (2004). Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol* 3 *Suppl* 1, S22.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Steffan, A.M., Gendrault, J.L., McCuskey, R.S., McCuskey, P.A., and Kirn, A. (1986). Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* 6, 830-836.
- Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772-4780.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* 21, 685-711.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M., and Germain, R.N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296, 1873-1876.
- Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2003). Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease. *Curr Mol Med* 3, 693-706.
- Thery, C., Brachet, V., Regnault, A., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Bonnerot, C., and Amigorena, S. (1998). MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is

- determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the alpha- and beta-chains. *J Immunol* *161*, 2106-2113.
- Thomson, A.W., Drakes, M.L., Zahorchak, A.F., O'Connell, P.J., Steptoe, R.J., Qian, S., and Lu, L. (1999). Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* *66*, 322-330.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews. Immunology* *10*, 753-766.
- 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. *Journal of leukocyte biology* *77*, 626-633.
- Valenzuela, J.O., Hammerbeck, C.D., and Mescher, M.F. (2005). Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol* *174*, 600-604.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* *375*, 148-151.
- van Berkel, M.E., and Oosterwegel, M.A. (2006). CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol Lett* *105*, 115-122.
- Venanzi, E.S., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Good riddance: Thymocyte clonal deletion prevents autoimmunity. *Curr Opin Immunol* *16*, 197-202.
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104-106.
- von Boehmer, H. (2007). Oral tolerance: is it all retinoic acid? *The Journal of experimental medicine* *204*, 1737-1739.
- von Oppen, N., Schurich, A., Hegenbarth, S., Stabenow, D., Tolba, R., Weiskirchen, R., Geerts, A., Kolanus, W., Knolle, P., and Diehl, L. (2009). Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology* *49*, 1664-1672.
- Walker, L.S., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* *2*, 11-19.
- Wang, J., and Springer, T.A. (1998). Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunological reviews* *163*, 197-215.
- 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.
- Winau, F., Quack, C., Darmoise, A., and Kaufmann, S.H. (2008). Starring stellate cells in liver immunology. *Current opinion in immunology* *20*, 68-74.
- 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. *Annual review of immunology* *21*, 29-70.
- Xu, H., Gonzalo, J.A., St Pierre, Y., Williams, I.R., Kupper, T.S., Cotran, R.S., Springer, T.A., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1994). Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* *180*, 95-109.

Yang, H.R., Chou, H.S., Gu, X., Wang, L., Brown, K.E., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2009). Mechanistic insights into immunomodulation by hepatic stellate cells in mice: a critical role of interferon-gamma signaling. *Hepatology* 50, 1981-1991.

Yu, M.C., Chen, C.H., Liang, X., Wang, L., Gandhi, C.R., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2004). Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 40, 1312-1321.

Zehn, D., and Bevan, M.J. (2006). T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 25, 261-270.

Zhang, M., Tang, H., Guo, Z., An, H., Zhu, X., Song, W., Guo, J., Huang, X., Chen, T., Wang, J., and Cao, X. (2004). Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 5, 1124-1133.

## 7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb 1.: Schematische Darstellung des Aufbaus eines hepatischen Sinusoids. ....	19
Abb 2.: Schematische Darstellung der Funktionen von hepatischen Sternzellen.....	22
Abb 3.: HSCs verhindern die Proliferation von naiven T-Zellen stimuliert durch Antigen-präsentierende DCs.....	48
Abb 4.: Die HSC-Veto-Funktion beeinträchtigt nicht die APC-Funktion von DCs. ....	49
Abb 5.: HSCs verhindern die Proliferation von naiven T-Zellen stimuliert durch $\alpha$ CD3/28-beschichtete Partikel.....	50
Abb 6.: Der HSC-Veto-Effekt ist vom genetischen Hintergrund unabhängig, induziert keine Apoptose und wirkt nur auf naive T-Zellen.....	51
Abb 7.: Der HSC-Veto-Effekt ist Spezies-unabhängig. ....	52
Abb 8.: HSCs reduzieren die T-Zell-Aktivierung stimuliert durch $\alpha$ CD3/28-beschichtete Partikel.....	53
Abb 9.: HSCs reduzieren die T-Zell-Aktivierung stimuliert durch PMA/Ionomycin... ..	55
Abb 10.: Hepatozyten besitzen keine Veto-Funktion. ....	56
Abb 11.: HSC-Veto-Funktion ist unabhängig von Hepatozyten und extrazellulärer Matrix. ....	57
Abb 12.: Die Inhibition der T-Zell-Proliferation korreliert mit der Aktivierung von HSCs.....	59
Abb 13.: <i>In vitro</i> sowie <i>in vivo</i> aktivierte HSCs besitzen Veto-Funktion. ....	60
Abb 14.: Die HSC-Veto-Funktion basiert auf physikalischem Kontakt. ....	61
Abb 15.: Kontakt mit lebenden HSCs ermöglicht den Veto-Effekt, immunregulatorische lösliche Moleküle nicht.....	62
Abb 16.: Die HSC-Veto-Funktion ist CD54-abhängig.....	64
Abb 17.: Der CD54-Expressionspegel entscheidet über den Veto-Effekt.....	65
Abb 18.: Überexpression von CD54 begünstigt Veto-Effekt. ....	67
Abb 19.: Die HSC-Veto-Funktion widersteht proinflammatorischen Signalen. ....	68
Abb 20.: Exogenes IL-2 bricht HSC-Veto-Funktion.....	69
Abb 21.: Schematische Darstellung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der HSC-vermittelten Veto-Funktion zur Inhibition der naiven T-Zell-Aktivierung .....	82

## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>engl.</i> : antigen presenting cell), Allophycocyanin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl.</i> : bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen ( <i>engl.</i> : cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester
DC	Dendritische Zellen ( <i>engl.</i> : dendritic cell)
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere ( <i>lat.</i> : et alteres)
FACS	Durchflusszytometer ( <i>engl.</i> : fluorescence activated cell sorter)
FB	Fibroblast
FCS	fötales Kälberserum ( <i>engl.</i> : fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyant
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
GBSS	<i>engl.</i> : Gey's Balanced Salt Solution
h	Stunde
HBSS	<i>engl.</i> : Hank's Balanced Salt Solution
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>engl.</i> : horseradish peroxidase)
HSC	hepatische Sternzelle ( <i>engl.</i> : hepatic stellate cell)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	sinusoidale Endothelzelle der Leber ( <i>engl.</i> : liver sinusoidal endothelial cell)
μ	mikro
m	milli

---

M	Molar
MACS	Magnetische Zellsortierung ( <i>engl.</i> : magnetic activated cell sorter)
MHC	Haupthistkompatibilitätskomplex ( <i>engl.</i> : major histocompatibility complex)
min	Minute
MSC	mesenchymale Stammzelle ( <i>engl.</i> : mesenchymal stem cell)
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>engl.</i> : phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>lat.</i> : potentia hydrogenii
RAG	<i>engl.</i> : recombination activating gene
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>engl.</i> : rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S8L	SIINFEKL, Ovalbumin-Peptid
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>engl.</i> : standard error of the mean)
SIINFEKL	Ovalbumin-Peptid
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>engl.</i> : T cell receptor)
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ ( <i>engl.</i> : transforming growth factor- $\beta$ )
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
U	Unit, Internationale Einheit der Enzymaktivität
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel