

**Eine neue Helfer-Funktion von T Helfer 1 Zellen
bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch
sinusoidale Endothelzellen der Leber**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michaela Maria Wittlich

aus

Neuwied

Bonn 2015

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

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

Tag der Promotion: 15.12.2015

Erscheinungsjahr: 2016

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vom 03. Juni 2011 im Zeitraum von Februar 2012 bis August 2015 von Herrn Prof. Dr. Percy A. Knolle betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbstständig 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 Person) 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. August 2015

*Meiner Familie
und meinen Freunden*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract.....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Das Immunsystem – ein Überblick	3
1.2 Antigen-präsentierende Zellen	4
1.3 Antigenpräsentation	5
1.4 Die Aktivierung von naiven T Zellen	7
1.4.1 Naive CD8 ⁺ T Zellen differenzieren zu Effektorzellen und Gedächtniszellen ..	8
1.4.2 Die Regulation der Differenzierung von CD8 ⁺ T Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen.....	10
1.4.3 Die Differenzierung von naiven CD4 ⁺ T Zellen zu T Helferzellen	12
1.4.4 Hilfe von CD4 ⁺ T Zellen bei der Induktion von CD8 ⁺ T Zellen	14
1.5 T Zell Toleranz	16
1.5.1 Zentrale Toleranz	16
1.5.2 Periphere Toleranz.....	17
1.6 Die Leber als immunologisches Organ.....	18
1.6.1 Antigen-präsentierende Zellpopulationen der Leber	19
1.6.2 Die Einleitung von peripherer Toleranz in der Leber.....	20
1.6.3 Lymphozyten in der Leber	21
1.6.4 Die Induktion von CD8 ⁺ T Zellen durch LSEC	22
1.6.5 Die Interaktion von CD4 ⁺ T Helferzellen mit LSEC	24
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.....	28
3.1.3	Allgemeine Lösungen.....	30
3.1.4	Kit Systeme	33
3.1.5	Antikörper.....	33
3.1.6	Antikörper-beschichtete Partikel.....	36
3.1.7	Enzyme.....	37
3.1.8	Zytokine	37
3.1.9	Mauslinien	37
3.1.10	Computersoftware.....	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Isolation primärer muriner Zellen.....	39
3.2.2	Bestimmung von Zellzahlen.....	42
3.2.3	Zellkultur	42
3.2.4	Funktionelle Analyse von Zellen <i>in vitro</i>	45
3.2.5	Durchflusszytometrie.....	47
3.2.6	Statistik	48
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Die Differenzierung von T _h 1 Zellen.....	49
4.2	T _h 1-Hilfe verstärkt die frühe Expression von Granzym B und CD25 bei LSEC-induzierten CD8 ⁺ T Zellen.....	51
4.3	Die Hilfe von T _h 1 Zellen bei der frühen Hochregulation von Granzym B ist LSEC-spezifisch.....	53
4.4	T _h 1 Zellen verstärken die LSEC-vermittelte Induktion von CD8 ⁺ T Zellen Antigen-spezifisch.....	55
4.5	Die neue LSEC-spezifische Helfer-Funktion von T _h 1 Zellen ist Zytokin-vermittelt.....	57
4.6	LSEC und T _h 1 Zellen interagieren Antigen-spezifisch und aktivieren sich dabei gegenseitig.....	60
4.7	Die Blockade von IL-2 verhindert die Hilfe von T _h 1 Zellen bei der Induktion von CD8 ⁺ T Zellen durch LSEC	65
4.8	IL-2 ist erforderlich für die Granzym-B-Hochregulation durch IL-6 Trans-Signalübertragung.....	68
4.9	LSEC können nach Aktivierung die frühe Granzym-B-Expression von CD8 ⁺ T Zellen Zytokin-vermittelt induzieren	72

5	Diskussion	75
5.1	Die Interaktion von T _h 1 Zellen mit LSEC führt zu einer frühen wechselseitigen Aktivierung.....	76
5.2	T _h 1 Zellen verstärken die frühe Expression von Granzym B und CD25 spezifisch bei LSEC-induzierten CD8 ⁺ T Zellen.....	78
5.3	T _h 1 Zellen verstärken die Induktion von CD8 ⁺ T Zellen durch LSEC Antigen-spezifisch.....	81
5.4	Die LSEC-spezifische Helfer-Funktion von T _h 1 Zellen ist Zytokin-vermittelt und abhängig von IL-2.....	82
5.5	Die Bedeutung von IL-2 für die durch IL-6 Trans-Signalübertragung induzierte Expression von Granzym B.....	86
5.6	LSEC können die frühe Granzym-B-Expression von CD8 ⁺ T Zellen nach Aktivierung Zytokin-vermittelt induzieren.....	89
5.7	Die potenzielle Bedeutung der Hilfe von T _h 1 Zellen bei der Induktion von CD8 ⁺ T Zellen in der Leber.....	92
5.8	Schlussfolgerung.....	96
6	Literaturverzeichnis	98
7	Abbildungsverzeichnis	118
8	Tabellenverzeichnis	120
9	Abkürzungsverzeichnis	121

Zusammenfassung

Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) nehmen kontinuierlich zirkulierende Antigene auf und kreuzpräsentieren diese CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen. Unter homöostatischen Bedingungen leiten LSEC die Differenzierung von naiven CD8⁺ T Zellen zu Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen ein. Dem geht ein sehr früher, jedoch vorübergehender Gewinn zytotoxischer Effektorfunktionen voraus, was durch IL-6 Trans-Signalübertragung induziert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob T_h1 Zellen die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC in Abwesenheit von Inflammation verstärken können. Es zeigte sich, dass T_h1 Zellen LSEC-spezifisch die Expression von Granzym B und CD25 der CD8⁺ T Zellen steigern konnten. Voraussetzung dafür war die Antigen-spezifische Interaktion der Endothelzellen mit den T_h1 Zellen, was zu der Aktivierung beider Zellpopulationen führte. Die beobachtete Helfer-Funktion war Zytokin-vermittelt und bedurfte keiner konventionellen kostimulatorischen Signale. T_h1 Zellen steigerten die Granzym-B- und CD25-Expression der CD8⁺ T Zellen vermutlich durch Sekretion von IL-2. Die Induktion der spezifischen Granzym-B-Hochregulation war jedoch abhängig von LSEC-vermittelten Stimuli und konnte nicht durch Signale von T_h1 Zellen eingeleitet werden. LSEC erlangten nach Aktivierung die Fähigkeit, die Expression von Granzym B Zytokin-vermittelt zu induzieren. Dies ergänzt den bereits beschriebenen Mechanismus der IL-6 Trans-Signalübertragung mit Hilfe des membranständigen IL-6/IL-6R-Komplexes auf LSEC.

Die Analyse der beobachteten Helfer-Funktion lieferte weiterhin Belege für die essenzielle Bedeutung von IL-2 für die durch IL-6 Trans-Signalübertragung induzierte Expression von Granzym B.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte somit eine neue Helfer-Funktion von T_h1 Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC beschrieben werden. Es ist durchaus denkbar, dass T_h1 Zellen auch *in vivo* unter homöostatischen Bedingungen die Differenzierung von Pathogen-spezifischen CD8⁺ T Zellen in der Leber unterstützen können. Dies kann möglicherweise die Einleitung von Immunantworten durch CD8⁺ T Zellen gegen zirkulierende Antigene verbessern und so die effiziente Eliminierung von viralen Infektionen und Tumoren ermöglichen.

Abstract

Liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) constantly take up circulating antigens and cross-present these to CD8⁺ and CD4⁺ T cells. Under homeostatic conditions this cross-presentation process induces differentiation of naive CD8⁺ T cells to liver-primed memory T cells. This is preceded by an early, but temporary acquisition of cytotoxic effector function induced by IL-6 trans-Signaling.

The aim of this study was to analyze whether T_h1 cells are able to enhance the induction of granzyme B and surface marker expression of CD8⁺ T cells by LSEC in the absence of inflammation. We demonstrate that T_h1 cells help increase the expression of granzyme B and CD25 specifically in LSEC-primed CD8⁺ T cells. The antigen-specific interaction of LSEC and T_h1 cells was a prerequisite for this effect and led to the mutual activation of both cell types. The observed helper function was cytokine mediated and independent of conventional costimulatory signals. T_h1 cells presumably increased the granzyme B and CD25 expression of CD8⁺ T cells by secretion of IL-2. However, the specific induction of granzyme B depended on LSEC-delivered stimuli and could not be induced by T_h1 signals alone. Upon activation, LSEC gained the ability to induce the expression of granzyme B in a cytokine-mediated manner. This finding complements the already described mechanism of IL-6 trans-Signaling via the membrane-bound IL-6/IL-6R-complex on LSEC.

Furthermore, analysis of the observed helper function provided evidence for an essential role for IL-2 in the IL-6 trans-Signaling-mediated expression of granzyme B.

Therefore, a new helper function of T_h1 cells during priming of CD8⁺ T cells by LSEC is described in this study. It is conceivable that T_h1 cells can support the differentiation of pathogen-specific CD8⁺ T cells in the liver also *in vivo* under homeostatic conditions. This could possibly improve the induction of CD8⁺ T cell-mediated immune responses towards circulating antigens, allowing for efficient elimination of viral infections and tumors.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem – ein Überblick

Menschen und Tiere sind ständig einer Vielzahl an Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, die diese als ökologische Nische mit guter Nährstoffversorgung und Möglichkeiten zur Vermehrung und Verbreitung nutzen, ausgesetzt (Brown et al., 2008). Das Immunsystem dient der Abwehr dieser Pathogene, sowie der Eliminierung abgestorbener oder maligner Zellen, und fasst Abwehrmechanismen sowohl auf zellulärer wie auch auf molekularer Ebene zusammen. Neben der Bekämpfung von Gefahr ist es wichtig, dass Schaden am körpereigenen Gewebe und die Eliminierung wichtiger kommensaler Bakterien verhindert wird. Die Fähigkeit des Immunsystems, potenziell schädliche Strukturen zu erkennen und diese gezielt zu eliminieren, ist daher von entscheidender Bedeutung. Dies wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen gewährleistet. Zum einen können Keimbahn-codierte Rezeptoren konservierte, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs¹) erkennen, die im Wirtsorganismus nicht vorkommen, und so schnell eine schon vorprogrammierte und initiale Antwort einleiten. Dies wird durch das angeborene (unspezifische) Immunsystem gewährleistet (Chaplin, 2010; Medzhitov and Janeway Jr, 1997). Weiterhin kann durch somatische Rekombination eine große Diversität an Rezeptoren gebildet werden, die sehr spezifisch potenziell schädliche Antigene erkennen und so eine auf das Antigen abgestimmte Immunantwort einleiten (Davis and Bjorkman, 1988; Nemazee, 2006). Die Einleitung dieser adaptiven (erworbenen) Immunantwort verläuft über mehrere Tage, weshalb hier auch von der zweiten Verteidigungslinie des Immunsystems gesprochen wird (Chaplin, 2010). Beide Teile müssen miteinander interagieren, um eine effektive Immunabwehr zu gestalten, und sind daher nicht als streng voneinander getrennt aufzufassen (Hoebe et al., 2004; Medzhitov, 2001).

Zu der Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems zählen mechanische Barrieren (Epithelien und deren Sekrete), lösliche Proteine (z.B. das Komplementsystem und antimikrobielle Peptide) und zelluläre Komponenten (Phagozyten, Dendritische

¹ Engl.: pathogen associated molecular patterns

Zellen, Natürliche Killer-Zellen) (Tosi, 2005). Die Antigen-präsentierenden Zellen (APC²) des angeborenen Immunsystems erkennen über Muster-Erkennungsrezeptoren (PRR³) PAMPs und werden durch diese aktiviert. Sie präsentieren daraufhin den Effektorzellen des adaptiven Immunsystems verstärkt aufgenommene Antigene und leiten so die adaptive Immunantwort ein (Hoebe et al., 2004; Iwasaki and Medzhitov, 2015; Medzhitov, 2001).

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems können in zwei Klassen unterteilt werden. B Zellen sekretieren ihren Rezeptor in löslicher Form als Antikörper und leiten so die humorale Immunantwort ein. T Zellen vermitteln die zelluläre Immunantwort, indem sie beispielsweise als Effektor T Zellen Immunzellen aktivieren und infizierte Zellen gezielt zerstören. Als T Helferzellen können sie die Immunantworten verstärken, dirigieren und regulieren. Sowohl B, als auch T Zellen bilden langlebige Gedächtniszellen, die nach Antigen-spezifischer Restimulation wieder schnell Effektorfunktionen erlangen und so eine beschleunigte und verstärkte Immunantwort einleiten können. Das immunologische Gedächtnis ermöglicht so auch über Jahrzehnte hinweg einen effektiven Schutz vor wiederkehrenden Infektionen (Chaplin, 2010; Kaech et al., 2002).

1.2 Antigen-präsentierende Zellen

APC sind hochspezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems, die körpereigene und körperfremde Bestandteile aufnehmen, prozessieren und T Zellen über MHC-Moleküle präsentieren. Sie stellen damit die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar. Als professionelle APCs sind besonders Dendritische Zellen (DC⁴), Makrophagen und auch die B Zellen der adaptiven Immunantwort entscheidend für die Aktivierung von T Zellen. Dabei stellen DC aufgrund der ausgeprägten Expression kostimulatorischer Moleküle, der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und der Fähigkeit zu lymphatischen Organen zu migrieren die Population an APCs dar, die am wichtigsten für die Einleitung T Zell-vermittelter Immunantworten ist (Hivroz et al., 2012).

² *Engl.:* antigen-presenting cells

³ *Engl.:* pattern recognition receptors

⁴ *Engl.:* Dendritic cell

In peripheren Geweben liegen DC als eine Art „immunologische Sensoren“ in meist unreifer oder tolerogener Form vor. In diesem Zustand präsentieren sie nur sehr ineffizient Antigene (Pulendran et al., 2001) und begünstigen aufgrund fehlender Kostimulation eher periphere Immuntoleranz (Dhodapkar et al., 2001; Guermonprez et al., 2002). Durch Kontakt mit Pathogenen werden DCs jedoch aktiviert. Dies erfolgt, indem PAMPs durch membranständige und zytosolische PRR erkannt werden (Matzinger and Kamala, 2011). Die DCs durchlaufen daraufhin einen Reifungsprozess und migrieren in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten und Milz (Banchereau and Steinman, 1998; Junt et al., 2008). Im Zuge der Aktivierung nehmen DC kaum mehr neue Antigene auf. Stattdessen ist die Prozessierung und Präsentation zuvor aufgenommener Antigene verstärkt. In den sekundären lymphatischen Organen können sie durch verstärkte Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen, sowie durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine, effizient naive T Zellen aktivieren und so die adaptive Immunantwort einleiten (Banchereau and Steinman, 1998; Steinman, 1991; Steinman et al., 2003).

1.3 Antigenpräsentation

Wie bereits erwähnt, sind T Zellen die Effektorzellen der zellvermittelten, adaptiven Immunantwort. Der T Zell Rezeptor (TCR⁵) legt die Antigenspezifität der Zelle fest, kann Antigene jedoch nicht selber erkennen und muss diese prozessiert als Peptid und mit einem MHC⁶-Molekül (Haupthistokompatibilitätskomplex) komplexiert präsentiert bekommen. Dies wird auch als MHC-Restriktion bezeichnet (Garcia and Adams, 2005). Die Effektorfunktionen von T Zellen zielen daher auf Zellen des Körpers, jedoch nicht direkt auf die Ursache der Entzündung wie Pathogene ab.

Die Interaktion von TCR und MHC-Molekülen alleine reicht nicht für die Aktivierung von T Zellen aus. Es werden zusätzliche Korezeptoren benötigt, die zusammen mit dem TCR den TCR-Komplex bilden. Dazu zählen die CD3-Signaluntereinheiten, wie auch die Korezeptoren CD4 und CD8, die mit unterschiedlichen MHC-Molekülen interagieren und anhand derer T Zellen in zwei Klassen unterteilt werden können (Garcia and Adams, 2005; Hennecke and Wiley, 2001).

⁵ Engl.: T cell receptor

⁶ Engl.: Major histocompatibility complex

CD8⁺ T Zellen erkennen Antigene, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden. MHC-I wird auf der Oberfläche jeder kernhaltigen Zelle des Körpers exprimiert. Ziel ist eine Art „Berichterstattung“ intrazellulärer Vorgänge, wobei es sich um virale Infektionen, die Anwesenheit intrazellulärer Bakterien oder Transformationen der Zelle handeln kann. Unter homöostatischen Bedingungen, also in Abwesenheit einer Infektion, werden Selbst-Antigene präsentiert, was die Abwesenheit von Gefahr kennzeichnet und in der Regel nicht zur Aktivierung der T Zellen führt. Für die Beladung von MHC-I-Molekülen werden zytoplasmatische Antigene durch Ubiquitinierung für den Abbau gekennzeichnet und proteasomal degradiert. Die entstandenen Peptide werden zum Endoplasmatischen Retikulum dirigiert und dort auf MHC-I-Moleküle geladen. Anschließend erfolgt der Transport des Peptid/MHC-I-Komplexes zur Zelloberfläche (Vyas et al., 2008).

MHC-II-Moleküle werden im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen hauptsächlich von professionellen APC wie DC, Makrophagen oder B Zellen exprimiert und von CD4⁺ T Zellen erkannt (Neefjes et al., 2011). Aber auch andere APC wie die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC⁷) oder Hepatozyten exprimieren geringe Mengen an MHC-II (Thomson and Knolle, 2010). Für die Beladung werden Antigene aus dem extrazellulären Milieu internalisiert und in endolysosomalen Kompartimenten degradiert (Lanzavecchia, 1996; Vyas et al., 2008). Dort erfolgt auch die Beladung der MHC-II-Moleküle, gefolgt von dem Transport zur Zelloberfläche (Neefjes et al., 2011; Théry et al., 1998).

Neben der klassischen Präsentation von Antigenen gibt es den Mechanismus der Kreuzpräsentation, bei dem extrazelluläre Antigene über Endozytose aufgenommen und anschließend CD8⁺ T Zellen über MHC-I präsentiert werden. Dies wurde erstmals 1976 im Kontext der „Kreuz-Induktion“ beschrieben (Bevan, 1976) und ist von entscheidender Bedeutung, wenn eine Gefahr beispielsweise durch Infektion oder maligne Transformation nicht die APC selbst betrifft (Kurts et al., 2010). Die Beladung der MHC-I-Moleküle erfolgt dabei entweder direkt im endosomalen Kompartiment, oder aber, nachdem das Antigen in das Zytoplasma transportiert und dort durch das Proteasom degradiert wurde (Burgdorf and Kurts, 2008; Joffre et al., 2012; Rock and Shen, 2005). Auf diese Art können professionelle APC wie DC, Makrophagen und B Zellen, aber auch LSEC, effizient eine durch CD8⁺ Effektorzellen vermittelte Immunantwort einleiten (Heath and Carbone, 2001; Kurts et al., 1996; Wohlleber et al., 2012).

⁷ Engl.: liver sinusoidal endothelial cells

1.4 Die Aktivierung von naiven T Zellen

Die Vorläufer von T Zellen werden im Knochenmark gebildet, den Großteil ihrer weiteren Entwicklung durchlaufen sie jedoch im Thymus. Anschließend zirkulieren sie als langlebige, reife T Zellen zwischen dem Blut und peripheren lymphatischen Organen, wo sie potenziell auf APC mit dem zu ihrem TCR passenden Antigen treffen können (Hickman et al., 2008; Klein et al., 2009; Sprent et al., 2008). Die reifen T Zellen bilden erst nach Antigen-spezifischer Interaktion mit APC Effektorfunktionen aus und werden bis zu diesem Zeitpunkt als naive T Zellen bezeichnet (Arens and Schoenberger, 2010).

Für die funktionale Aktivierung naiver T Zellen wird eine Kombination von drei Signalen benötigt. Signal eins besteht aus der spezifischen Interaktion zwischen dem TCR und dem Peptid/MHC-Komplex. Die Kostimulation durch Interaktion von CD28 auf der T Zelle mit CD80/86 (B7.1/B7.2) auf der APC als Signal zwei führt dann zu der Freisetzung von IL-2⁸ und ist wichtig für das Überleben der Zellen (Allison, 1994; Curtsinger et al., 2005; Lenschow et al., 1996). Eine solche Stimulation führt bereits zu der Proliferation naiver T Zellen, jedoch haben diese Zellen nur eingeschränkte Effektorfunktionen, überleben kaum und bilden keine funktionalen Gedächtnispopulationen (Mescher et al., 2006). Weitere kostimulatorische Moleküle wie CD40/CD40L unterstützen ebenfalls die T Zell-Aktivierung, jedoch muss für die Differenzierung naiver T Zellen zu voll aktivierten Effektorzellen zusätzlich durch Signal drei die Anwesenheit von Gefahr signalisiert werden. Dies wird durch inflammatorische Zytokine wie beispielsweise Typ I Interferone (IFN α/β), IL-1 oder IL-12 gewährleistet (Curtsinger and Mescher, 2010; Curtsinger et al., 1999; Curtsinger et al., 2005). Das Signal drei agiert daher als eine Art „Schalter“, der festlegt, ob die T Zellen überleben, Effektorfunktionen und Gedächtniszellen ausbilden oder aber Toleranz, Deletion und Anergie der Zellen die Folge der Stimulation ist (Curtsinger et al., 2003; Curtsinger and Mescher, 2010; Kolumam et al., 2005). Dabei müssen die proinflammatorischen Zytokine nicht zwangsläufig von der APC produziert werden, die Signal eins und zwei für die Aktivierung der T Zellen liefert. Eine „Bystander-Aktivierung“ durch benachbarte Zellen, die die proinflammatorischen Zytokine produzieren, ist ebenfalls möglich (Cui et al., 2009).

Die Stimulation des TCR hat unter anderem eine Aktivierung der Integrine LFA-1⁹ und VLA-4¹⁰ zur Folge, was die Affinität und Avidität für die entsprechenden Liganden

⁸ Interleukin-2

⁹ *Engl.*: Leukocyte function-associated antigen-1

ICAM-1¹¹ und VCAM-1¹² erhöht (Smith-Garvin et al., 2009). Dies wiederum ist wichtig für die Adhäsion der T Zellen und die Einwanderung in infizierte Gewebe. Die Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 trägt weiterhin zu der Aktivierung der T Zellen bei (Bose et al., 2013; Knolle and Gerken, 2000).

Die Einleitung einer T Zell-vermittelten Immunantwort muss genau überwacht werden, da der Körper neben dem offensichtlichen Nutzen auch die „Kosten“ in Form von Gewebeschäden trägt. Neben den kostimulatorischen Molekülen gibt es daher auch inhibitorische Rezeptoren, die die T Zell-Aktivierung limitieren und regulieren. Dazu zählt beispielsweise CTLA-4¹³, das wie CD28 mit CD80/86 interagiert, oder auch PD-1¹⁴, das PD-L1 und PD-L2 auf APC bindet (Diehl et al., 2008; Greenwald et al., 2005; Probst et al., 2005).

Die Summe der hier genannten Signale, die eine T Zelle während ihrer Differenzierung erhält, ändert sich abhängig von der Infektion und variiert auch auf Ebene der einzelnen T Zellen (Gerlach et al., 2010). Dies hat eine große Heterogenität der Effektor T Zell-Populationen zur Folge und beeinflusst weiterhin die Entstehung von Gedächtnis T Zellen (Lefrancois and Marzo, 2006; Wakim and Bevan, 2010).

1.4.1 Naive CD8⁺ T Zellen differenzieren zu Effektorzellen und Gedächtniszellen

Die T Zell-vermittelte Immunantwort ist so gestaltet, dass bei Gefahr schnell eine große Zahl an zytotoxischen Effektorzellen gebildet werden, die zu dem entzündeten Gewebe migrieren, um dort die Infektion zu bekämpfen. Am Ort der Entzündung interagieren diese Zellen mit APC und anderen Immunzellen, um eine weitere Expansion und Differenzierung vor Ort zu regulieren und den Organismus so möglichst gut zu schützen und gleichzeitig Kollateralschaden am benachbarten Gewebe zu minimieren (Zhang and Bevan, 2011). Gleichzeitig werden auch langlebige Gedächtniszellen gebildet, um bei wiederholter Infektion direkt die adaptive Immunantwort einleiten zu können. Nach der erfolgreichen Eliminierung der Infektion erfolgt die Kontraktionsphase, in der 90-95 %

¹⁰ Engl.: very late antigen-4

¹¹ Engl.: Intercellular Adhesion Molecule-1

¹² Engl.: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

¹³ Engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4

¹⁴ Engl.: Programmed cell death protein-1

der CD8⁺ Effektorzellen absterben. Nur ein Bruchteil der zu Beginn der Immunantwort aktivierten T Zellen entwickelt sich zu Gedächtniszellen (Cui and Kaech, 2010). Es wird daher zwischen kurzlebigen Effektorzellen (SLEC¹⁵) und solchen Zellen, die später zu langlebigen Gedächtniszellen differenzieren (MPEC¹⁶) unterschieden (Joshi and Kaech, 2008). Die aus diesen Entwicklungen hervorgehenden Effektor- und Gedächtniszellen unterscheiden sich grundlegend. Die Faktoren, die die Differenzierung von SLEC und MPEC bestimmen, der Zeitpunkt, zu dem das Schicksal der T Zelle festgelegt wird, sowie die Plastizität zwischen Effektor- und Gedächtniszellen, werfen nach wie vor Fragen auf und sind Bestandteil aktueller Studien.

SLEC differenzieren zu zytotoxischen T Zellen (CTL¹⁷). Diese Zellen töten infizierte und entartete Zellen, indem sie gezielt die Apoptose der Zielzellen einleiten. Dies wird durch Sekretion von TNF (Wohlleber et al., 2012), durch Freisetzung von Perforin- und Granzym-enthaltenden zytotoxischen Granula (Pipkin and Lieberman, 2007; Voskoboinik et al., 2015) oder durch Interaktion des Oberflächenmoleküls Fas Ligand (FasL) mit Fas (Fas Rezeptor) auf der Zielzelle vermittelt (Wowk and Trapani, 2004). Weiterhin sekretieren CTL proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IFN γ , was die virale Replikation inhibiert und andere Zellen des Immunsystems aktiviert (Belz and Kallies, 2010; Wowk and Trapani, 2004).

Die aus MPEC differenzierten CD8⁺ Gedächtniszellen können auch nach dem Abklingen einer Infektion ohne Kontakt zu dem spezifischen Antigen sehr lange *in vivo* überleben. Sie werden in Subpopulationen unterteilt, die sich anhand ihrer Lokalisation, Funktion und ihres Differenzierungspotenzials unterscheiden lassen (Stemberger et al., 2009). Zentrale Gedächtnis T Zellen (TCM¹⁸) sind nach ihrer Lokalisation in lymphatischen Organen benannt und besitzen nur eingeschränkte Effektorfunktionen. Sie sind besonders langlebig und unterliegen dank des Prozesses der homöostatischen Proliferation ständiger Selbsterneuerung (Boyman et al., 2007). TCM besitzen ein hohes Maß an Plastizität und können bei wiederholter Infektion aufgrund ihrer „stammzell-ähnlichen“ Eigenschaften neue Effektorzellen, Effektor Gedächtnis T Zellen (TEM¹⁹) und TCM generieren (Kaech and Cui, 2012; Kaech and Wherry, 2007).

¹⁵ Engl.: short-lived effector cells

¹⁶ Engl.: memory precursor effector cells

¹⁷ Engl.: cytotoxic T lymphocytes

¹⁸ Engl.: central memory T cells

¹⁹ Engl.: effector memory T cells

TEM befinden sich in der Zirkulation und in peripheren Organen. Dank stärker ausgeprägter Effektorfunktionen können sie besonders schnell durch ihr Antigen aktiviert werden und zur Immunabwehr beitragen. Sie sind jedoch nicht so multipotent wie TCM und können kaum zu neuen Effektor T Zellen differenzieren (Bouneaud et al., 2005; Kaech and Cui, 2012).

Neben den seit längerem bekannten TCM und TEM konnten jüngste Studien die Existenz einer weiteren Gedächtniszell-Population, den organresidenten Gedächtnis T Zellen (TRM²⁰), aufdecken. Diese Zellen besitzen wie TEM Effektorfunktionen und haben wie TCM das Potenzial zur Proliferation. Sie verbleiben am Ort der Infektion und können dort über lange Zeiträume hinweg überleben (Böttcher and Knolle, 2015; Masopust et al., 2006).

1.4.2 Die Regulation der Differenzierung von CD8⁺ T Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen

Die Differenzierung von SLEC und MPEC wird durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Signale während der Primärantwort eingeleitet. Die Stärke der Antigen-spezifischen Interaktion ist dabei ebenso wichtig wie die Dauer der Infektion und die Art und Intensität der Kostimulation (Joshi and Kaech, 2008; Surh and Sprent, 2008). Das Zytokinmilieu während der Induktion von CD8⁺ T Zellen ist ebenfalls richtungsweisend für die Entwicklung der Zellen und beeinflusst die Balance zwischen der Bildung von SLEC und MPEC. Wie bereits erwähnt, ist die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine wie Typ I IFN oder IL-12 als Signal drei entscheidend für eine funktionale T Zell-Aktivierung. Gleichzeitig wird so aber auch die Differenzierung in Richtung terminal differenzierter Effektorzellen dirigiert. Ist die Konzentration von IL-12 während der T Zell Induktion zu groß, wird die Bildung von langlebigen Gedächtniszellen verhindert (Cox et al., 2011). IL-12 initiiert dies durch mTor-abhängige Induktion von T-bet (Joshi et al., 2007; Rao et al., 2010; Zhang and Bevan, 2011). Gleichzeitig wird die Expression des für Gedächtniszellen wichtigen Transkriptionsfaktors Eomesodermin (Eomes) verringert. Das Verhältnis der Expression der T-box Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomes ist maßgeblich für die Entwicklung von Effektor- und Gedächtniszellen. Dominiert Eomes, so entwickeln sich langlebige Gedächtniszellen mit der Fähigkeit zur

²⁰ *Engl.:* tissue resident memory T cells

Proliferation. Bei vorherrschender T-bet-Expression dagegen überwiegt die Differenzierung von Effektorzellen (Böttcher and Knolle, 2015). Dies verlängert die Expression der Effektor-assoziierten Gene für IFN γ und Granzym B (Agarwal et al., 2009). Weiterhin induziert IL-12 eine verstärkte Expression der für den hochaffinen IL-2 Rezeptor wichtigen α -Kette (CD25) (Valenzuela et al., 2002), wodurch die IL-2-Signalübertragung gesteigert und die Bildung von Effektorzellen begünstigt wird. IL-2 wurde ursprünglich als Wachstumsfaktor für T Zellen beschrieben. Das Zytokin ist aber auch für die Induktion von CD8⁺ Gedächtniszellen wichtig (Williams et al., 2006). Hohe Konzentrationen von IL-2 während der Induktion von CD8⁺ T Zellen begünstigen allerdings die Bildung von Effektorzellen mit verstärkter Expression von Granzym B und Perforin. Nach niedrigen IL-2-Konzentrationen zeigen die Lymphozyten den Phänotyp von Gedächtniszellen (Pipkin et al., 2010). Diese Beobachtung ist jedoch nicht nur abhängig von der Konzentration an IL-2, sondern auch von der Fähigkeit der T Zelle das IL-2-Signal wahrzunehmen und weiterzuleiten. IL-2 bindet an einen trimeren Rezeptor, der aus der IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25), aus der IL-2 Rezeptor β -Kette (CD122) und der γ_c -Unterheit (CD132) besteht (Liao et al., 2013; Lin and Leonard, 1997). Durch Expression von CD25 wird die Bildung des hochaffinen IL-2R aus CD25, CD122 und der γ_c -Unterheit ermöglicht. Zellen mit hoher CD25-Expression (CD25^{hoch}) erhalten ein sehr starkes IL-2-Signal und durchlaufen ein Differenzierungsprogramm in Richtung SLEC. Bei wiederholter Infektion sind sie *in vivo* nicht in der Lage, eine effektive Immunantwort einzuleiten. Zellen mit niedriger CD25-Expression (CD25^{niedrig}) überleben nach adoptiven Transfer deutlich länger *in vivo* und können eine sekundäre Infektion erfolgreich bekämpfen (Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010). Die Expression von CD25 ist jedoch nur vorübergehend und kann am Höhepunkt der Immunantwort auf den T Zellen nicht mehr nachgewiesen werden, wodurch zu diesem Zeitpunkt auch die IL-2-Signalübertragung sehr eingeschränkt ist (Kalia et al., 2010). MPECs erhalten an diesem Punkt Überlebenssignale durch die für Gedächtniszellen wichtigen Zytokine IL-7 und IL-15, während SLEC, die nur den IL-15 Rezeptor exprimieren, sterben (Joshi et al., 2007; Malek and Castro, 2010). Die Signale von IL-7 und IL-15 sind nicht nur für das Überleben der MPEC zum Zeitpunkt der Infektion wichtig, sondern auch essenziell für die weitere Differenzierung zu Gedächtniszellen, sowie für das langfristige Überdauern und die homöostatische Proliferation der Zellen (Boyman et al., 2007; Joshi and Kaeck, 2008). Neben den bisher analysierten proinflammatorischen Signalen gibt es auch antiinflammatorische Signale, die eine Differenzierung in Richtung von Gedächtniszellen fördern. TGF- β hemmt die Entwicklung kurzlebiger Effektorzellen und fördert das

Überleben von Gedächtniszellen (Filippi et al., 2008; Sanjabi et al., 2009a; Sanjabi et al., 2009b). Durch Sekretion des immunosuppressiven Zytokins IL-10 verhindern CTL am Ort einer Infektion die übermäßige Schädigung des umliegenden Gewebes (Sun et al., 2009; Zhang and Bevan, 2011). Während der Aktivierung von CD8⁺ T Zellen verringert IL-10 zusammen mit IL-21 durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 die Sensitivität von TCM für IL-12 und beugt somit einer Differenzierung zu Effektorzellen vor (Cui et al., 2011; Foulds et al., 2006). Interessanterweise hat STAT3 bimodale Funktionen und kann nach IL-6-Stimulation auch proinflammatorisch wirken (O'Shea and Murray, 2008). Zusammenfassend wird deutlich, dass die Summe der inflammatorischen und anti-inflammatorischen Signale zu Beginn der T Zell-Aktivierung über die Entwicklung zu Effektor- oder Gedächtniszellen entscheidet. Starke und lange Stimulation mit inflammatorischen Signalen treibt die Differenzierung der T Zellen voran und somit die Ausbildung von Effektorzellen. Bei einer verkürzten Stimulation oder bei weniger stark ausgeprägten inflammatorischen Signalen sind die T Zellen weniger differenziert und dadurch in der Lage Gedächtniszellen zu bilden (Badovinac et al., 2004; Gattinoni et al., 2011).

1.4.3 Die Differenzierung von naiven CD4⁺ T Zellen zu T Helferzellen

Naive CD4⁺ T Zellen differenzieren nach Antigen-spezifischer Aktivierung in Anwesenheit inflammatorischer Signale zu spezialisierten T Helferzellen (T_h²¹) mit unterschiedlichen Phänotypen, die anhand von Effektorfunktionen wie der Sekretion festgelegter Zytokin-Profile unterteilt werden können (Nakayamada et al., 2012; Zhu and Paul, 2008). In Abwesenheit inflammatorischer Zytokine überwiegt die durch TGF-β vermittelte Generierung induzierter regulatorischer T Zellen (iT_{reg}²²) (Bettelli et al., 2006). Die Fähigkeit, abhängig von der Art der Gefahr in unterschiedliche Subpopulationen mit passenden Effektorfunktionen zu differenzieren, ermöglicht es CD4⁺ T Zellen, Infektionen gezielt zu bekämpfen und den Verlauf adaptiver Immunantworten zu dirigieren (Nakayamada et al., 2012; Szabo et al., 2003; Zhu and Paul, 2008). Die Zusammensetzung der Gefahrensignale während der T Zell-Aktivierung initiiert die Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung zu den unterschiedlichen T Helferzellen weiter regulieren (Szabo et al., 2003). Ursprünglich

²¹ Engl.: T helper cells

²² Engl.: induced regulatory T cells

Generierung einer Immunantwort durch CD8⁺ T Zellen unterstützen (Ekkens et al., 2007; Klugewitz et al., 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Helferfunktion von CD4⁺ T Zellen am Beispiel von T_h1 Zellen analysiert.

1.4.4 Hilfe von CD4⁺ T Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen

Wie bereits beschrieben, reicht die TCR-Stimulation bei CD8⁺ T Zellen unter physiologischen Bedingungen alleine nicht zur Aktivierung der Zellen aus. Neben inflammatorischen Signalen können auch CD4⁺ T Helferzellen die Unterstützung liefern, um eine Aktivierung und funktionale Differenzierung der CD8⁺ T Zellen einzuleiten und so die Bildung von Toleranz zu verhindern (Bevan, 2004). Dies setzt eine Antigen-spezifische Interaktion der APC mit der T Helferzelle voraus (Smith et al., 2004). Die tatsächliche Notwendigkeit dieser Hilfe und die Art, wie sie vermittelt wird, sind nicht vollständig geklärt und Bestandteil aktueller Studien. Abhängig von dem inflammatorischen Stimulus und der daraus resultierenden Aktivierung der APC ist die Hilfe von CD4⁺ T Zellen für die Einleitung einer CTL-vermittelten primären Immunantwort nicht zwingend notwendig. Dies trifft vor allem auf Infektionen zu, die mit starken inflammatorischen Signalen einhergehen und die Reifung der APC auch in Abwesenheit von T Helferzellen ermöglichen (Buller et al., 1987; Rahemtulla et al., 1991; Wiesel and Oxenius, 2012; Wu and Liu, 1994). Bei Infektionen mit weniger starken einhergehenden inflammatorischen Signalen oder bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen in Abwesenheit von Inflammation ist die Hilfe von CD4⁺ T Zellen aber essenziell für die Einleitung der primären CTL-vermittelten Immunantwort (Bennett et al., 1997; Ekkens et al., 2007; Ryu et al., 2012; Sun and Bevan, 2004; Wang and Livingstone, 2003; Wiesel and Oxenius, 2012). Weiterhin ist die Fähigkeit von CD8⁺ T Zellen, Gedächtniszellen zu bilden und bei wiederkehrender Infektion schnell Effektorfunktionen zu erlangen und die Infektion zu bekämpfen, abhängig von der Anwesenheit CD4⁺ T Zellen (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003).

Auch der Zeitpunkt für die Notwendigkeit der Hilfe von CD4⁺ T Zellen wird diskutiert. Einerseits gibt es Hinweise, dass CD4-Hilfe während der frühen Aktivierung von CD8⁺ T Zellen wichtig ist, um die spätere Bildung von Gedächtniszellen zu unterstützen und zu ermöglichen (Masopust et al., 2004). Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass CD4⁺ T Zellen langfristig für die Aufrechterhaltung des CD8⁺ T Zell-Gedächtnisses essenziell sind. Dafür wird nicht unbedingt eine Antigen-spezifische Interaktion benötigt.

Eine Hilfe durch Bereitstellung wichtiger Zytokine wäre hier eine mögliche Erklärung (Provine et al., 2014; Sun et al., 2004). Es ist wahrscheinlich, dass die von CD4⁺ T Zellen vermittelte Hilfe abhängig von der Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten und über unterschiedliche Mechanismen verläuft. Ein komplexes Zusammenspiel all dieser Faktoren ist ebenfalls denkbar. Aber wie genau wird die Hilfe von CD4⁺ T Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen vermittelt?

CD4⁺ T Zellen können APC, meist DC, nach Antigen-spezifischer Interaktion aktivieren. Diese Aktivierung führt zu einer Hochregulation des Oberflächenmarkers CD40, der mit dem Liganden CD40L auf CD8⁺ T Zellen während der Induktion interagiert. Diese Lizenzierung der APC ermöglicht die spätere Differenzierung der CD8⁺ T Zellen zu Gedächtniszellen (Ahmed et al., 2012; Bennett et al., 1998; Bennett et al., 1997; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Weiterhin steigert die CD40-vermittelte Lizenzierung von DCs auch deren Expression von IL-12 und kostimulatorischen Molekülen und somit auch deren Fähigkeit zur optimalen Induktion von CD8⁺ T Zellen (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996; Wiesel et al., 2010). DC exprimieren überdies nach der Aktivierung durch T Helferzellen IL-15, das wichtig für die Generierung langlebiger Gedächtniszellen ist (Oh et al., 2008). *In vivo* produzieren DC, die von CD4⁺ T Zellen aktiviert wurden, außerdem Chemokine, die CD8⁺ T Zellen gezielt zum Ort der CD4⁺ T Zell/DC-Interaktion dirigieren (Castellino et al., 2006).

T Helferzellen können die Immunantwort von CD8⁺ T Zellen auch direkt durch Sekretion von Zytokinen beeinflussen. Wie zuvor beschrieben, steigert IL-2 die Bildung von Effektorzellen und ist zudem wichtig für die Ausbildung des T Zell-Gedächtnisses. IL-2 wird hauptsächlich von CD4⁺ T Zellen produziert und nur zu einem geringeren Teil von aktivierten CD8⁺ T Zellen (Malek and Castro, 2010). Von T Helferzellen freigesetztes, extrinsisches IL-2 unterstützt daher eine optimale Differenzierung der CD8⁺ T Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen (Cox et al., 2011). Weiterhin wird so das Überleben der CD8⁺ Lymphozyten gesteigert (Wiesel et al., 2010). Neben der Produktion von IL-2 können CD4⁺ T Zellen das Überleben von CD8⁺ Gedächtniszellen außerdem durch Sezernierung von IL-21 fördern (Allard et al., 2007). Ein weiteres für die Helfer-Funktion interessantes Zytokin ist IFN γ . Durch Freisetzung von IFN γ induzieren CD4⁺ T Zellen einerseits die verstärkte Expression von MHC-I und steigern somit die Antigenpräsentation für CD8⁺ T Zellen (Yang et al., 1995). Andererseits wird so die Expression von Chemokinen zur Rekrutierung von CD8⁺ T Zellen induziert (Bos and Sherman, 2010).

1.5 T Zell Toleranz

Der Rezeptor von T Zellen wird durch somatische Rekombination generiert, was die Bildung einer großen Diversität an Rezeptoren, die sehr spezifisch potenziell schädliche Antigene erkennen, ermöglicht (Davis and Bjorkman, 1988; Nemazee, 2006). Dabei kommt es aber auch zu der Bildung von TCRs, die körpereigene Antigene erkennen. Da T Zellen nicht in der Lage sind, zwischen selbst und fremd zu unterscheiden (Janeway, 1989), müssen diese autoreaktiven T Zellen eliminiert oder funktional inaktiviert werden. Dies geschieht durch zentrale und periphere Toleranzmechanismen. Toleranz bezeichnet dabei den Zustand, bei dem T Zellen bei der Erkennung körpereigener Antigene trotz der Anwesenheit von Aktivierungssignalen nicht in der Lage sind, eine funktionale Immunantwort einzuleiten (Redmond and Sherman, 2005).

1.5.1 Zentrale Toleranz

T Zellen durchlaufen den Großteil ihrer Entwicklung im Thymus. Dort werden die T Zell-Vorläufer (Thymozyten) während der Positivselektion zunächst auf die Erkennung des körpereigenen MHC-Moleküls geprüft. Die dabei positiv selektionierten Zellen werden anschließend während der Negativselektion im Hinblick auf die Erkennung körpereigener Antigene getestet. Thymozyten, die hochaffin präsentierte Selbst-Antigene binden, werden durch Apoptose eliminiert.

Die Negativselektion erfolgt in der Medulla des Thymus. Dort präsentieren medulläre Thymusepithelzellen (mTEC²⁴), Makrophagen und DC Gewebe-spezifische körpereigene Antigene (Gallegos and Bevan, 2004; Klein et al., 2009). Der Transkriptionsfaktor AIRE²⁵ ermöglicht dabei mTEC, Selbst-Antigene, die sonst nur in peripheren Organen zu finden sind, zu exprimieren (Anderson et al., 2005; Anderson et al., 2002). Mehr als 95% der T Zell-Vorläufer werden während der Negativselektion durch Apoptose aussortiert. Trotzdem können nicht alle autoreaktiven T Zellen eliminiert werden. Einige T Zellen, die Selbst-Antigene erkennen, verlassen auch den Thymus (Gallegos and Bevan, 2006; Redmond and Sherman, 2005).

²⁴ *Engl.*: medullary thymic epithelial cells

²⁵ *Engl.*: autoimmune regulator

1.5.2 Periphere Toleranz

Selbst-reaktive T Zellen, die trotz Negativselektion den Thymus verlassen konnten, müssen zum Schutz vor Autoimmunerkrankungen ebenso eliminiert werden wie T Zellen, die Antigene von Nahrungsmitteln oder kommensalen Bakterien erkennen. Gleiches gilt für Zellen, die Selbst-Antigene nur mit sehr schwacher Avidität binden (Mowat, 2003; Srinivasan and Frauwirth, 2009; Zehn and Bevan, 2006). Die periphere Toleranz stellt einen weiteren Kontrollpunkt dar, der den Körper vor Schaden durch solch autoreaktive Zellen schützt (Redmond and Sherman, 2005). Dies wird über verschiedene Mechanismen gewährleistet.

T Zell Ignoranz tritt auf, wenn der TCR von T Zellen nur eine geringe Affinität für das präsentierte körpereigene Antigen aufweist und eine Aktivierung der Zelle nicht erfolgt (Kurts et al., 1998). Durch Hilfe von CD4⁺ T Zellen oder durch inflammatorische Signale des angeborenen Immunsystems kann jedoch eine Aktivierung der T Zellen erfolgen, mit der Folge von Autoimmunität (Kurts et al., 1997a; Kurts et al., 1998; Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991). Ignoranz tritt ebenfalls auf, wenn das Antigen nicht in ausreichender Konzentration vorliegt oder an einem immunprivilegierten Ort im Organismus, wie dem Gehirn, zu finden ist, zu dem die T Zelle keinen Zugang hat (Alferink et al., 1998).

CD4⁺ T Zellen helfen jedoch nicht nur bei der Aufhebung der Toleranzinduktion. Regulatorische T Zellen verhindern die Aktivierung anderer T Zellen und unterdrücken damit die Entstehung von Autoimmunität (Vignali et al., 2008).

Eine weitere Form der peripheren Toleranz wird durch unreife APC vermittelt. Unter homöostatischen Bedingungen exprimieren diese Zellen kaum kostimulatorische Moleküle. Die Präsentation von Selbst-Antigenen und aufgenommenen löslichen Antigenen in Abwesenheit von inflammatorischen Signalen führt nach kurzzeitiger Aktivierung der T Zellen zu funktionaler Inaktivierung, auch Anergie genannt, und klonaler Deletion (Kurts et al., 1997b; Redmond and Sherman, 2005; Steinman et al., 2003). Neben den ausbleibenden kostimulatorischen Signalen tragen die inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 auf T Zellen zur Deletion durch unreife APC bei (Konkel et al., 2010; Probst et al., 2005). Selbst-reaktive, anerge T Zellen, die die Antigenpräsentation unter nicht-inflammatorischen Bedingungen überleben, behalten ihre Unempfindlichkeit für die Stimulation des TCR bei und können selbst unter inflammatorischen Bedingungen nicht reaktiviert werden (Schietering et al., 2012).

1.6 Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber erfüllt als zentrales Stoffwechselorgan des Körpers eine Vielzahl an Aufgaben. Dazu gehört die Energieversorgung, was die Aufnahme, die Metabolisierung, die Speicherung und die Freisetzung von Nährstoffen beinhaltet. Weiterhin ist sie wichtig für die Entgiftung des Körpers und für die Produktion von Gallenflüssigkeit, Gerinnungsfaktoren und anderen Eiweißstoffen (Jungermann, 1995). Die Leber zeichnet sich auch durch ihre hohe Regenerationsfähigkeit aus (Hu et al., 2014). Zudem ist sie an der lokalen Regulation immunologischer Vorgänge beteiligt (Böttcher et al., 2011; Crispe, 2009; Knolle and Gerken, 2000).

Die Blutzufuhr der Leber über die Pfortader setzt sich mit über 70 % aus sauerstoffarmen, venösen Blut aus dem Gastrointestinaltrakt, das reich an mikrobiellen Produkten und Nahrungsantigenen ist, zusammen. Nur ein geringer Anteil wird durch die *Arteria hepatica* eingespeist (Crispe, 2009). Venöses und arterielles Blut vermischt sich bei der Passage der Vielzahl kleiner Blutgefäße, den hepatischen Sinusoiden. Diese haben einen Durchmesser von 5-7 μm und bilden ein großes Netzwerk, das aufgrund der vergrößerten Oberfläche eine Verlangsamung des Blutflusses ermöglicht. Die verringerte Geschwindigkeit erleichtert einerseits die Aufnahme der Nahrungsbestandteile und mikrobiellen Produkte aus dem Gastrointestinaltrakt. Weiterhin ermöglicht sie die Interaktion zirkulierender Immunzellen mit den APC der Leber (Knolle and Gerken, 2000; MacPhee et al., 1995; Thomson and Knolle, 2010).

Das Endothel in den Lebersinusoiden wird von der gleichzeitig vorherrschenden Population an APC gebildet, den LSEC. Diese nicht-parenchymalen Zellen bilden die Barriere zwischen dem Parenchym und dem Blutfluss (Racanelli and Rehermann, 2006; Wisse et al., 1985). Zwischen dem Leberendothel und den parenchymatischen Zellen der Leber, den Hepatozyten, liegt der Raum von Dissé, der dem Stoffaustausch dient und in dem sich die hepatischen Sternzellen befinden (Racanelli and Rehermann, 2006). Das Leberendothel besitzt keine Basalmembran und ist weiterhin nicht komplett geschlossen, was die Passage von Molekülen und sogar Zellen in den Raum von Dissé ermöglicht. Dies erfolgt über sogenannte *Fenestrae* oder über Transzytose durch LSEC hindurch (Braet and Wisse, 2002; Knolle and Limmer, 2003; Wisse, 1970). Die *Fenestrae* ermöglichen weiterhin, dass Hepatozyten über zytoplasmatische Ausläufer direkt mit den Lymphozyten der Blutzirkulation interagieren können (Bertolino et al., 1998).

1.6.1 Antigen-präsentierende Zellpopulationen der Leber

Hepatozyten stellen in der Leber mit 70 % die zahlenmäßig am stärksten vertretene Zellpopulation dar (Carambia and Herkel, 2010). Sie erfüllen die metabolischen Funktionen der Leber und produzieren wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie Akute-Phase-Proteine und Proteine des Komplementsystems (Janeway and Medzhitov, 2002). Sie können trotz geringer MHC-I-Expression naiven CD8⁺ T Zellen Selbst-Antigene präsentieren (Bertolino et al., 2001). Unter inflammatorischen Bedingungen exprimieren Hepatozyten auch MHC-II und sind somit in der Lage CD4⁺ T Zellen zu aktivieren (Herkele et al., 2003). Hepatozyten induzieren die Bildung von CD4⁺ T Zellen mit regulatorischem oder T_H2 Phänotyp und hemmen die Aktivität inflammatorischer T Helferzellen, was die Fortdauer viraler Infektionen verlängert (Carambia and Herkel, 2010; Lüth et al., 2008; Wiegard et al., 2007).

LSEC kleiden das Lebersinusoid aus und stellen die zahlenmäßig am häufigsten vertretene Population nicht-parenchymaler Zellen dar (Böttcher et al., 2011). Sie sind wichtig für die Beseitigung von zirkulierenden Endotoxinen und Pathogenen (Smedsrod, 2004). LSEC nehmen vor allem über Rezeptor-vermittelte Endozytose innerhalb von Minuten sehr effizient Antigene aus der Blutzirkulation auf und präsentieren diese über MHC-I bzw. MHC-II zirkulierenden CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen (Knolle and Limmer, 2003; Limmer and Knolle, 2001; Schurich et al., 2009). Die Aufnahme wird durch verschiedene Rezeptoren, wie C-Typ Lektine, zu denen auch der Mannose Rezeptor zählt, Scavenger Rezeptoren und PRR, induziert (Elvevold et al., 2008; Malovic et al., 2007; Sørensen et al., 2012). Zusätzlich können LSEC, wie bereits erwähnt, bestimmte Moleküle über aktiv regulierte *Fenestrae* und sogar große Partikel über Transzytose durch sich hindurch schleusen (Steffan et al., 1986). Die Interaktion mit Lymphozyten wird dank der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und L-SIGN ermöglicht und bei Aktivierung der Endothelzellen durch eine verstärkte Expression gesteigert (Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010). Weiterhin exprimieren LSEC konstitutiv kostimulatorische Moleküle wie CD40 und geringe Mengen an CD80/86 (Knolle and Gerken, 2000; Knolle and Limmer, 2003), sowie eine große Anzahl an koinhibitorischen Molekülen wie PD-L1 (B7-H1) (Diehl et al., 2008).

Die Leber verfügt über eine Population organresidenter Makrophagen, die Kupfferzellen. Sie befinden sich hauptsächlich in den Lebersinusoiden der periportalen Areale und phagozytieren vor allem partikuläre Bestandteile aus der Blutzirkulation. Sie sind wichtig für die Beseitigung von Endotoxinen, von Mikroorganismen und apoptotischen Zellen

und produzieren Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF, IL-12 und IL-10 (Knolle et al., 1995; Racanelli and Rehermann, 2006). Kupfferzellen tragen vor allem durch die Freisetzung von IL-10 zu dem in der Leber vorherrschenden tolerogenen Milieu bei (Carambia and Herkel, 2010; Knolle et al., 1995). Außerdem können sie dank der Expression von MHC-I und MHC-II mit zirkulierenden Lymphozyten interagieren.

Eine weitere Population hepatischer APC sind die Sternzellen bzw. Ito-Zellen. Sie befinden sich in dem Raum von Dissé und stellen 1 % der nicht-parenchymalen Zellen in der Leber dar (Carambia and Herkel, 2010). Sternzellen dienen als Speicher von Lipiden und Vitamin A. Außerdem produzieren sie extrazelluläre Matrixproteine, was auch zu der Entstehung von Leberfibrose führen kann (Friedman, 2008). Dank der Sekretion von Zytokinen können sie Lymphozyten in die Leber dirigieren. Sie interagieren direkt mit T und NKT Zellen (Carambia and Herkel, 2010), können aber auch die Antigenpräsentation benachbarter APC inhibieren (Schildberg et al., 2011). Durch Transfer von MHC-I-Molekülen auf LSEC können Sternzellen aber auch zu der Einleitung von antiviralen Immunantworten durch CD8⁺ T Zellen beitragen (Schölzel et al., 2014).

DC in der Leber nehmen kontinuierlich Antigene auf und migrieren für deren Präsentation von dem Raum von Dissé über lymphatische Gefäße zu drainierenden hepatischen Lymphknoten (Barbier et al., 2012). Im Vergleich zu DC aus anderen Organen besitzen hepatische DC einen tolerogenen Phänotyp, was unter anderem durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β hervorgerufen wird (Banchereau et al., 2000; Crispe, 2009).

1.6.2 Die Einleitung von peripherer Toleranz in der Leber

Wie bereits erwähnt, begünstigt die Leber dank des immunsuppressiven Milieus die Entstehung von peripherer Toleranz (Thomson and Knolle, 2010). Antigene, die über die Portalvene in die Leber gelangen oder aus allogenen Lebertransplantaten stammen, lösen keine inflammatorischen Immunantworten aus (Carambia et al., 2014). Diese einzigartige Fähigkeit verhindert einerseits die Entstehung von entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen, andererseits wird so auch die Etablierung persistenter viraler Infektionen oder die Bildung von Tumoren in der Leber erleichtert (Carambia et al., 2014; Protzer et al., 2012; Thomson and Knolle, 2010). Neben der lokalen Hemmung von Inflammation kann die Leber auch die systemische Toleranz gegen körpereigene und fremde Antigene induzieren, was durch Differenzierung

regulatorischer T Zellen in der Leber vermittelt wird (Carambia et al., 2014; Kruse et al., 2009; Tiegs and Lohse, 2010).

Ursache für das toleranzfördernde Milieu in der Leber ist vermutlich die konstante Zufuhr von PAMPs und mikrobiellen Produkten aus dem Darm, was zu der Unempfindlichkeit hepatischer APC für diese Gefahrensignale führt (Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010). Kupfferzellen, Hepatozyten und LSEC produzieren nach Kontakt mit diesen PAMPs anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β und beeinträchtigen so die Reifung und Antigenpräsentation lokaler APC (Knolle et al., 1995; Thomson and Knolle, 2010; Uhrig et al., 2005). Auch intrahepatische CD4⁺ T Zellen und pathogen-spezifische CD8⁺ T Zellen tragen zu der Freisetzung von IL-10 bei (Accapezzato et al., 2004; Racanelli and Rehermann, 2006).

Neben der Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen können LSEC und, wie schon erwähnt, auch Sternzellen, die Aktivierung von T Zellen durch benachbarte professionelle APC inhibieren (Schildberg et al., 2008; Schildberg et al., 2011).

1.6.3 Lymphozyten in der Leber

Die Leber enthält dank der strategischen Positionierung im Blutkreislauf des Körpers ständig zirkulierende Lymphozyten (Racanelli and Rehermann, 2006). Zu den Lymphozyten in der Leber zählen Zellen des angeborenen Immunsystems (NK²⁶ und NKT²⁷ Zellen) und auch die B und T Zellen des adaptiven Immunsystems. CD8⁺ T Zellen sind dabei in größerer Anzahl vertreten als CD4⁺ T Zellen (Racanelli and Rehermann, 2006). Im Vergleich zu anderen lymphatischen Geweben enthält die Leber deutlich mehr T Zellen, die bereits zu Effektor- oder Gedächtniszellen differenziert sind, was an der selektiven Rekrutierung dieser Zellen liegt (Doherty et al., 1999; Klugewitz et al., 2004). In der Leber selber wird außerdem bevorzugt die Bildung von regulatorischen T Zellen induziert (Billerbeck et al., 2007; Hall et al., 2010).

CD8⁺ T Zellen werden unter inflammatorischen Bedingungen abhängig von den Chemokinrezeptoren CCR6 und CCR9 und durch Bindung von ICAM-1 und VCAM-1 in die Leber rekrutiert (John and Crispe, 2004; Oo and Adams, 2010). Dort sind sie aufgrund

²⁶ Engl.: natural killer cells

²⁷ Engl.: natural killer T cells

ihrer zytotoxischen Effektorfunktionen essenziell für die Eliminierung von Infektionen (Shoukry et al., 2003; Thimme et al., 2003; Wohlleber et al., 2012).

T_h1 Zellen werden ebenfalls verstärkt in die Leber rekrutiert (Derkow et al., 2011; Klugewitz et al., 2002b). Unter inflammatorischen Bedingungen wie viralen Infektionen wird dies durch die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR6 und die Bindung an VCAM-1 reguliert (Bonder et al., 2005; Oo and Adams, 2010). Virus-spezifische $CD4^+$ T Zellen, die in der Leber akkumulieren, sind effektiv an der Bekämpfung der Infektion beteiligt (Gerlach et al., 1999; Knolle and Thimme, 2014; Schulze zur Wiesch et al., 2012). Dies geschieht direkt über zytotoxische Effektorfunktionen der Zellen, als auch über Hilfe bei der Induktion Virus-spezifischer $CD8^+$ T Zellen (Asabe et al., 2009; Diepolder et al., 1995; Grakoui et al., 2003; Provine et al., 2014). Eine Hemmung der Effektorfunktionen von $CD4^+$ T Zellen, beispielsweise durch inhibitorische Signale, kann zu der Entstehung von chronischen Infektionen führen (Raziorrouh et al., 2011).

1.6.4 Die Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC

Die Kreuzpräsentation durch APC ist essenziell für die Einleitung funktionaler Immunantworten von $CD8^+$ T Zellen. Auch LSEC sind in der Lage, Antigene aus der Blutzirkulation aufzunehmen, diese intrazellulär zu prozessieren und $CD8^+$ T Zellen über MHC-I kreuzzupräsentieren. Dies führt zu einer schnellen, Antigen-spezifischen Rekrutierung zirkulierender $CD8^+$ T Zellen in die Leber (von Oppen et al., 2009). LSEC sind professionellen APCs wie Milz-DCs in Bezug auf die Präsentation exogener Antigene über MHC-I sogar überlegen (Kurts et al., 2010; Limmer et al., 2000; Schurich et al., 2009). Die Kreuzpräsentation läuft allerdings im Vergleich zu DCs über verschiedene Mechanismen und mit unterschiedlichen Kinetiken ab und resultiert in unterschiedlichen Phänotypen der Lymphozyten (Schurich et al., 2009). $CD8^+$ T Zellen besitzen nach Induktion durch LSEC frühe und vorübergehende zytotoxische Eigenschaften (Böttcher et al., 2014), nach Induktion durch DC zeigen sie dagegen einen späten Gewinn von Zytotoxizität (Diehl et al., 2008).

Naive $CD8^+$ T Zellen gelangen unter homöostatischen Bedingungen durch LSEC-Induktion nach initialer Proliferation in eine Art „Ruhe-Status“, in dem sie trotz Stimulation des T Zell Rezeptors keine inflammatorischen Zytokine wie IL-2 oder $IFN\gamma$ produzieren und auch keine zytotoxischen Effektorfunktionen ausüben (Limmer et al., 2000). Dies wird durch verstärkte Expression des koinhibitorischen Rezeptors PD-L1 erreicht, während

eine Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD80/86 auf LSEC nicht erfolgt (Diehl et al., 2008; Kaczmarek et al., 2014). Dieser „ruhende“ Phänotyp wurde lange Zeit als Toleranz gedeutet (Berg et al., 2006; Limmer et al., 2000; Limmer et al., 2005; Schurich et al., 2010; von Oppen et al., 2009). Tatsächlich sind diese Zellen in der Lage, sehr lange *in vivo* zu überleben (Diehl et al., 2008; von Oppen et al., 2009) und können wie Gedächtnis T Zellen durch gleichzeitige Stimulation des TCR, von CD28 und des IL-12 Rezeptors wieder reaktiviert werden. Die Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen können weiterhin in lymphatische Organe einwandern und durch Generierung neuer Effektor T Zellen effektiv an der Bekämpfung von Infektionen unter inflammatorischen Bedingungen beteiligt sein (Böttcher et al., 2013).

Der Differenzierung dieser Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen durch LSEC geht ein sehr früher, jedoch vorübergehender Gewinn zytotoxischer Effektorfunktionen voraus (Böttcher et al., 2014). Dies wird unabhängig von kostimulatorischen oder konventionellen inflammatorischen Signalen durch IL-6 Trans-Signalübertragung initiiert. Im Gegensatz zur klassischen IL-6-Signalübertragung, bei der IL-6 an den membranengebundenen IL-6 Rezeptor (IL-6R) bindet und mit diesem als Komplex mit dem Membran-Protein gp130 assoziiert, muss die Zielzelle bei der IL-6 Trans-Signalübertragung keinen IL-6 Rezeptor exprimieren. Vielmehr kann hier ein Komplex aus löslichem IL-6R (sIL-6R²⁸) und IL-6 direkt an membrangebundenes gp130 binden und als proinflammatorisches Signal wirken. Die Expression des IL-6R ist nur auf wenige Zellen, darunter auch LSEC, beschränkt. CD8⁺ T Zellen exprimieren keinen IL-6R und sind nicht in der Lage Signale über die klassische IL-6-Signalübertragung zu empfangen (Rose-John, 2012). Das Protein gp130 ist im Gegensatz zu dem IL-6R ubiquitär auf Zellen vorhanden und kann bei Interaktion mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex dimerisieren und eine intrazelluläre Signalkaskade über STAT3 initiieren (Böttcher et al., 2014; Nowell et al., 2009; Rose-John, 2012). Eine Beteiligung des löslichen IL-6/sIL-6R-Komplexes bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Vielmehr bindet IL-6, das LSEC während der Kreuzpräsentation produzieren, an den membrangebundenen IL-6R dieser Endothelzellen. Der Komplex aus IL-6 und membranständigen IL-6R in Trans kann mit gp130 auf naiven CD8⁺ T Zellen während der Induktion interagieren und den beobachteten frühen Gewinn der Zytotoxizität unabhängig von der Proliferation der Zellen hervorrufen. Die LSEC-induzierten T Zellen exprimieren dabei Granzym B und üben zytotoxische Funktionen aus, jedoch erfolgt keine signifikante

²⁸ Engl.: soluble IL-6R

Expression der Effektor-assoziierten Zytokine $\text{IFN}\gamma$, IL-2 und TNF (Böttcher et al., 2014). Granzym B ist eine Serinprotease, die zusammen mit dem Poren-formenden Protein Perforin in den zytotoxischen Granula von T Zellen und NK Zellen vorkommt. Bei Ausschüttung dieser Granula wird durch Granzym B und Perforin die Apoptose der Zielzelle induziert (Pipkin and Lieberman, 2007; Trapani and Smyth, 2002; Wowk and Trapani, 2004).

Der Mechanismus der LSEC-vermittelten IL-6-Trans Signalübertragung ist in Abb. 1.6.4 graphisch dargestellt.

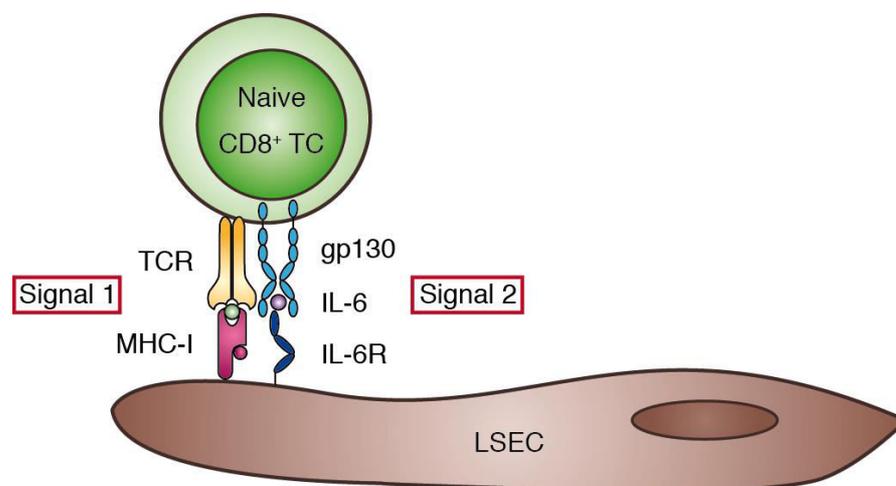


Abbildung 1.6.4: Die Induktion von CD8^+ T Zellen durch LSEC mit Hilfe der IL-6 Trans-Signalübertragung. Für die LSEC-induzierte frühe Granzym-B-Expression von CD8^+ T Zellen (CD8^+ TC^{29}) sind zwei Signale essenziell. Die Antigen-spezifische Interaktion des TCR mit dem Peptid/MHC-I Komplex auf APC ist als „Signal 1“ die Grundvoraussetzung für die Aktivierung der T Zellen. Durch Interaktion mit dem auf LSEC in Trans vorhandenen IL-6/IL-6R Komplex kann gp130 auf den T Zellen dimerisieren. Auf diese Weise wird durch die IL-6 Trans-Signalübertragung als „Signal 2“ die frühe Granzym-B-Expression der T Zellen ermöglicht. Modifiziert nach (Lambotin et al., 2010; Rose-John, 2012).

1.6.5 Die Interaktion von CD4^+ T Helferzellen mit LSEC

LSEC exprimieren, wenn auch nur in geringen Mengen, konstitutiv MHC-II (Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010) und interagieren mit CD4^+ T Zellen, die in die Leber migrieren (Carambia et al., 2013; Klugewitz et al., 2002b). Sie können Antigene ohne vorherige Reifung CD4^+ T Zellen präsentieren, jedoch werden dafür große Konzentrationen an Antigenen benötigt. Dies ist im Vergleich zu professionellen APC eher ineffizient und begünstigt die Bildung von Zellen mit einem T_H2 (Klugewitz et al., 2002a;

²⁹ Engl.: T cell

Knolle et al., 1999b) oder einem regulatorischen Phänotyp (Carambia et al., 2014; Kruse et al., 2009). Es tritt aber keine klonale Eliminierung der Zellen auf (Knolle et al., 1999b). Die Fähigkeit zur Stimulation von CD4⁺ T Zellen wird nach Endotoxin-Kontakt durch die verminderte Expression von CD80/86 und MHC-II weiterhin verringert (Knolle et al., 1999a; Uhrig et al., 2005). Aufgrund der fehlenden Expression von IL-12 sind LSEC außerdem nicht in der Lage, eine Differenzierung in Richtung von T_h1 Zellen einzuleiten (Knolle et al., 1999b). LSEC hemmen nach mehrtägiger Kokultur die Zytokin-Sekretion bereits differenzierter proinflammatorischer T Helferzellen. Dies wird durch IL-10-abhängige Regulation kostimulatorischer Moleküle und die Expression von PD-L1 vermittelt (Carambia et al., 2013). Die sehr frühe Zytokinsekretion von T Helferzellen nach Kontakt mit LSEC muss davon jedoch nicht notwendigerweise betroffen sein. LSEC können weiterhin die Expression von IL-10 in sich entwickelnden T_h1 Zellen direkt Notch-abhängig induzieren und so eine inflammatorische T_h1-vermittelte Immunantwort trotz IFN γ -Expression dieser Zellen inhibieren (Neumann et al., 2015). Es scheint jedoch, dass die Interaktion von LSEC und T Helferzellen potenziell abhängig von inflammatorischen Bedingungen moduliert werden kann, da T_h1 und T_h17 Zellen auch eine Beteiligung an inflammatorischen Lebererkrankungen nachgewiesen werden konnte (Lafdil et al., 2010; Nishimura and Ohta, 1999; Tiegs, 2007). Unter inflammatorischen Bedingungen konnten weiterhin durch Hilfe von CD4⁺ Helferzellen verstärkte zytolytische Eigenschaften von CD8⁺ T Zellen nachgewiesen werden (Derkow et al., 2011). Eine Beteiligung von CD4⁺ T Zellen an der Bekämpfung hepatischer Infektionen durch Hilfe bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen ist ebenfalls bekannt (Grakoui et al., 2003; Provine et al., 2014). Die Hilfe von CD4⁺ T Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC unter homöostatischen Bedingungen ist daher nicht ausgeschlossen und könnte eine neue, bisher noch nicht bekannte Helfer-Funktion von T_h1 Zellen darstellen.

2 Ziele der Arbeit

Naive CD8⁺ T Zellen gelangen unter homöostatischen Bedingungen durch LSEC-vermittelte Induktion nach initialer Proliferation in eine Art „Ruhe-Status“, was lange Zeit als Toleranz gedeutet wurde. Tatsächlich können diese Zellen wie Gedächtnis T Zellen wieder reaktiviert werden. LSEC induzieren durch IL-6 Trans-Signalübertragung die sehr frühe, jedoch nur vorübergehende Expression von Granzym B, welche der Differenzierung der CD8⁺ T Zellen zu Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen vorausgeht.

Im Vergleich zu anderen lymphatischen Geweben enthält die Leber deutlich mehr T Zellen, die bereits zu Effektor- oder Gedächtniszellen differenziert sind. Dazu gehören auch T_h1 Zellen, die verstärkt in die Leber rekrutiert werden. LSEC hemmen unter homöostatischen Bedingungen nach mehrtägiger Kokultur Effektorfunktionen von T Helferzellen. Dies kann jedoch abhängig von inflammatorischen Bedingungen moduliert werden. Virus-spezifische CD4⁺ T Zellen sind effektiv an der Bekämpfung hepatischer Infektion beteiligt, was auch über Hilfe bei der Induktion Virus-spezifischer CD8⁺ T Zellen geschieht. Bisher war jedoch nicht geklärt, ob T_h1 Zellen auch unter homöostatischen Bedingungen eine Helfer-Funktion bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC besitzen.

Das besondere Augenmerk lag daher auf den folgenden zentralen Fragestellungen:

- Können T_h1 Zellen die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC unter homöostatischen Bedingungen unterstützen?
- Welchen Effekt hat die potenzielle Hilfe von T_h1 Zellen?
- Ist dieser Effekt LSEC- und Antigen-spezifisch?
- Wie wird die mögliche Helfer-Funktion vermittelt?
- Wie genau erfolgt die Interaktion von LSEC und T_h1 Zellen? Führt die Interaktion zu einer Aktivierung beider Zellpopulationen?
- Welche Bedeutung hat IL-2 für die Hochregulation von Granzym B durch IL-6 Trans-Signalübertragung?

Für die Beantwortung dieser Fragen wurden *in vitro*-Kokultur Experimente mit LSEC, naiven CD8⁺ T Zellen und T_h1 Zellen durchgeführt. Die Versuchsbedingungen wurden dabei auf die spezifischen Fragestellungen hin angepasst.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

AutoMACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Bio-Plex® 200 System	Bio-Rad (München)
Durchflusszytometer	Canto II; LSR Fortessa, Becton, Dickinson and Company (BD) (Heidelberg)
ELISA Lesegerät	Mithras LB 940, Berthold Technologies(Bad Wildbach) Safire ² , Tecan (Männedorf, Schweiz)
Küvette, Quarzglas	10mm Suprasil, Hellma (Mühlheim)
Magnet	Dynal MPC TM -15, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Metallsieb	Universität Bonn, Feinmechanik
Mikroskop	IX71, Olympus (Hamburg)
Mikrotiterplattenwaschhilfe	NalgeNunc International, über neoLab (Heidelberg)
Perfusionspumpe	Masterflex, Cole-Parmer Instrument Company über Novodirect (Kehl/Rhein)
pH-Meter	pH523, WTW (Weilheim)
Schüttelwasserbad	GFL®1092, GFL® (Burgwedel)
Spektralphotometer	Ultrospec 3100pro, AmershamBioscience (Piscataway, USA) NanoDrop TM ND 1000, NanoDrop Products (Wilmington, USA)
Thermocycler	C100 TM Thermal Cyclcer, Bio-Rad (München)
Zählkammer	Neubauer, La Fontaine über Labotec (Göttingen)

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton ((CH ₃) ₂ CO)	Applichem (Darmstadt)
Accutase	PAA (Pasching, Österreich)
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Biotin	Serva (Heidelberg)
Brefeldin A	eBioscience (San Diego, USA)
Calciumchlorid (CaCl ₂ *2 H ₂ O)	Merck(Darmstadt)
D(-)-Fruktose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D(+)-Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DMEM-Medium	Gibco, BRL (Karlsruhe)
EDTA (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₈)	Roth (Karlsruhe)
Eisen(III)Nitrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol, absolut (C ₂ H ₄ O ₂)	Applichem (Darmstadt)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, (Pasching, Österreich)
GBSS	PAA, (Pasching, Österreich)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
IMDM-Medium	PAN Biotech (Aidenbach)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Gerbu, Gaiberg
L-Alanin (C ₃ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Aspartat (C ₄ H ₈ NO ₄)	Merck (Darmstadt)
L-Cystein (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Glutamat (C ₅ H ₉ NO ₄)	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin (200mM, C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃)	Cambrex (Verviers, Belgien)
L-Serin (C ₃ H ₇ NO ₃)	Merck (Darmstadt)
L-Threonin (C ₄ H ₉ NO ₃)	Merck (Darmstadt)
L-Tyrosin (C ₉ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lipopolysaccharid (LPS; <i>E.coli</i>)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ *6 H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (50 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Monensin	eBioscience (San Diego, USA)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Nycodenz	Axis-Shield (Norwegen)
Pancoll	PAN Biotech (Aidenbach)
OVA ₃₂₃₋₃₃₉ Peptid	Pineda (Berlin)
Ovalbumin (OVA)	Serva (Heidelberg)
Paraformaldehyd (PFA, H(-OCH ₂) _n -OH)	Fluca (Buchs)
PBS	Biochrom (Berlin)
Penicillin (10,000U/ml)/Streptomycin(10mg/ml)	PAA (Pasching, Österreich)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL (Karlsruhe)
Saccharose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Applichem (Darmstadt)
Stickstoff, flüssig	Linde (Wiesbaden)
TMB-Substrat für ELISA	Pierce (Bonn)
Trypanblau	Serva (Heidelberg)
Tween-20	Merck (Darmstadt)
Vitamin B12	Serva (Heidelberg)
β-Mercaptoethanol (HS(CH ₂) ₂ OH)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

3.1.3 Allgemeine Lösungen

3.1.3.1 Puffer

EDTA (0,5M)	186,1 g EDTA ca. 20 g NaOH 1000 ml H ₂ O pH 7,8-8,0
ELISA-Bindungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,2
ELISA-Blockierungspuffer	0,5 % (w/v) BSA in PBS
ELISA-Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS
FACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS 2 mM EDTA
FACS-Fixierungspuffer	PBS 2 % (w/v) D(+)-Glukose 0,02 % (w/v) Natriumazid 1 % (v/v) Formaldehyd
GBSS (Gey's balanced salt solution) (für Nycodenz-Lösung)	5 mM KCl 1,6 mM CaCl ₂ 0,9 mM MgCl ₂ 0,3 mM MgSO ₄ 0,2 mM KH ₂ PO ₄ 1,7 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4) 2,7 mM NaHCO ₃ 5,5 mM D(+)-Glukose 50 mM HEPES pH 7,4

MACS-Puffer	<p>PBS</p> <p>1 % (v/v) FCS</p> <p>2 mM EDTA</p> <p>pH 7,2</p>
PBS	<p>80 g/l NaCl</p> <p>0,2 g/l KCl</p> <p>1,44 g/l NaHPO₄*2 H₂O</p> <p>0,2 g/l KH₂PO₄</p> <p>pH 7,4</p> <p>(Fa. Biochrom)</p>
Perfusionspuffer für LSEC-Isolation	<p>0,01 g L-Aspartat</p> <p>0,02 g L-Threonin</p> <p>0,03 g L-Serin</p> <p>0,04 g Glycin</p> <p>0,05 g L-Alanin</p> <p>0,13 g L-Glutamat</p> <p>0,13 g L-Glutamin</p> <p>3,6 g D(+)-Glukose</p> <p>3,6 g D(-)-Fruktose</p> <p>67,4 g Saccharose</p> <p>0,22 g KCl</p> <p>0,1 g NaH₂PO₄* H₂O</p> <p>0,1 g MgCl₂*6 H₂O</p> <p>2,4 g HEPES</p> <p>2,0 g NaHCO₃</p> <p>1000 ml H₂O</p> <p>0,05 % (v/v) Kollagenase</p>
Perfusionspuffer zur Isolation von Milz DC	<p>GBSS</p> <p>0,5 % (v/v) Kollagenase</p>
Permeabilisierungspuffer	<p>ebioscience (San Diego, USA)</p>

Trypanblau-Lösung 10 % (v/v) Trypanblau in PBS

3.1.3.2 Zellkulturmedien

LSEC-Medium DMEM High Glucose (4500 mg/l)
10 % (v/v) FCS
10⁵ U Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin
2 mM L-Glutamin

T Zell-Medium für CD4⁺ T Zellen IMDM
44 mM NaHCO₃
110 mM NaCl
5,4 mM KCl
0,12 mM L-Cystein
0,4 mM L-Glutamat
0,45 mM L-Tyrosin
0,08 µM Biotin
0,015 µM Vitamin B12
0,4 µM Eisen(III)Nitrat
12,5 mM Hepes
10 % (v/v) FCS
10⁵ U Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin
2 mM L-Glutamin
50 µM β-Mercaptoethanol

T Zell-Medium für CD8⁺ T Zellen RPMI 1640
10 % (v/v) FCS
10⁵ U Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin
2 mM L-Glutamin
50 µM β-Mercaptoethanol

3.1.4 Kit Systeme

Alle Kit Systeme wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

CD8 α T Cell Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience (San Diego, USA)
LIVE/DEAD Fixable NearIR Dead Cell Stain Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Naive CD4 α T Cell Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay Kit	eBioscience (San Diego, USA)

3.1.5 Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende gegen murine Epitope gerichtete Antikörper verwendet. Diese waren für die Durchflusszytometrie oder ELISA mit Biotin oder einem Fluorochrom (FITC, PE, BV421, BV605, BV650, PerCP-Cy5.5, PerCP-eFluor® 710, PE-Cy7, APC, AlexaFluor 647, AlexaFluor 450, AlexaFluor 405) konjugiert. Für funktionale Anwendungen wurden unkonjugierte Antikörper eingesetzt.

FACS-Antikörper:

Antigen	Isotyp	Klon	Kommentar	Hersteller
CD3 ϵ	IgG1 κ , Hamster	145-2C11		eBioscience (San Diego, USA)
CD4	IgG2b κ , Ratte	GK1.5		BioLegend (Fell)
CD8 α	IgG2a κ , Ratte	53-6.7		BD (Heidelberg) und eBioscience (San Diego, USA)
CD11b	IgG2b κ , Ratte	M1/70		BioLegend (Fell)
CD11c	IgG, Arm Hamster	N418	= Integrin α X	eBioscience (San Diego, USA)
CD16/32	IgG2b κ , Ratte	2.4G2	= anti-FcR γ II + III	Eigene Herstellung
CD19	IgG2a κ , Ratte	eBio1D3		eBioscience (San Diego, USA)

Antigen	Isotyp	Klon	Kommentar	Hersteller
CD25	IgG1 κ, Ratte	PC61.5	= IL-2 Rezeptor α-Kette	eBioscience (San Diego, USA)
CD44	IgG2b κ, Ratte	IM7		eBioscience (San Diego, USA)
CD45.1	IgG2a κ, Maus	A20		eBioscience (San Diego, USA)
CD45.2	IgG2a κ, Maus	104		eBioscience (San Diego, USA)
CD54	IgG2b κ, Ratte	YN1/1.7.4	= ICAM-1	eBioscience (San Diego, USA)
CD90.1	IgG1 κ, Maus	OX-7	= Thy1.1	BioLegend (Fell)
CD90.2	IgG2a κ, Ratte	53-2.1	= Thy1.2	eBioscience (San Diego, USA)
CD106	IgG2a κ, Ratte	429	= VCAM-1	eBioscience (San Diego, USA)
CD146	IgG2a, Ratte	ME9F1		Eigene Herstellung
F4/80	IgG2a κ, Ratte	BM8		eBioscience (San Diego, USA)
GATA-3	IgG2b κ, Ratte	TWAI		eBioscience (San Diego, USA)
Granzym B	IgG1, Maus	GB11	anti-human, kreuzreaktiv mit Maus	Invitrogen (Karlsruhe)
H-2K ^b	IgG2a κ, Maus	AF6-88.5		BioLegend (Fell)
I-A ^b	IgG2a κ, Maus	AF6-120.1		BioLegend (Fell)
IFNγ	IgG1 κ, Ratte	XMG1.2		BioLegend (Fell)
IRF4	IgG1 κ, Ratte	3E4		eBioscience (San Diego, USA)
RORγT	IgG1 κ, Ratte	B2D		eBioscience (San Diego, USA)
T-bet	IgG1, Maus	eBio4B10		eBioscience (San Diego, USA)
TNF	IgG1 κ, Ratte	MP6-XT22		BioLegend (Fell)

Antigen	Isotyp	Klon	Kommentar	Hersteller
V α 2	IgG2a, Ratte	B20.1		eBioscience (San Diego, USA)
V β 5	IgG1 κ , Maus	MR9-4		BioLegend (Fell)
Isotyp- Antikörper	IgG1 κ , Ratte	eBRG1		eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp- Antikörper	IgG1 κ , Ratte	RTK2071		BioLegend (Fell)
Isotyp- Antikörper	IgG2a κ , Ratte	R35-95		BD (Heidelberg)
Isotyp- Antikörper	IgG2b κ , Ratte	eB149/ 10H5		eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp- Antikörper	IgG1, Maus	P3.6.2.8.1		eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp- Antikörper	IgG1, Maus			Invitrogen (Karlsruhe)
Isotyp- Antikörper	IgG2a κ , Maus	eBM2a		eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp- Antikörper	IgG1, Hamster	ebio299arm		eBioscience (San Diego, USA)

Tabelle 3.1.5.1: FACS-Antikörper, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

ELISA-Antikörper:

Antigen	Isotyp	Klon	Konjugation	Hersteller
IFN γ	IgG1 κ , Ratte	R4-6A2	unkonjugiert	eBioscience (San Diego, USA)
IFN γ	IgG1 κ , Ratte	XMG1.2	biotinyliert	eBioscience (San Diego, USA)
IL-2	IgG2a κ , Ratte	JES6-1A12	unkonjugiert	eBioscience (San Diego, USA)
IL-2	IgG2b κ , Ratte	JES6-5H4	biotinyliert	eBioscience (San Diego, USA)
IL-6	IgG1 κ , Ratte	MP5-20F3	unkonjugiert	eBioscience (San Diego, USA)

Antigen	Isotyp	Klon	Konjugation	Hersteller
IL-6	IgG2a κ , Ratte	MP5-32C11	biotinyliert	eBioscience (San Diego, USA)

Tabelle 3.1.5.2: ELISA-Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Funktionale-Antikörper:

Antigen	Isotyp	Klon	Kommentar	Hersteller
NK1.1	IgG2a κ , Maus	PK136	Für <i>in vivo</i> Depletion	Eigene Herstellung
IFN γ	IgG1 κ , Ratte	XMG1.2		Eigene Herstellung
IL-2	IgG2a κ , Ratte	JES6-1A12		eBioscience (San Diego, USA)
IL-4	IgG1 κ , Ratte	11B11		eBioscience (San Diego, USA)
IL-6	IgG1 κ , Ratte	MP5-20F3		eBioscience (San Diego, USA)
Sgp130Fc			Siehe (Jostock et al., 2001)	Von S. Rose-John, Kiel
CD25	IgG1 λ , Ratte	PC61.5		Eigene Herstellung
Isotyp- Antikörper	IgG2a κ , Ratte	eBR2a		eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp- Antikörper	IgG1 κ , Ratte	eBRG1		eBioscience (San Diego, USA)

Tabelle 3.1.5.3: Funktionale Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* verwendet wurden.**3.1.6 Antikörper-beschichtete Partikel**

anti-CD11c (MACS)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti-CD146 (MACS)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti-CD3/anti-CD28 (CD3/CD28)	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.7 Enzyme

Accutase	PAA (Pasching, Österreich)
Kollagenase	Sigma (Steinheim) und Roche (Basel, Schweiz)
Peroxidase	Pierce (Rockford, USA)

3.1.8 Zytokine

Hyper-IL-6	Von S. Rose-John, Kiel
Interferon- γ (IFN γ)	Peprotech (Rocky Hill, USA)
Interleukin-2 (IL-2, Proleukin)	Novartis (Basel, Schweiz)
Interleukin-4 (IL-4)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Interleukin-6 (IL-6)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Interleukin-12 (IL-12)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)

3.1.9 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.

Mauslinie	Beschreibung
C57BL/6	Inzuchtstamm mit dem MHC I Haplotyp H-2K ^b (Wildtyp-Mäuse).
CD45.1	Die Immunzellen dieser Tiere exprimieren das Allel CD45.1 des Moleküls CD45, das spezifisch angefärbt und als kongener Marker zur Unterscheidung von Immunzellen aus C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (CD45.2) benutzt werden kann (Mardiney and Malech, 1996).
CD45.1 x OT-I	Kreuzung der OT-I Mauslinie mit der CD45.1 Mauslinie auf C57BL/6 Hintergrund.

Mauslinie	Beschreibung
CD45.1 x OT-II	Kreuzung der OT-II Mauslinie mit der CD45.1 Mauslinie auf C57BL/6 Hintergrund.
CD90.1 x OT-I	Kreuzung der OT-I Mauslinie mit der CD90.1 Mauslinie auf C57BL/6 Hintergrund (B6.PL-Thy1 ^a /CyJ, bezogen von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)). Die Lymphozyten dieser Tiere exprimieren das Allel CD90.1 des Moleküls CD90, das spezifisch angefärbt und als kongener Marker zur Unterscheidung von Lymphozyten aus C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (CD90.2) verwendet werden kann.
I-Ab ^{-/-}	MHC-II Knockout-Stamm auf C57BL/6 Hintergrund (Madsen et al., 1999).
OT-I	Mauslinie mit transgenem T Zell Rezeptor, welcher von CD8 ⁺ T Zellen exprimiert wird. Dieser TCR erkennt das OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid (SIINFEKL) auf H-2K ^b Molekülen (Hogquist et al., 1994).
OT-II	Mauslinie mit transgenem T Zell Rezeptor, welcher von CD4 ⁺ T Zellen exprimiert wird. Dieser TCR erkennt das OVA ₃₂₃₋₃₃₉ Peptid auf I-Ab Molekülen (Barnden et al., 1998).

Tabelle 3.1.9.1: Mauslinien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

3.1.10 Computersoftware

Software	Anwendung	Hersteller
Bio-Plex Manager™	Analyse von ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays	Bio-Rad (München)
Excel 2011	Datenanalyse	Microsoft
FACS Diva V8.0.1	Analyse von durchfluss- zytometrischen Daten und FACS (siehe Abschnitt 3.2.5)	BD (Heidelberg)
Flowjo V 8.8.7	Analyse von durchfluss- zytometrischen Daten	Tree star, Inc.
Illustrator CS 6	Graphische Aufbereitung	Adobe

Magellan 6	Analyse von ELISA-Daten	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Microwin 2000 V4.37	Analyse von ELISA-Daten	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath
Photoshop CS 6	Graphische Aufbereitung	Adobe
Prism 5	Datenanalyse und Statistik	GraphPad
Word 2011	Dokumentation der Ergebnisse	Microsoft

Tabelle 3.1.10.1: Computersoftware, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation primärer muriner Zellen

Zur Isolation von LSEC wurden Mäuse im Alter von 6-30 Wochen verwendet, für alle anderen Aufreinigungen Tiere im Alter von 6-14 Wochen. Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation oder durch schrittweise Kohlendioxidexposition getötet. Die Tiere wurden mit 70 % Ethanol oberflächlich gesäubert und anschließend wurden, wie im Folgenden beschrieben, verschiedene Gewebe entnommen.

3.2.1.1 Isolation von primären Zellen durch magnetische Separation (MACS)

Die Zellen wurden zur magnetischer Separation zunächst in einem definierten Volumen MACS-Puffer aufgenommen und Zelltyp-spezifische paramagnetische MACS-Partikel hinzugefügt (200-500 µl MACS-Puffer + 25-50 µl MACS-Partikel pro 1×10^8 Zellen). Bei der Durchführung von Positiv-Selektionen (LSEC, DC) wurden die Zellen nach 15 Min. Inkubation bei 4 °C mit MACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene MACS-Partikel zu entfernen (Zentrifugation 5 Min., 300 g, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in MACS Puffer resuspendiert, über ein Nylonsieb vereinzelt und mit dem Programm „POSSEL“ am AutoMACS aufgereinigt.

Die Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen erfolgte mittels einer zweistufigen Negativ-Selektion. Hierfür wurden die Milzsuspensionszellen zuerst für 5 Min. bei 4 °C mit einem Biotin-Antikörpercocktail (200-400 µl MACS-Puffer + 50-100 µl/1x10⁸ Zellen) inkubiert und danach für weitere 10 Min. mit anti-Biotin MACS-Partikeln (150-300 µl MACSPuffer + 100-200 µl/1x10⁸ Zellen) inkubiert. Nach einem Waschschrift und dem vereinzeln der Zellen mittels Nylonsieb erfolgte die Aufreinigung der T Zellen über das Programm „DEplete“ am AutoMACS.

3.2.1.2 Aufreinigung von LSEC aus der Leber

Zu Beginn der Isolation von LSEC wurden Lebern von Wildtyp oder I-Ab^{-/-} Mäusen perfundiert. Hierfür wurde zunächst eine Kanüle in die Pfortader (Vena porta) eingeführt. Nach Durchtrennung der Vena cava wurden die Lebern mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/Min. für etwa 10-20 s mit Perfusionspuffer perfundiert. Anschließend wurde die Gallenblase entfernt, die Lebern entnommen und bis zur weiteren Aufreinigung 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 in GBSS für 15 Min. bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein Metallsieb gedrückt, mit GBSS gewaschen und zentrifugiert (10 Min., 480 g, 20 °C). Mittels Dichte-Zentrifugation wurden dann Parenchymzellen von der Zellsuspension abgetrennt. Hierfür wurde das Zellgemisch im Verhältnis 1:1,23 in 30 % (w/v) Nycodenz resuspendiert und in ein 15 ml Einmalröhrchen überführt. Dann wurde mit 500 µl GBSS überschichtet und bei 1400 g und 20 °C für 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase in MACS-Puffer gewaschen und CD146⁺ Zellen mittels magnetischer Zellseparation (siehe Abschnitt 3.2.1.1) isoliert. Nach der Separation wurde die Zellzahl der reinen LSEC-Fraktion bestimmt, die Zellen wurde zentrifugiert und in der entsprechenden Menge LSEC-Medium (1x10⁶ Zellen/ml) aufgenommen. Die Kultivierung der LSEC erfolgte in Kollagen-beschichteten 48 Well-Platten (3,5x10⁵ Zellen/Well). Die Zellen wurden 24 h nach der Isolation mit warmem PBS + 1 % FCS gewaschen und an Tag drei nach der Isolation für Experimente eingesetzt. Für FACS-Analysen wurden LSEC mit Hilfe von Accutase von den Zellkultur-Platten abgelöst und bis zur Färbung in MACS-Puffer aufgenommen.

3.2.1.3 Isolation von T Zellen aus der Milz

Zur Isolation von CD4⁺ T Zellen wurden CD45.1 (Wildtyp TCR), CD45.1 x OT-II oder OT-II (OVA-spezifischer transgener TCR) Mäuse verwendet. Die Aufreinigung von CD8⁺ T Zellen erfolgte aus Milzen von CD45.1 x OT-I, CD90.1 x OT-I oder OT-I Mäusen. Nach der Entnahme der Milzen wurden diese mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, mit PBS gewaschen und die T Zellen über Nylonwolle angereichert. Hierfür wurden die Zellen (1 Milz + 2,5 ml Medium in 5 ml Spritze mit 0,3 g Nylonwatte, 2-3 Milzen + 6 ml Medium in 10 ml Spritze mit 0,6 g Watte) in T Zell-Medium aufgenommen und in eine mit Nylonwolle gefüllte Spritze gegeben. Diese wurde zuvor zum Blockieren von unspezifischen Bindungen für 30 Min. bei 37 °C mit T Zell-Medium inkubiert. Nach Auftragung der Zellsuspension wurde die Spritze verschlossen, mit warmem T Zell-Medium aufgefüllt und für 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Die nicht-adhärennten T Zellen wurden anschließend mit warmem T Zell-Medium eluiert. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 Min., 480 g, 20 °C) und die T Zellen durch MACS Negativ-Selektion (siehe Abschnitt 3.2.1.1) isoliert. Bei der Aufreinigung von naiven CD4⁺ T Zellen zur Differenzierung in T_h1 oder T_h2 Zellen wurde nach der Negativ-Selektion noch eine MACS Positiv-Selektion (siehe Abschnitt 3.2.1.1) mit anti-CD44-beschichteten Partikeln aus dem "Naive CD4 α T cell isolation kit" durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Reinheit der Zellisolation wurde durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von Zellen, die CD11c, CD11b, F4/80, CD19 und I-A^b exprimieren, hin untersucht.

Bei der Isolation von CD8⁺ T Zellen für Kokulturversuche mit LSEC oder DC und T_h1 Zellen wurde den entsprechenden Mäusen zwei Tage vor der Organentnahme 300 μ g anti-NK1.1-Antikörper intraperitoneal (i.p.) gespritzt.

3.2.1.4 Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz

Die Isolation von DC erfolgte aus den Milzen von Wildtyp Mäusen. In die entnommenen Milzen wurde mit einer Kanüle GBSS mit 0,04 % (w/v) Kollagenase injiziert, woraufhin die Organe 20 Min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen über ein Metallsieb vereinzelt, in 50 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (10 Min., 480 g, 20 °C). CD11c⁺ Zellen wurden mit Hilfe von magnetischer Zellseparation

(siehe Abschnitt 3.2.1.1) isoliert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die DCs pelletiert (10 Min., 480 g, 20 °C) und in T Zell-Medium aufgenommen.

3.2.2 Bestimmung von Zellzahlen

Die jeweilige Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 oder 1:20 mit Trypanblau-Lösung gemischt. Hiervon wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen der Zellen in den vier großen Eckquadraten. Bei der Zählung wurden nur vitale, also nicht blau gefärbte Zellen berücksichtigt. Die Zellzahl ergab sich nach der Formel:

$$\text{GZ} \left[\frac{1}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{LZ}}{4} \times \text{VF} \times 10^4 \text{ [KF]}$$

GZ	Gesamtzahl der Zellen
LZ	gezählte lebende Zellen
VF	Verdünnungsfaktor
KF	Kammerfaktor

3.2.3 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter den folgenden Bedingungen kultiviert: 37 °C, relative Luftfeuchtigkeit 90 %, CO₂-Gehalt 5 %.

3.2.3.1 Differenzierung von T_h1 und T_h2 Zellen

Zur Generierung von T_h1 und T_h2 Zellen wurden CD4⁺CD44^{niedrig/-} Zellen aus Milzen von CD45.1, CD45.1 x OT-II oder OT-II Mäusen aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Die Differenzierung erfolgte nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmitt und Prof. Dr. Bopp (Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Jeweils 1x10⁶ Zellen wurden für drei Tage in 1 ml CD4⁺ T Zell-Medium mit CD3/CD28 Partikeln (nach

Herstellerangaben) stimuliert. Für die Differenzierung zu T_h1 Zellen wurden weiterhin 3000 U/ml IL-12, 1000 U/ml IL-2 (Proleukin) und 10 µg/ml IL-4 neutralisierender Antikörper zugesetzt. T_h2 Zellen wurden durch weitere Zugabe von 1000 U/ml IL-4, 100 U/ml IL-6 und 20 µg/ml IFN γ -neutralisierenden Antikörper generiert. An Tag drei wurden die CD3/CD28 Partikel mit einem Magneten abgetrennt und die Zellen 1:2 bis 1:3 in frischem Medium gesplittet. Das Medium enthielt für T_h1 Zellen zusätzlich 1000 U/ml IL-2 und für Th2 Zellen 100 U/ml IL-6, 200 U/ml IL-4 und 100 U/ml IL-2. Nach fünf Tagen Differenzierung wurden die Zellen geerntet und tote Zellen mit Hilfe eines Gradienten (siehe Abschnitt 3.2.3.2) entfernt. Der Erfolg der Differenzierung wurde durchflusszytometrisch durch Färbung der Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 und durch Färbung der Zytokine IFN γ und TNF nach Restimulation kontrolliert.

3.2.3.2 Gradient zur Präparation von Lymphozyten

Die Zielzellen wurden durch gründliches Resuspendieren der entsprechenden Wells mit PBS geerntet und in ein 50 ml Einmalröhrchen überführt, welches mit PBS aufgefüllt wurde. Nach einer Zentrifugation (10 Min., 480 g, 20 °C) wurden die Zellen in 5 ml PBS resuspendiert und dieses mit 2 ml Lymphozyten Separationsmedium bzw. Pancoll unterschichtet. Nach der Gradientenzentrifugation (10 Min., 850 g, 20 °C, ohne Bremse) wurde die Interphase abgenommen und in 50 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 10 Min., 350 g, 20 °C). Die so gewonnenen T Zellen wurden in T Zell-Medium für den weiteren Versuchsverlauf aufgenommen und gezählt.

3.2.3.3 Kokultur Experimente

Für die im Folgenden beschriebene Kokultur wurden jeweils CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen mit unterschiedlichen kongenen Markern verwendet, sodass eine zuverlässige Trennung der Zellen bei der späteren durchflusszytometrischen Analyse möglich war.

2x10⁵ CD8⁺ OT-I T Zellen und je nach Versuch 1x10⁵ Wildtyp oder OT-II T_h1 Zellen wurden in 1 ml T Zell-Medium (RPMI) auf Antigen präsentierenden Zellen inkubiert. Als Negativkontrolle dienten dabei Kulturen ohne APCs. Bei den Antigen-präsentierenden Zellen handelte es sich um frisch isolierte DC aus der Milz von Wildtyp Mäusen

($1,5 \times 10^6$ /Well) oder *in vitro* kultivierte LSEC ($1,5 \times 10^6$ /Well), welche 72 h zuvor ausplattiert worden waren. Zur Antigen-spezifischen Stimulation von OT-I und OT-II T Zellen wurden die APC 1 h vor Beginn der Kokultur mit 0,1 mg/ml OVA in 300 μ l T Zell-Medium vorinkubiert, weiterhin wurde 1 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉/ml T Zell-Medium zur optimalen Stimulation der OT-II T_h1 Zellen zugesetzt. In der vorliegenden Arbeit ist dies durch die Bezeichnung „Antigen“ angezeigt. Nach 18 h wurden die T Zellen für die weitere Analyse aus der Kokultur geerntet. Für FACS-Analysen wurden die Zellen dabei in den Wells mehrfach resuspendiert und in 96 Well-Platten zur Antikörper Färbung transferiert.

Bei Kokultur Experimenten, in denen als Medium Zellkultur-Überstände (siehe Abschnitt 3.2.3.4) verwendet wurden, erfolgte bereits die Vorinkubation mit Antigen unter Verwendung der entsprechenden Überstände. Die T Zellen wurden in möglichst wenig Medium aufgenommen und der Kokultur zugesetzt, sodass möglichst viel des Mediums aus den entsprechenden Überständen bestand.

3.2.3.4 Generierung von Zellkultur-Überständen

Die Zellkultur-Überstände von LSEC und T_h1 Zellen wurden analog zu den in Abschnitt 3.2.3.3 beschriebenen experimentellen Bedingungen generiert. Dafür wurden LSEC für 18 h mit T_h1 Zellen in Anwesenheit von Antigen (OVA und OVA₃₂₃₋₃₃₉ oder OVA₃₂₃₋₃₃₉) oder ohne Stimulus kultiviert.

Die Generierung von Überständen aus der Kultur von LSEC alleine erfolgte ebenfalls unter den in 3.2.3.3 beschriebenen Bedingungen. Die LSEC wurden entweder mit Antigen (OVA und OVA₃₂₃₋₃₃₉), mit 10 ng/ml LPS oder ohne Stimulus für 18 h inkubiert.

Weiterhin wurden Überstände aus der Stimulation von T_h1 Zellen mit CD3/CD28-beschichteten Partikeln generiert. Dafür wurden 1×10^5 T_h1 Zellen mit 2,5 μ l CD3/CD28-beschichteten Partikeln (nach Herstellerangaben) in 1ml RPMI T Zell-Medium in einer 48 Well-Platte für 18 h kultiviert.

Nach 18 h Inkubation wurden die Überstände unter sterilen Bedingungen abgenommen und zur Entfernung der noch enthaltenen Zellen zentrifugiert (10 Min., 480 g, 4 °C). Anschließend wurden die Überstände aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Funktionelle Analyse von Zellen *in vitro*

3.2.4.1 Stimulation von T Zellen *in vitro*

Die Stimulation (bzw. Restimulation) von T Zellen erfolgte entweder mit aufgereinigten *in vitro* differenzierten T_h1 Zellen oder mit frisch aus Milzen isolierten CD8⁺ T Zellen. Für Versuche, in denen CD8⁺ T Zellen mittels CD3-Antikörper stimuliert wurden, wurden Zellen mit einem Wildtyp-TCR verwendet.

Zur Stimulation der Zellen wurden verschiedene Reagenzien eingesetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte je nach Experiment für 4-18 h in 200 µl T Zell-Medium in einer 96 Well-Zellkulturplatte. In den einzelnen Versuchen wurde für jede Gruppe die gleiche Anzahl an T Zellen eingesetzt (5×10^4 - 2×10^5 /Well).

Stimulation	Konzentration/Menge
PMA	5 ng/ml
Ionomycin	200 ng/ml
CD3/CD28 Partikel	25 µl/ 1×10^6 Zellen
anti-CD3 (αCD3)	Beschichtung der Platte mit 5 µg/ml in PBS für 1 h bei 37 °C, anschließend waschen mit PBS

Zur FACS-Analyse der Zytokin-Expression (siehe Abschnitt 3.2.5.2) wurden die Inhibitoren Brefeldin A und Monensin (Verdünnung jeweils 1:1000) hinzugefügt, um die Sezernierung der Zytokinen zu blockieren.

Für die experimentelle Analyse der Granzym-B-Expression in Abwesenheit von LSEC wurden CD8⁺ T Zellen in 96 Well-Rundbodenplatten, die zuvor mit CD3-Antikörper beschichtet wurden, für 18 h inkubiert. Als Stimulus wurden entweder verschiedene Zellkultur-Überstände oder T Zell-Medium unter Zusatz von 5 ng/ml Hyper-IL-6 oder 5 ng/ml IL-2 verwendet. Nach 18 h wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.2.5) weiter untersucht.

3.2.4.2 Messung der Zytokin-Expression mittels ELISA (Sandwich-Methode)

Für die Durchführung des ELISA mittels Sandwich-Methode wurde zunächst eine 96 Well-ELISA Mikrotiterplatte mit 50 µl einer primären Antikörperlösung (1:500 in ELISA-Bindungspuffer) für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C beschichtet. Danach wurde die Platte zur Vermeidung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Min. bei Raumtemperatur mit ELISA-Blockierungspuffer inkubiert und anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurden 100 µl der jeweils zu untersuchenden Zellkultur-Überstände in Triplikaten beziehungsweise des Zytokin-Standards in Duplikaten in dem entsprechenden Medium für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C auf der Platte inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte wurde dann in jedes Well 50 µl einer sekundären Antikörperlösung (biotinylierter Antikörper, 1:1000 in Blockierungspuffer) gegeben. Die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, wonach nicht gebundener Antikörper durch abermaliges Waschen entfernt wurde. Anschließend wurden 50 µl einer frisch angesetzten Peroxidase-Lösung (Peroxidase-Streptavidin-Konjugat, 1:1000 in PBS) für 30 Min. auf der Platte bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde zur Detektion der optischen Dichte 50 µl des TMB-Substrats zugefügt. Abgestoppt wurde die Farbreaktion durch 50 µl 0,18 M Schwefelsäure pro Well. Die Quantifizierung erfolgte dann durch Bestimmung der optischen Dichte im ELISA Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.2.4.3 Messung der Zytokin-Expression mittels ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay

Die Quantifizierung von Zytokin-Konzentrationen mit Hilfe des ProcartaPlex™ Immunoassays erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Wohlleber und Daniel Schätzlein (Technische Universität München). Zunächst wurden jeweils 50 µl magnetische Antikörper-beschichtete Partikel pro Well in eine 96 Well-Platte vorgelegt. Nach Abtrennung der Partikel wurden diese einmal mit 150 µl Waschpuffer gewaschen. Dafür wurden die Partikel mit Hilfe eines Magneten am Boden der Wells immobilisiert, wonach die Flüssigkeit durch das Invertieren der Platte entfernt werden konnte. Anschließend wurden jeweils 50 µl des Standards oder 50 µl der zu untersuchenden Zellkultur-Überstände zu den Antikörper-beschichteten Partikeln gegeben und 60-120 Min. bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen

mit jeweils 150 µl Waschpuffer wurden jeweils 25 µl der Detektions-Antikörper-Mischung in die entsprechenden Wells gegeben. Die 96 Well-Platte wurde für 30 Min. bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden jeweils 50 µl Streptavidin-PE-Lösung in jedes Well pipettiert, worauf die Platte für weitere 30 Min. bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Analyse erfolgte nach dreimaligem Waschen, der Zugabe von jeweils 120 µl „Reading Buffer“ und einer weiteren Inkubation (5 Min., 500 rpm, Raumtemperatur) unter Verwendung eines Bio-Plex® 200 Systems.

3.2.5 Durchflusszytometrie

3.2.5.1 Färbung von Oberflächenantigenen

Zur Färbung von Oberflächenmolekülen wurden 5×10^4 bis 1×10^6 Zellen in eine 96 Well-Platte in 50-100 µl FACS-Puffer gegeben. Die Färbung erfolgte für 15 Min. bei 4 °C in Anwesenheit des anti-CD16/32-Antikörpers (10 µg/ml) und unter Zugabe der für die jeweiligen Oberflächenmoleküle spezifischen Antikörper. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 2 Min., 550 g, 4 °C). Wenn biotinylierte Antikörper verwendet wurden, folgte eine zweite Färbung mit Streptavidin-Konjugaten. Zum späteren Ausschluss toter Zellen wurde bei jeder Färbung zusätzlich das „LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain kit“ verwendet. Wenn nötig wurde zur Kontrolle eine Färbung mit den entsprechendem Isotyp-Antikörpern durchgeführt. Falls das nicht möglich war, wurde alternativ für die Analyse die FMO³⁰ ermittelt.

Wenn Zellen nach einer Oberflächenfärbung für eine spätere Analyse erhalten werden sollten, so wurden diese bis zu dem Zeitpunkt der Analyse in FACS-Fixierungspuffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Vor einer intrazellulären Färbung von Zytokinen erfolgte eine Fixierung mit 4% (w/v) Paraformaldehyd für 10 Min. bei 4 °C. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Vor der Färbung von Transkriptionsfaktoren oder Granzym B wurden die Zellen für mindestens 30 Min. und bis zu 18 h im Fixierungspuffer des "Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set" inkubiert.

³⁰ Engl.: Fluorescence Minus One

3.2.5.2 Färbung von intrazellulären Proteinen

Die intrazelluläre Färbung von Proteinen erfolgte nach der Färbung der Oberflächenmoleküle und diente zur Analyse der Expression von Transkriptionsfaktoren, Granzym B oder aber der Zytokin-Produktion nach *in vitro* Stimulation der T Zellen.

Für die Färbung von Transkriptionsfaktoren oder Granzym B wurden die Zellen zunächst mit dem Permeabilisierungspuffer des "Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set" gewaschen und dann für 30 Min.-1 h mit 50-100 µl fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern bei 4 °C in Permeabilisierungspuffer gefärbt. Die Zytokin-Färbung erfolgte ebenfalls nach dem Waschen mit Permeabilisierungspuffer für 20 Min. in 50-100 µl Permeabilisierungspuffer mit den entsprechenden Antikörpern bei 4 °C.

Bei allen intrazellulären Färbungen erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer nach einem erneuten Waschschrift mit Permeabilisierungspuffer und der Aufnahme der Zellen in FACS-Puffer. Für alle intrazellulären Färbungen wurde zur Kontrolle auch mit den entsprechenden Isotyp-Antikörpern gefärbt. Falls das nicht möglich war, wurde alternativ die FMO ermittelt.

3.2.6 Statistik

Die Abweichungen der Einzelwerte sind als Standardabweichung (SD) im Fehlerbalken dargestellt. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte je nach Aufbau des Versuchs mit einer einfaktoriellen oder zweifaktoriellen ANOVA (mit ns = $p > 0,05$, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Die angegebenen Signifikanzen basieren auf der ANOVA des ganzen Versuches, auch wenn im Folgenden nur Teile des Versuches dargestellt sind.

4 Ergebnisse

4.1 Die Differenzierung von T_h1 Zellen

Die Differenzierung von CD8⁺ T Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen wird besonders in Abwesenheit von Inflammation oder bei Infektionen mit schwachen einhergehenden inflammatorischen Signalen durch die Hilfe von CD4⁺ T Zellen gesteigert (Ekkens et al., 2007; Provine et al., 2014; Wiesel and Oxenius, 2012). Weiterhin ist die Anwesenheit von Helfer T Zellen essenziell für die Bildung langlebiger CD8⁺ Gedächtniszellen (Janssen et al., 2003; Provine et al., 2014; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Da naive CD8⁺ T Zellen durch Induktion von LSEC unter homöostatischen Bedingungen zu Gedächtniszellen differenzieren (Böttcher et al., 2014) und die Hilfe von CD4⁺ T Zellen besonders wichtig bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen in Abwesenheit von Inflammation und bei der Generierung von Gedächtniszellen ist, ist durchaus denkbar, dass T_h1 Zellen die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC unter homöostatischen Bedingungen unterstützen können.

Bevor die potenzielle Helfer-Funktion von T_h1 Zellen bei der Stimulation von CD8⁺ T Zellen durch LSEC näher untersucht werden konnte, musste eine optimale Differenzierung der naiven CD4⁺ T Zellen zu T_h1 Zellen gewährleistet werden. Mit der Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmitt und Prof. Dr. Bopp (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) konnte eine stabile Differenzierung der T Helferzellen etabliert werden, die in den folgenden Versuchen durch FACS-Färbung der Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 kontrolliert wurde. Wie in Abb. 4.1.1 zu sehen ist, exprimieren CD4⁺ T Zellen, die fünf Tage unter T_h1-polarisierenden Bedingungen stimuliert wurden, den für T_h1 Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktor T-bet. Die Expression des für T_h2 Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktors GATA-3 fiel besonders im Vergleich zu diesen Helferzellen deutlich geringer aus. Nach Restimulation konnte bei T_h1 Zellen weiterhin die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF nachgewiesen werden, während T_h2 Zellen diese Zytokine nach Restimulation nicht exprimierten. Naive CD4⁺ CD44^{low} T Zellen exprimierten ebenfalls nach Restimulation TNF, ein Nachweis von IFN γ und T-bet war bei den frisch isolierten Zellen aber nicht möglich. Mit der in Abb. 4.1.1 gezeigten Expression von T-bet, IFN γ und TNF nach fünf Tagen Differenzierung konnte somit die funktionale Differenzierung der

T_h1 Zellen nachgewiesen werden. Die so generierten Helfer T Zellen wurden im Weiteren für die Kokultur mit LSEC und $CD8^+$ T Zellen eingesetzt.

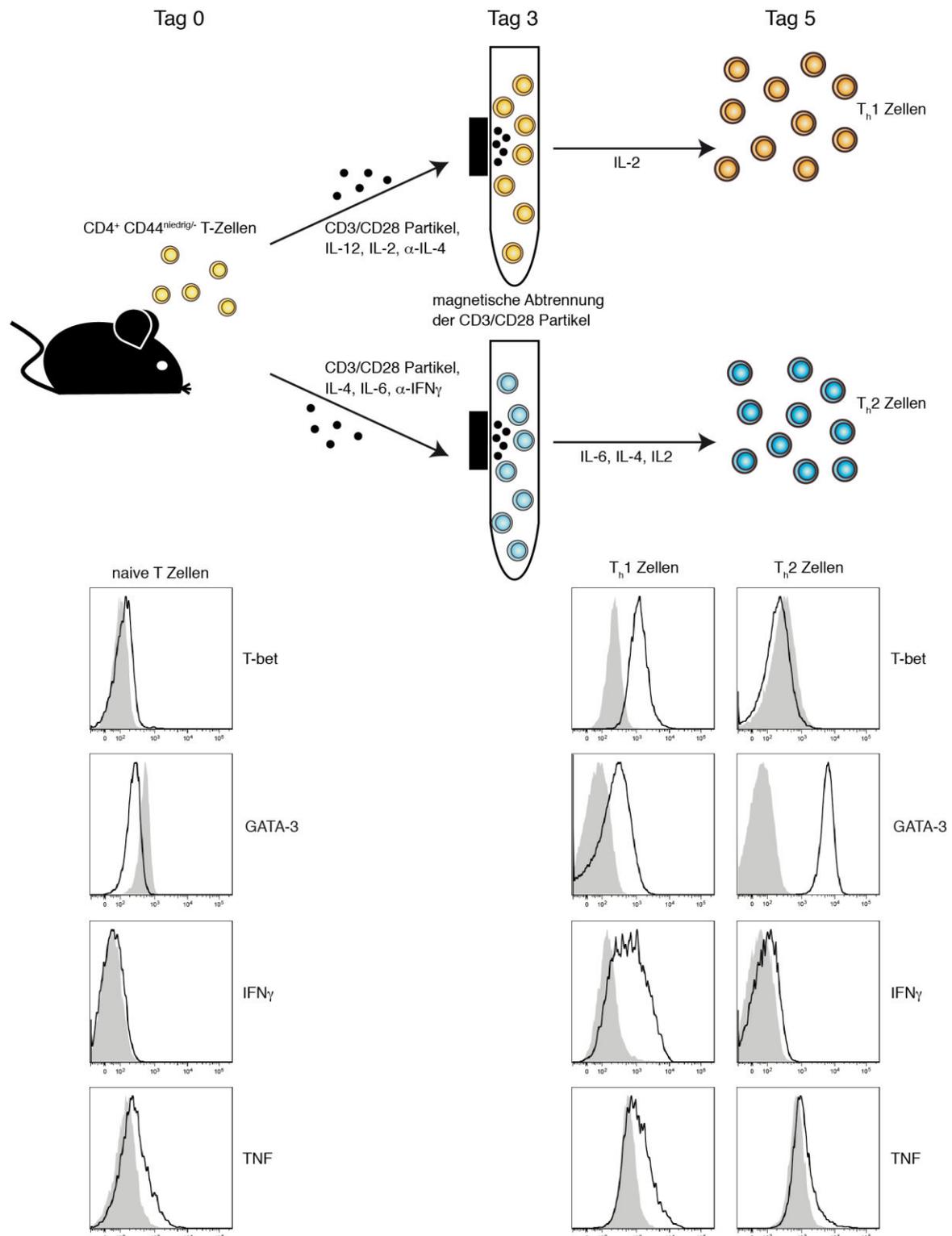


Abbildung 4.1.1: T_H1 Zellen sind nach Differenzierung T-bet-positiv und exprimieren die Zytokine IFN γ und TNF. $CD4^+ CD44^{\text{niedrig/-}}$ T Zellen wurden wie in 3.2.3.1 beschrieben stimuliert. Zur Kontrolle der T Helfer-Differenzierung wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 untersucht und die Expression der für T_H1 Zellen typischen Zytokine IFN γ und TNF nach Restimulation analysiert. Grau sind die jeweiligen Färbungen mit der Isotyp-Kontrolle. Die Daten sind repräsentativ für $n > 3$ unabhängige Experimente.

4.2 T_h1-Hilfe verstärkt die frühe Expression von Granzym B und CD25 bei LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen

CD8⁺ T Zellen gehören zu den zentralen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems, jedoch wird die Aktivierung und Fortdauer von CD8⁺ T Zell-Antworten unter anderem durch CD4⁺ T Zellen gesteuert (Fallarino et al., 2000). Naive CD8⁺ T Zellen differenzieren wie bereits erwähnt durch Kreuzpräsentation von LSEC nach initialer Proliferation zu Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen (Böttcher et al., 2013). Der Differenzierung dieser Zellen geht eine sehr frühe, jedoch vorübergehende Hochregulation von Granzym B voraus (Böttcher et al., 2014), anhand derer im Folgenden die mögliche Helfer-Funktion von T_h1 Zellen weiter untersucht wurde. Obwohl LSEC die Induktion proinflammatorischer T_h1 Zellen (Neumann et al., 2015) und deren langfristige Effektorfunktionen (Carambia et al., 2013) inhibieren, konnte auch eine Notwendigkeit für die Hilfe von CD4⁺ T Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen zur effektiven Bekämpfung viraler Infektionen in der Leber nachgewiesen werden (Grakoui et al., 2003; Provine et al., 2014). Es ist weiterhin nicht ausgeschlossen, dass T_h1-Hilfe auch unter homöostatischen Bedingungen einen Einfluss auf die LSEC-vermittelte Induktion von CD8⁺ T Zellen und damit auf den frühen Gewinn zytotoxischer Effektorfunktionen der Zellen hat.

Um dies zu untersuchen, wurden naive OVA-spezifische CD8⁺ T Zellen (OT-I) mit LSEC in Gegenwart von OVA-spezifischen T_h1 Zellen (OT-II) für 18 h kokultiviert. Die Stimulation der OT-I Zellen wurde anhand der Expression der Zytotoxizitäts- und Aktivierungsmarker Granzym B, CD25 und CD44 näher untersucht.

Nach 18 h zeigten die in Gegenwart von LSEC-induzierten OT-I Zellen wie erwartet eine starke Expression von Granzym B, CD25 und CD44 (Abb. 4.2.1). Durch T_h1-Hilfe wurde die Expression von Granzym B und CD25 weiter signifikant gesteigert (Abb. 4.2.1), die CD44-Expression blieb unverändert. Dies ist bereits durch Betrachtung der Histogramme (Abb. 4.2.1a) erkennbar, wird jedoch durch Quantifizierung und Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI³¹) (Abb. 4.2.1b) noch deutlicher. Die Induktion der CD8⁺ T Zellen erfolgte Antigen-spezifisch durch Kreuzpräsentation der LSEC, ohne den Stimulus durch OVA und OVA₃₂₃₋₃₃₉ war keine Aktivierung der OT-I Zellen erkennbar (Abb. 4.2.1).

³¹ Engl.: Mean Fluorescence Intensity

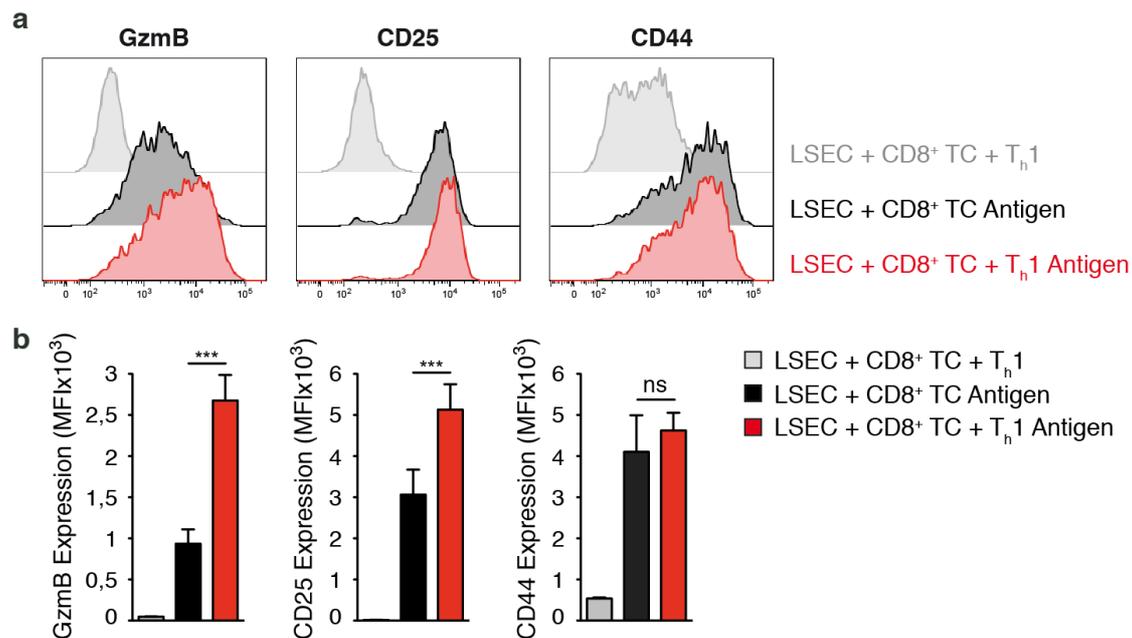


Abbildung 4.2.1: T_h1 Zellen verstärken die frühe Granzym-B- und CD25-Expression von LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen. Durchflusszytometrische Analyse von OVA-spezifischen CD8⁺ T Zellen nach 18 h Kokultur mit LSEC und je nach Probe mit OT-II T_h1 Zellen. Die Stimulation erfolgte mit OVA und OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Antigen), als Negativkontrolle wurden Ansätze ohne Stimulus verwendet. In An- und Abwesenheit der T_h1 Zellen wurde die Expression von Granzym B (GzmB), CD25 und CD44 der OT-I Zellen analysiert (a) und über die Berechnung der MFI quantifiziert (b). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n>3 unabhängige Experimente.

Die Kreuzpräsentation der OVA-Peptide durch LSEC war zwingend notwendig für die Induktion der CD8⁺ T Zellen. In Abwesenheit von LSEC oder Antigenen wurden die CD8⁺ T Zellen in der Kokultur nicht aktiviert, wie anhand der fehlenden Expression von Granzym B, CD25 und CD44 ersichtlich wird (Abb. 4.2.2). Ohne die Antigenpräsentation zeigten die CD8⁺ T Zellen in Bezug auf die getesteten Aktivierungsmarker einen Phänotyp vergleichbar mit naiven OT-I Zellen (0 h Zeitpunkt), wobei T Zellen ohne Kontakt zu LSEC auch eine erhöhte Mortalität aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Diese war durch Inkubation von T_h1 und OT-I Zellen reduziert (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte auch hier keine deutliche Erhöhung von Granzym B, CD25 und CD44 nachgewiesen werden, was die Reinheit der T Zellen belegt. Die in Abb. 4.2.2 aufgeführten Kontrollen waren Bestandteil aller in dieser Arbeit dargestellten Kokultur-Experimente, sie sind im Folgenden jedoch der Einfachheit halber nicht mehr dargestellt.

Die aufgeführten Daten demonstrieren, dass durch T_h1-Hilfe die frühe Expression von Granzym B und CD25 bei LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen weiter gesteigert wird, während die Expression von CD44 nicht verändert wird.

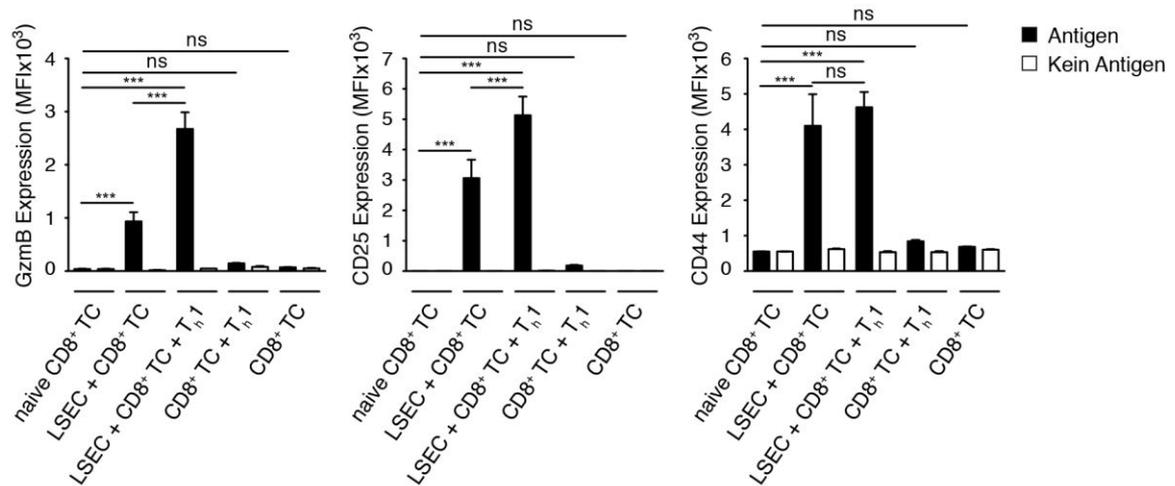


Abbildung 4.2.2: Die spezifische Induktion von CD8⁺ T Zellen und die dabei beobachtete T_H1-Hilfe findet nur statt, wenn CD8⁺ T Zellen und T_H1 Zellen von LSEC als APC in Gegenwart von Antigen stimuliert werden. FACS-Analyse von OT-I Zellen, die für 18 h mit LSEC und je nach Behandlung mit OT-II T_H1 Zellen kokultiviert wurden. Die Stimulation erfolgte mit Antigen, als Negativkontrolle wurden die Zellen ohne Antigen inkubiert. Die Expression von Granzym B, CD25 und CD44 der OT-I Zellen wurde im Vergleich zu naiven CD8⁺ T Zellen (0 h Zeitpunkt) analysiert und über die Analyse der MFI quantifiziert. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für n>3 unabhängige Experimente.

4.3 Die Hilfe von T_H1 Zellen bei der frühen Hochregulation von Granzym B ist LSEC-spezifisch

Wie einleitend bereits erwähnt, läuft die Kreuzpräsentation von LSEC und DC über verschiedene Mechanismen und mit unterschiedlichen Kinetiken ab (Schurich et al., 2009). Weiterhin führt die Induktion durch LSEC und DCs zu unterschiedlichen Phänotypen der CD8⁺ T Zellen, sowohl zu frühen (Böttcher et al., 2014), als auch zu späten (Diehl et al., 2008) Zeitpunkten.

Nach der Beobachtung, dass T_H1 Zellen die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC beeinflussen und die frühe Expression von Granzym B und CD25 steigern, kam die Frage auf, ob auch die Interaktion von DCs und CD8⁺ T Zellen durch T_H1 Zellen schon zu einem frühen Zeitpunkt beeinflusst und messbar verändert wird. Um dies zu untersuchen, wurden primäre DC aus der Milz aufgereinigt und analog zu LSEC mit OT-I und T_H1 Zellen kokultiviert. Nach 18 h wurden die induzierten CD8⁺ T Zellen hinsichtlich der Expression von Granzym B, CD25 und CD44 durchflusszytometrisch untersucht. Wie schon zuvor beschrieben (Böttcher et al., 2014), zeigten DC-induzierte OT-I Zellen nach 18 h nur eine geringe Granzym-B-Expression, während CD8⁺ T Zellen durch Kreuzpräsentation von LSEC zu diesem Zeitpunkt bereits Granzym B verstärkt exprimierten (Abb. 4.3.1). Im Gegensatz dazu war die MFI von CD25 und CD44 höher bei T Zellen, die mit DC

kokultiviert wurden. Überraschenderweise hatte die Anwesenheit von T_h1 Zellen bei der Kokultur von DC und OT-I Zellen keinen Effekt auf die Expression von Granzym B und CD44 nach 18 h Inkubation. Die Expression von CD25 war bei den $CD8^+$ T Zellen jedoch leicht verstärkt, was durch Analyse der MFI erst wirklich ersichtlich wird (Abb. 4.3.1b). $CD8^+$ T Zellen, die mit LSEC und T_h1 Zellen kultiviert wurden, zeigten dagegen im Vergleich zu nur durch LSEC-induzierte OT-I Zellen eine verstärkte Granzym B, CD25 und CD44-Expression (Abb. 4.3.1). Die Unterschiede in der Expression von CD25 und CD44 waren nicht in jedem Experiment so signifikant, wie in dem in Abb. 4.3.1b dargestellten Versuch. Dies ändert aber grundsätzlich nichts an dem hier beschriebenen Phänotyp. Wie zuvor erwähnt, erfolgte die Induktion der OT-I Zellen auch hier nur in Gegenwart von Antigen. Ohne Stimulus war kein Granzym B und CD25 messbar und nur eine basale CD44-Expression vorhanden, wie exemplarisch an der Kombination von LSEC, T_h1 Zellen und OT-I Zellen deutlich wird (Abb. 4.3.1).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass T_h1 -Hilfe keinen Einfluss auf die Granzym-B-Expression DC-induzierter $CD8^+$ T Zellen nach 18 h Stimulation hat, während die Expression des Zytotoxizitätsmarkers bei LSEC-induzierten OT-I Zellen in Anwesenheit von T_h1 Zellen signifikant gesteigert wird. Die Expression von CD25 wird dagegen durch T_h1 -Hilfe bei DC- und LSEC-induzierten $CD8^+$ T Zellen bereits zum frühen Zeitpunkt gesteigert.

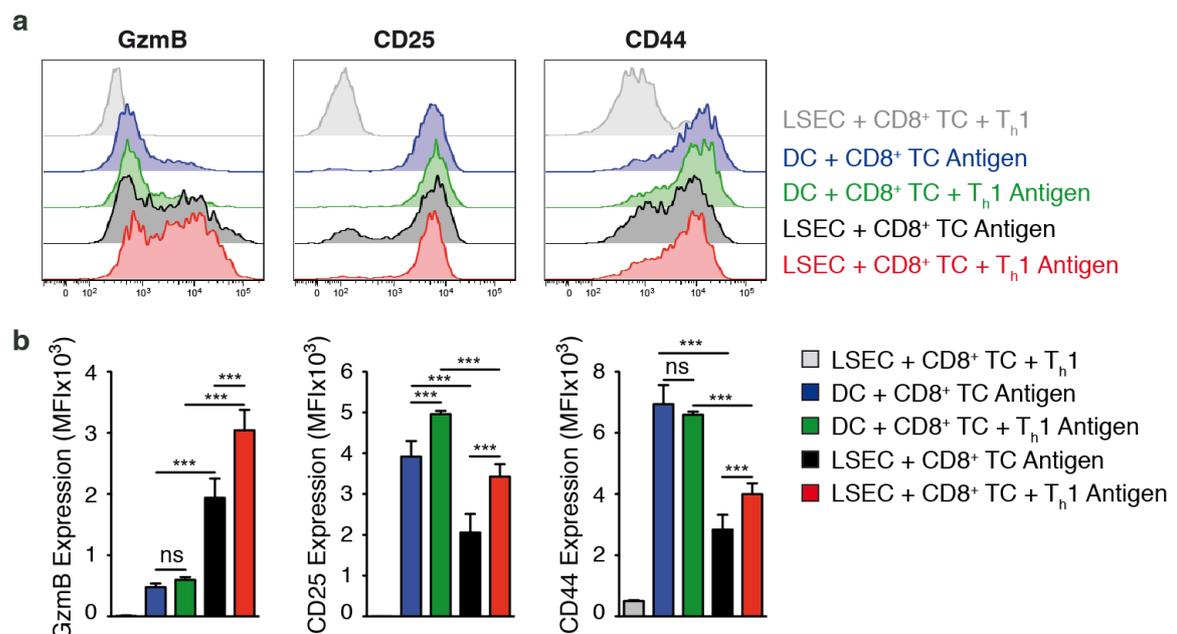


Abbildung 4.3.1: Die frühe Steigerung der Granzym-B-Expression durch T_h1 -Hilfe ist LSEC-spezifisch. Naive OT-I Zellen wurden für 18 h mit LSEC oder DC als APC in An- und Abwesenheit von T_h1 Zellen kultiviert. Zur Stimulation wurde dem Medium Antigen zugesetzt, bzw. kein Stimulus als Negativkontrolle. (a) Durchflusszytometrische Analyse der Granzym-B-, CD25- und CD44-Expression der $CD8^+$ T Zellen nach 18 h Inkubation. (b) Quantifizierung der in (a) dargestellten Daten durch Bestimmung der MFI. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

4.4 T_h1 Zellen verstärken die LSEC-vermittelte Induktion von CD8⁺ T Zellen Antigen-spezifisch

Für die Differenzierung von CD8⁺ T Zellen ist eine Antigen-spezifische Interaktion mit APC unabdingbar. Dies wird in dem hier verwendeten OT-I Modell durch Zugabe von OVA und dem transgenen TCR, der das OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid (SIINFEKL) auf H-2K^b Molekülen erkennt, garantiert. Zur Ermöglichung einer optimalen Interaktion von LSEC und T_h1 Zellen wurden bisher OT-II T_h1 Zellen in Kombination mit dem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ verwendet. Dies garantierte trotz der geringen MHC-II-Expression von LSEC die Interaktion der OVA₃₂₃₋₃₃₉-präsentierenden I-Ab Moleküle mit dem transgenen TCR der CD4⁺ T Zellen.

Um zu untersuchen, ob T_h1 Zellen in der Kokultur überhaupt Antigen- und MHC-Klasse-II-spezifisch mit LSEC interagieren, musste die Interaktion der Zellen unterbunden werden. Dafür wurden einerseits Wildtyp (WT) T_h1 Zellen mit einem nicht für das präsentierte OVA-Antigen restringierten TCR verwendet (Abb. 4.4.1). Die Anwesenheit von WT T_h1 Zellen hatte keinen Einfluss auf die OT-I-Induktion von LSEC. Die Expression von Granzym B, CD25 und CD44 war nach 18 h Kokultur vergleichbar zu der Induktion in Abwesenheit von T_h1 Zellen. OT-II T_h1 Zellen dagegen erhöhten bei den CD8⁺ T Zellen, wie zuvor bereits beschrieben, die Expression von Granzym B und CD25. Die CD44-Expression variierte zwischen den verschiedenen Zellkombinationen nur minimal, da die Antigenpräsentation von LSEC durch die abgewandelten Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wurde.

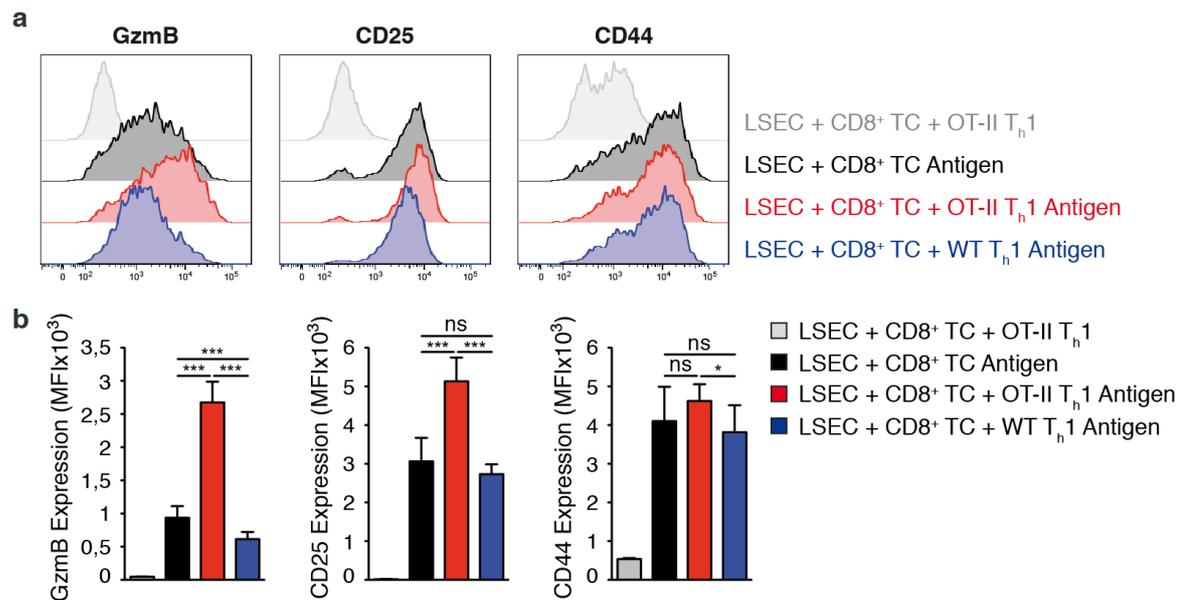


Abbildung 4.4.1: Wildtyp T_h1 Zellen haben im Gegensatz zu Antigen-spezifischen T_h1 Zellen keinen Einfluss auf die LSEC-vermittelte Induktion von CD8⁺ T Zellen. Durchflusszytometrische Analyse von OT-I Zellen, die mit LSEC unter Zusatz von Antigen bzw. ohne Stimulus inkubiert wurden. Für die Untersuchung der Antigen-spezifität der T_h1-Hilfe wurden der Kokultur WT T_h1 Zellen oder OT-II T_h1 Zellen zugesetzt. Nach 18 h folgte die Analyse der OT-I-Aktivierung mittels Durchflusszytometrie (a) und anschließender Quantifizierung durch Berechnung der MFI (b). Die Daten sind repräsentativ für n=3 unabhängige Versuche.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterbindung der Antigen-spezifischen Interaktion von LSEC und T_h1 Zellen lag in der Verwendung MHC-II defizienter I-Ab^{-/-} LSEC. Naive OT-I Zellen wurden mit WT oder I-Ab^{-/-} LSEC und Antigen-spezifischen OT-II T_h1 Zellen für 18 h inkubiert. Als Negativkontrollen der Helfer-Funktion dienten Kokulturen ohne T_h1 Zellen. Die Stimulation von CD8⁺ T Zellen durch WT LSEC und I-Ab^{-/-} LSEC war vergleichbar, wobei durch I-Ab^{-/-} LSEC-aktivierte OT-I Zellen eine leicht verminderte Expression von Granzym B und CD25 aufwies (Abb. 4.4.2). Dies konnte durch die Anwesenheit von T_h1 Zellen nur wenig gesteigert werden, wohingegen T_h1 Zellen die Granzym-B- und CD25-Expression von WT LSEC-induzierten OT-I Zellen deutlich steigerten.

Insgesamt belegen die in Abb. 4.4.1 und Abb. 4.4.2 gezeigten Daten eindeutig, dass die Helfer-Funktion nur zustande kommt, wenn LSEC den T_h1 Zellen das OVA-Antigen über MHC-II präsentieren können. Die hier beschriebene Hilfe von T_h1 Zellen bei der LSEC-vermittelten Induktion von CD8⁺ T Zellen ist damit Antigen-spezifisch.

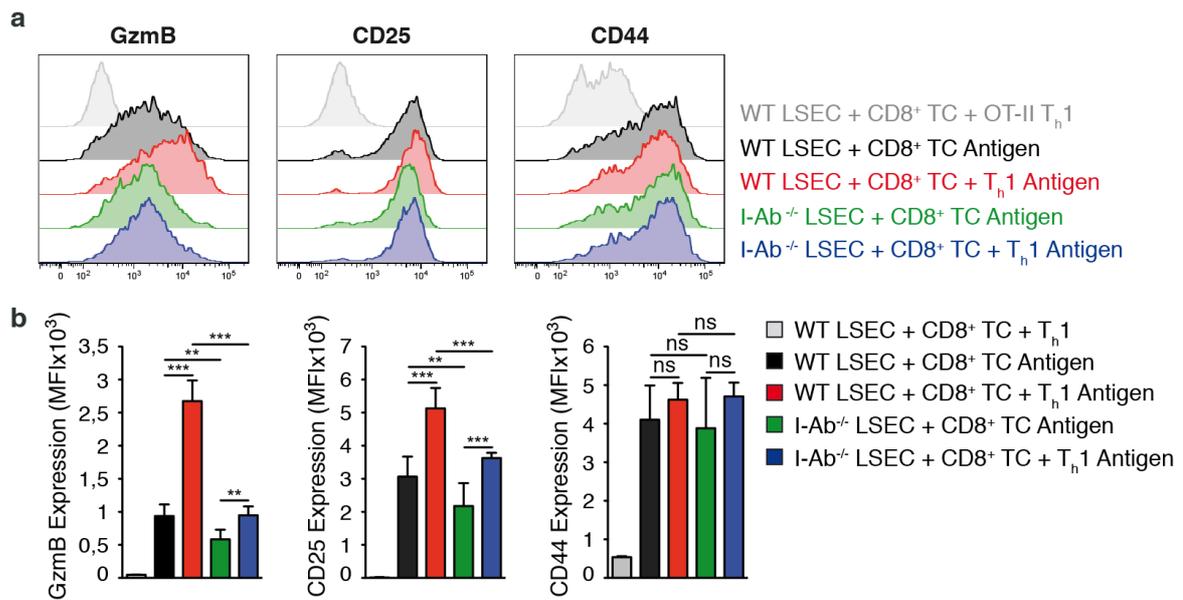


Abbildung 4.4.2: OT-II T_h1 Zellen können nicht mit I-Ab^{-/-} LSEC interagieren und die LSEC-vermittelte Induktion von CD8⁺ T Zellen beeinflussen. Naive OT-I Zellen wurden mit WT oder I-Ab^{-/-} LSEC und je nach Ansatz mit Antigen-spezifischen T_h1 Zellen kultiviert. (a) FACS-Analyse der Granzym-B-, CD25- und CD44-Expression der CD8⁺ T Zellen nach 18 h Stimulation. (b) Quantifizierung der in (a) dargestellten Daten durch Bestimmung der MFI. Die gezeigten Daten stammen aus n=1 Experiment.

4.5 Die neue LSEC-spezifische Helfer-Funktion von T_h1 Zellen ist Zytokin-vermittelt

Nach der Erkenntnis, dass T_h1 Zellen die Granzym-B- und CD25-Expression von LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen Antigen-spezifisch zum frühen Zeitpunkt steigern, stand die Frage im Vordergrund, ob die neue Helfer-Funktion Zytokin-vermittelt oder über Lizenzierung der APC erfolgt. Beides ist denkbar, da es sowohl Belege für eine Zytokin-basierte Hilfe (Bos and Sherman, 2010; Cox et al., 2011), als auch für Hilfe von CD4⁺ T Zellen über Lizenzierung der APC gibt (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Smith et al., 2004). Da die T_h1 und die OT-I Zellen in der Kokultur durch dieselben APC stimuliert werden, war die Untersuchung mit Hilfe eines „Transwell-Systems“ nicht möglich. Alternativ wurden Zellkultur-Überstände von LSEC und T_h1 Zellen analog zu den Versuchsbedingungen der Kokultur von LSEC, OT-I und T_h1 Zellen generiert (Abb. 4.5.1a). Diese Überstände sollten alle Zytokine enthalten, die von LSEC und T_h1 Zellen während der 18 h Inkubation in das Medium sezerniert werden, jedoch keine Lizenzierung der LSEC ersetzen, die in Anwesenheit von T_h1 Zellen potenziell erfolgt. Der so generierte Zellkultur-Überstand wurde im Vergleich zu der Kombination von LSEC, OT-I und T_h1 Zellen in der Kokultur von LSEC und OT-I Zellen eingesetzt. Als Kontrolle diente die

Kokultur von LSEC und CD8⁺ T Zellen mit unbehandeltem T Zell-Medium, sowie die Ansätze ohne den Stimulus des Antigens.

CD8⁺ T Zellen, die in Anwesenheit von T_h1 Zellen oder in Anwesenheit des Zellkultur-Überstandes von LSEC und T_h1 Zellen induziert wurden, zeigten eine vergleichbare Expression der durchflusszytometrisch getesteten Aktivierungsmarker. Wie man sowohl durch Darstellung in Histogrammen (Abb. 4.5.1b), als auch durch Quantifizierung und Darstellung der MFI (Abb. 4.5.1c) erkennt, war die Expression von Granzym B und CD25 im Gegensatz zur Kokultur von LSEC und OT-I Zellen alleine signifikant gesteigert. CD44 war in Anwesenheit von T_h1 Zellen in der Kokultur leicht erhöht, unter Verwendung des Überstandes von LSEC und T_h1 Zellen jedoch nicht verändert.

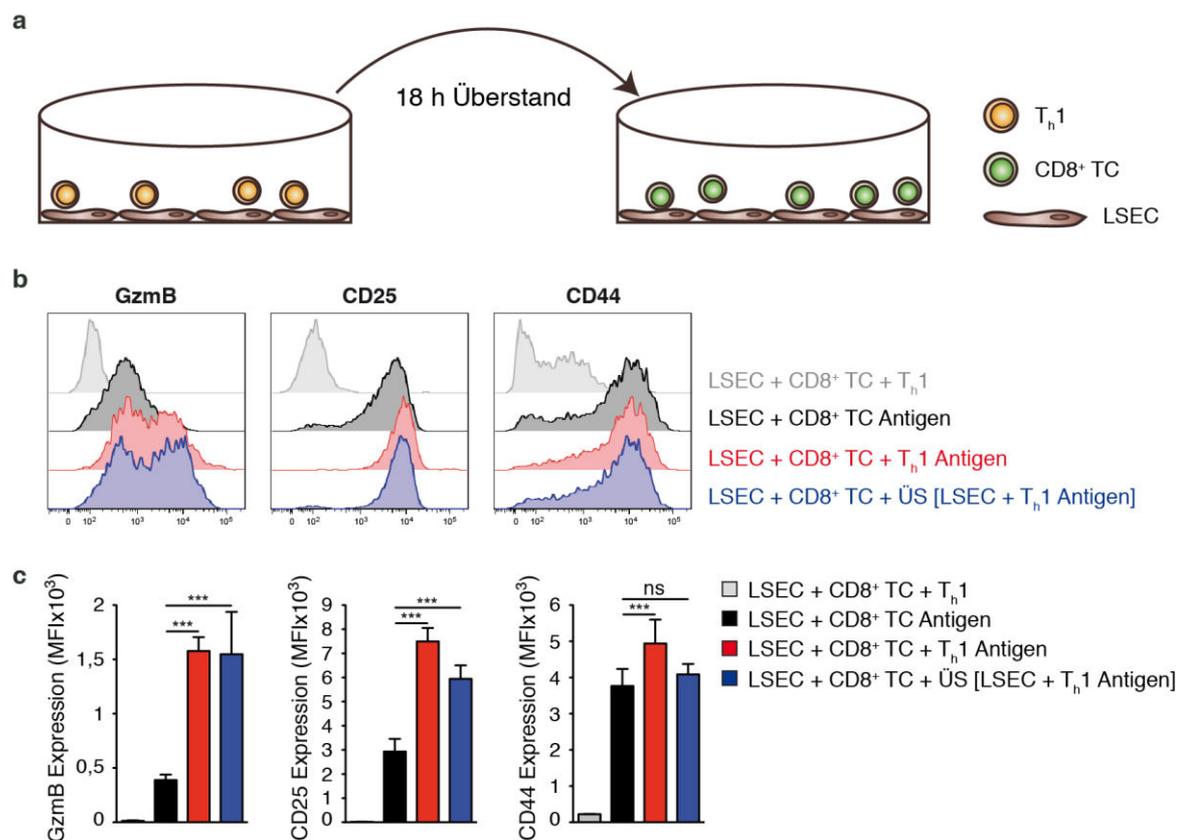


Abbildung 4.5.1: Der Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen zeigt eine Helfer-Funktion vergleichbar mit der Anwesenheit von T_h1 Zellen. LSEC und T_h1 Zellen wurden unter Versuchsbedingungen analog zu der Kokultur von LSEC, OT-I und T_h1 Zellen kultiviert. Nach 18 h wurde der Überstand geerntet und als Medium für weitere Experimente verwendet. Dafür wurden OT-I Zellen mit LSEC, mit LSEC und T_h1 Zellen oder mit LSEC und dem LSEC/T_h1 Kokultur-Überstand für 18 h inkubiert. Die Stimulation erfolgte wie zuvor mit OVA + OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Antigen) oder ohne Zusatz als Negativkontrolle. (a) Schematische Darstellung der für (b-c) durchgeführten Experimente. (b) FACS-Analyse der Granzym-B-, CD25- und CD44-Expression der CD8⁺ T Zellen nach 18 h Stimulation. (c) Quantifizierung der in (b) gezeigten Daten mittels MFI. Die in (b-c) gezeigten Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Für die Stimulation naiver $CD8^+$ T Zellen durch LSEC werden sowohl unter homöostatischen, als auch unter inflammatorischen Bedingungen, keine konventionellen kostimulatorischen Signale benötigt (Böttcher et al., 2014; Kern et al., 2010). Die in Abb. 4.5.1 dargestellten Daten deuten darauf hin, dass eine Lizenzierung der LSEC durch T_H1 Zellen zur Einleitung der Helfer-Funktion nicht unbedingt notwendig ist, wenn das Zytokin-Milieu, welches durch die Interaktion von LSEC und T_H1 Zellen entsteht, bereits vorhanden ist.

Mit dem Ziel zu testen, ob kostimulatorische Signale tatsächlich nicht relevant für die hier beschriebene T_H1 -Hilfe sind, wurden $CD8^+$ T Zellen auf $\alpha CD3$ -beschichteten Zellkultur-platten inkubiert. Als Medium dienten Zellkultur-Überstände aus der Kokultur von LSEC und T_H1 Zellen. Ohne weitere Kostimulation induzierte die Stimulation des TCR zusammen mit den Zytokinen des Zellkultur-Überstandes, der durch Inkubation von LSEC und T_H1 Zellen mit Antigen generiert wurde, die Granzym-B-Hochregulation der T Zellen nach 18 h (Abb. 4.5.2). Der Kokultur-Überstand von LSEC und T_H1 Zellen, der ohne Antigen generiert wurde, hatte kaum einen verstärkenden Effekt auf Expression des Zytotoxizitätsmarkers bei den $CD8^+$ T Zellen. Dies belegt, wie bereits in Abschnitt 4.4 beschrieben, dass LSEC und T_H1 Zellen Antigen-spezifisch miteinander interagieren müssen.

Es lässt sich anhand dieser Ergebnisse schlussfolgern, dass die LSEC-spezifische Helfer-Funktion von T_H1 Zellen durch Zytokine vermittelt wird. Die frühe Granzym-B-Expression der $CD8^+$ T Zellen konnte weiterhin alleine durch die Kombination der Kokultur-Überstände von LSEC und T_H1 Zellen mit plattengebundenem $CD3$ -Antikörper eingeleitet werden. Dadurch konnte, wie auch schon durch Böttcher und Schanz beschrieben, gezeigt werden, dass für die LSEC-induzierte frühe Granzym-B-Expression von $CD8^+$ T Zellen keine weiteren kostimulatorischen Signale benötigt werden (Böttcher et al., 2014). Die Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass T_H1 Zellen LSEC lizenzieren können und so die Induktion von $CD8^+$ T Zellen weiter steigern.

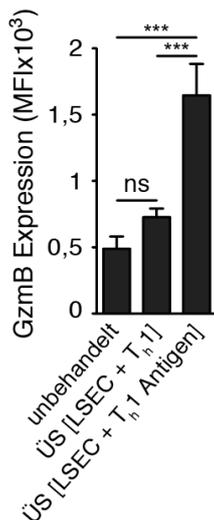


Abbildung 4.5.2: Die Stimulation mit CD3-Antikörper und dem Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen ist ausreichend für die Induktion der frühen Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen. Naive CD8⁺ T Zellen wurden für 18 h mit plattengebundenem CD3-Antikörper unter Zusatz verschiedener Zellkultur-Überstände oder T Zell-Medium als Negativkontrolle (unbehandelt) stimuliert. Die Analyse der Granzym-B-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n>3 unabhängige Experimente.

4.6 LSEC und T_h1 Zellen interagieren Antigen-spezifisch und aktivieren sich dabei gegenseitig

Nachdem gezeigt wurde, dass die Antigen-spezifische Interaktion von LSEC und T_h1 Zellen Voraussetzung für die Zytokin-vermittelte Hilfe bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen ist, stand die Frage im Vordergrund, ob die Interaktion auch zu der Aktivierung von LSEC und T_h1 Zellen führt. LSEC exprimieren nach Aktivierung verstärkt VCAM-1-, ICAM-1- und MHC-I-Moleküle (H-2K^b), was *in vivo* zu einer verbesserten Adhäsion und Aktivierung von CD8⁺ T Zellen führt (Knolle and Gerken, 2000). Die hier beschriebene Helfer-Funktion ist Zytokin-abhängig (siehe Abschnitt 4.5), jedoch wurde bisher nicht geklärt, ob LSEC, T_h1 Zellen oder sogar beide Zelltypen Quelle des Zytokins oder der entscheidenden Zytokine sind. Eine mögliche Aktivierung der LSEC durch T_h1-Kontakt wäre ein Hinweis darauf, dass LSEC nach Stimulation die Induktion von OT-I Zellen Zytokin-abhängig verstärken.

LSEC werden durch den Kontakt mit LPS aktiviert (Uhrig et al., 2005). Deshalb wurden die Endothelzellen als Positivkontrolle 18 h mit 10 ng/ml LPS inkubiert. LSEC zeigen auch ohne Stimulation eine starke ICAM-1-Expression (Knolle and Gerken, 2000), welche durch die Stimulation mit LPS noch gesteigert wurde. Wie erwartet wurde auch die Expression von VCAM-1 und H-2K^b verstärkt (Abb. 4.6.1a-b). Allerdings wurde die Expression der Aktivierungsmarker nach T_h1-Kontakt noch stärker erhöht. Dies lag nicht an dem im Medium enthaltenen Antigen, denn die Inkubation von LSEC mit Antigen und

ohne T_h1 Zellen führte nur zu einer geringen Hochregulation von VCAM-1, ICAM-1 und H-2K^b.

Ein weiterer Parameter, der die Aktivierung der Endothelzellen anzeigt, ist IL-6. LSEC setzen nach Aktivierung IL-6 frei (Uhrig et al., 2005), was an sich jedoch keine frühe Granzym-B-Expression induzieren kann (Böttcher et al., 2014). In der Tat induzierte die Aktivierung durch LPS und die Interaktion mit T_h1 Zellen passend zu den in Abb. 4.6.1a-b dargestellten Daten die IL-6-Sekretion der Endothelzellen (Abb. 4.6.1c).

T_h1 Zellen sind somit in der Lage, LSEC *in vitro* Antigen-spezifisch zu aktivieren.

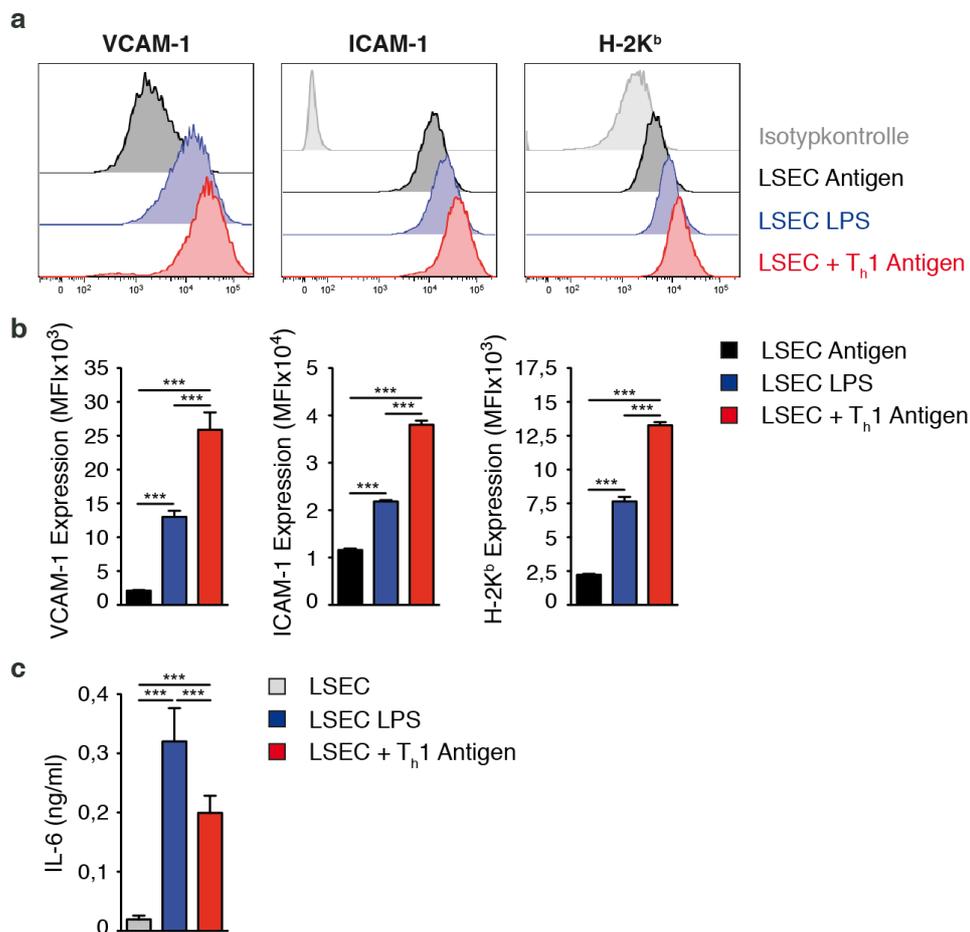


Abbildung 4.6.1: LSEC werden durch T_h1 -Kontakt aktiviert. (a-b) FACS-Analyse von LSEC nach 18 h Kokultur mit T_h1 Zellen im Vergleich zu der Stimulation mit LPS. (a) Untersuchung der Zellen auf die Expression der Oberflächenmarker VCAM-1, ICAM-1 und H-2K^b. (b) Quantifizierung der in (a) gezeigten Daten. (c) Überstände der Kokultur von LSEC und T_h1 Zellen wurden mit Hilfe eines ProcartaPlexTM Immunoassays auf die Anwesenheit von IL-6 hin untersucht. Die in (a-b) dargestellten Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente, die in (c) analysierten Daten stammen aus n=1 Versuch.

Nun stellte sich die Frage, ob T_H1 Zellen auch durch die Interaktion mit LSEC aktiviert werden, was anhand der Sekretion inflammatorischer Zytokine analysiert wurde. Weiterhin wurde untersucht, wie effizient die 18-stündige Stimulation von T_H1 Zellen durch LSEC im Vergleich zu der Aktivierung durch DC oder CD3/CD28 Partikel ist.

Für die Analyse der Interaktion von T_H1 Zellen und den Endothelzellen wurden Überstände aus der Kokultur von LSEC mit T_H1 Zellen oder T_H1 Zellen alleine mittels ELISA auf die Anwesenheit von $IFN\gamma$ und IL-2 hin untersucht. Beide Zytokine werden von T_H1 Zellen nach Aktivierung sekretiert und sind daher verlässliche Marker für die Stimulation der Zellen durch APC. Die Überstände aus der Kokultur von LSEC und T_H1 Zellen, bei der Antigen durch LSEC präsentiert werden konnte, enthielten wie vermutet $IFN\gamma$ (Abb. 4.6.2a) und IL-2 (Abb. 4.6.2b). Es wurden nur geringe IL-2-Konzentrationen nachgewiesen, was aber nicht bedeutet, dass wenig IL-2 sekretiert wurde. Die differenzierten T_H1 Zellen können aufgrund der gesteigerten Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors selbst effizient IL-2 binden und aufnehmen, was wiederum das Überleben und die Proliferation dieser Zellen fördert. Eine Quantifizierung des tatsächlich freigesetzten IL-2 ist daher schwer und in diesem Fall nicht von Bedeutung.

Die Effizienz der Stimulation von T_H1 Zellen durch LSEC, DC und CD3/CD28 Partikel wurde anhand der $IFN\gamma$ -Sekretion mittels ProcartaPlexTM Immunoassay analysiert. Tatsächlich waren die Endothelzellen *in vitro* DC und CD3/CD28 Partikeln im Hinblick auf die kurzzeitige Stimulation innerhalb von 18 h nicht unterlegen. Die Stimulation mit LSEC führte in dem in Abb. 4.6.2c analysierten Experiment sogar zu der stärksten $IFN\gamma$ -Freisetzung. Aufgrund fehlender experimenteller Wiederholungen ist die Signifikanz dieser Aussage jedoch unsicher. Wichtig ist, dass LSEC in der Lage sind, differenzierte T_H1 Zellen zumindest kurzzeitig vergleichbar zu DC und CD3/CD28 Partikel zu stimulieren.

Die Daten aus Abb. 4.6.1 und Abb. 4.6.2 zeigen zusammenfassend, dass LSEC und T_H1 Zellen sich gegenseitig durch Antigen-spezifischen Kontakt *in vitro* aktivieren, was zu der Sekretion von Zytokinen, die potenziell die frühe Granzym-B-Expression LSEC-induzierter $CD8^+$ T Zellen verstärken, führt.

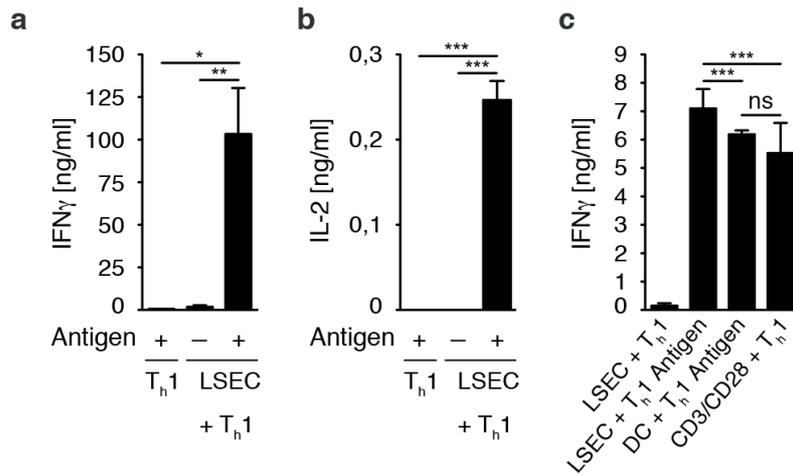


Abbildung 4.6.2: T_h1 Zellen werden von LSEC Antigen-spezifisch aktiviert. (a-b) LSEC und OT-II T_h1 Zellen wurden unter Zugabe von OVA und OVA₃₂₃₋₃₃₉ (a) oder nur OVA₃₂₃₋₃₃₉ (b) kultiviert. Als Negativkontrolle wurden Ansätze ohne die Antigene verwendet. Nach 18 h wurden die Überstände der Kokulturen abgenommen und mittels ELISA auf die Konzentrationen der Zytokine IFN_γ und IL-2 hin untersucht. (c) T_h1 Zellen wurden 18 h durch LSEC, DC oder CD3/CD28 Partikel stimuliert. Antigenpräsentation wurde durch Zugabe von OVA und OVA₃₂₃₋₃₃₉ ermöglicht, als Negativkontrolle erfolgte die Stimulation ohne Antigen. Die Überstände der Stimulationen wurden unter Verwendung eines ProcartaPlexTM Immunoassays auf die Anwesenheit von IFN_γ hin untersucht. Die in (a-b) dargestellten Daten repräsentieren jeweils n=3 voneinander unabhängige Versuche, die in (c) analysierten Daten stammen aus n=1 Experiment.

In Abb. 4.6.1 und Abb. 4.6.2 wurde gezeigt, dass die Überstände aus der Kokultur von LSEC und T_h1 Zellen proinflammatorische Zytokine enthalten. Die T_h1-Hilfe zur frühen Granzym-B-Expression wird zudem über Zytokine eingeleitet. Im Folgenden wurde untersucht, ob auch das Medium der Kokultur von LSEC, OT-I und T_h1 Zellen Zytokine enthält, die nach Aktivierung von LSEC und T_h1 Zellen freigesetzt werden. Die Aktivierung von LSEC wurde wie zuvor im Hinblick auf die Freisetzung von IL-6 untersucht. Wie bereits erwähnt, ist IFN_γ ein verlässlicher Marker für die Aktivierung von T_h1 Zellen, weshalb auch im Folgenden die Sekretion dieses Zytokins weiter untersucht wurde. IL-2 ist kein verlässlicher Parameter, da aktivierte CD8⁺ T Zellen neben den T_h1 Zellen ebenfalls sehr effizient IL-2 binden, aufnehmen und so dem Medium entziehen können (Obar et al., 2010).

Für die Analyse wurden Kokultur-Überstände von LSEC, OT-I und T_h1 Zellen mittels ELISA untersucht. In der Kokultur verstärkten T_h1 Zellen wie erwartet bei den LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen die Hochregulation von Granzym B und CD25, während die CD44-Expression nicht beeinflusst wurde (Abb. 4.6.3a). In den Überständen von LSEC und OT-I Kokulturen, in denen gleichzeitig T_h1 Zellen anwesend und Antigen zugesetzt war, konnten leicht erhöhte Konzentrationen an IL-6 nachgewiesen werden (Abb. 4.6.3b). Die Steigerung war nicht signifikant, wie es in dem in Abb. 4.6.1c dargestellten Experiment der Fall war. Zusammengefasst zeigen die Daten aber trotzdem, dass LSEC auch in dieser

Kokultur durch Interaktion mit T_h1 Zellen stärker aktiviert waren. Außerdem war die $IFN\gamma$ -Konzentration in Anwesenheit von T_h1 Zellen signifikant erhöht (Abb. 4.6.3b). $IFN\gamma$ ist wie IL-6 nicht in der Lage die Granzym-B-Expression einzuleiten (Böttcher et al., 2014). Es wird jedoch deutlich, dass LSEC und T_h1 Zellen in der Kokultur stimuliert wurden und potenziell die Granzym-B-Expression Zytokin-vermittelt steigern könnten. Ein weiterer Beleg für die Aktivierung der T_h1 Zellen in der Kokultur mit LSEC und $CD8^+$ T Zellen ist die stabile Expression von Granzym B nach 18 h Stimulation (Abb. 4.6.3c). T_h1 Zellen besitzen wie $CD8^+$ T Zellen auch zytotoxische Effektorfunktionen (Brown, 2010), was im Zuge der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurde.

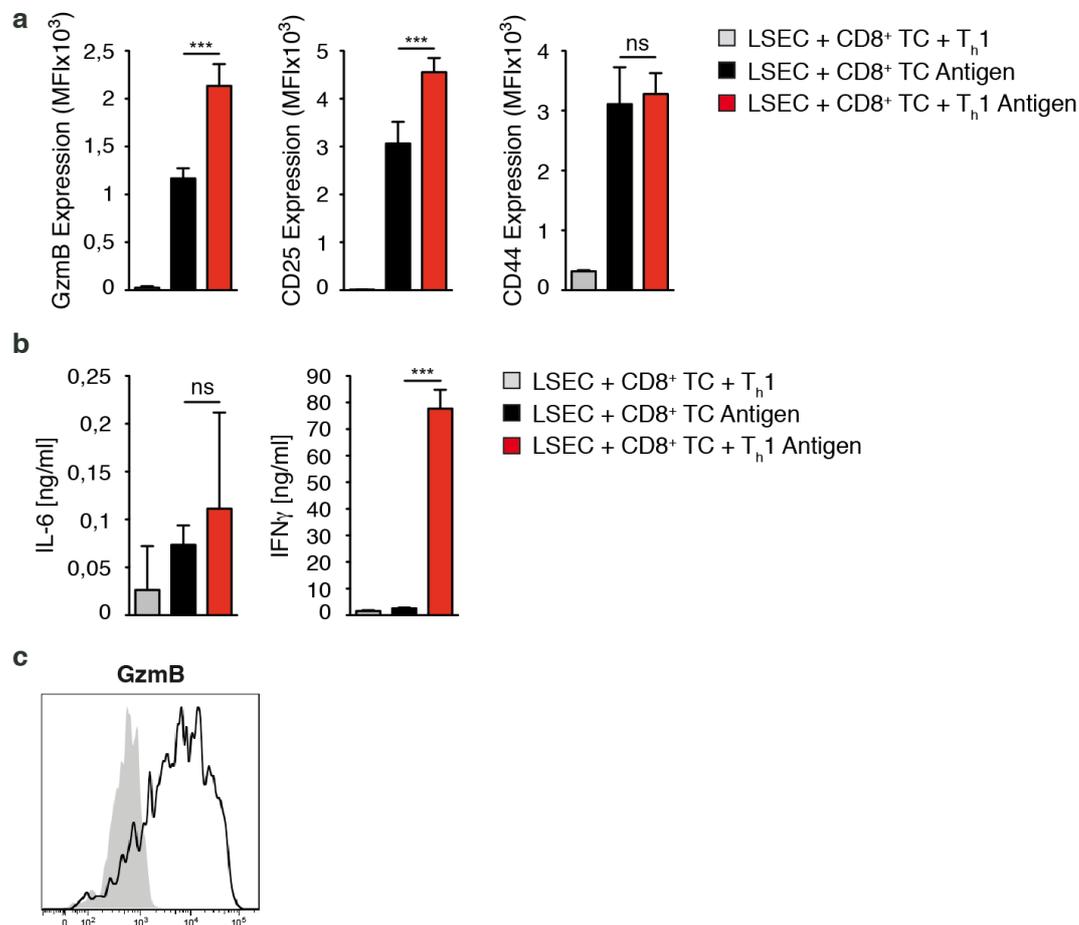


Abbildung 4.6.3: LSEC und T_h1 Zellen sind auch in der Kokultur mit $CD8^+$ T Zellen durch Antigen-spezifische Interaktion aktiviert. (a-b) LSEC und OT-I Zellen wurden in An- und Abwesenheit von T_h1 Zellen *in vitro* kultiviert. Antigenpräsentation wurde durch Zugabe von OVA und OVA₃₂₃₋₃₃₉ ermöglicht, als Kontrolle für Antigen-unspezifische Interaktion wurden die Kokulturen auch ohne Stimulus durchgeführt. (a) Nach 18 h Inkubation wurden die OT-I Zellen geerntet und die Expression von Granzym B, CD25 und CD44 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Berechnung der MFI. (b) Die Überstände der in (a) analysierten Kokulturen wurden mittels ELISA auf die Konzentrationen von IL-6 und $IFN\gamma$ hin untersucht. (c) Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse der Granzym-B-Expression von T_h1 Zellen nach 18 h Kokultur mit LSEC und $CD8^+$ T Zellen. In Grau ist die Färbung mit der Isotyp-Kontrolle dargestellt. Die in (a) und (c) gezeigten Daten, sowie der in (b) dargestellte $IFN\gamma$ -ELISA repräsentieren jeweils $n > 3$ voneinander unabhängige Experimente. Der in (b) analysierte IL-6 ELISA stammt aus $n = 1$ Versuch.

Zusammenfassend demonstrieren die Daten, dass LSEC und T_h1 Zellen in der Kokultur mit CD8⁺ T Zellen aktiviert sind. Fraglich bleibt weiterhin, welche Zelle durch welches Zytokin oder welche Zytokine die hier beschriebene Granzym-B- und CD25-Hochregulation einleitet und steigert.

4.7 Die Blockade von IL-2 verhindert die Hilfe von T_h1 Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC

Bisher konnte die neue Antigen- und LSEC-spezifische Helfer-Funktion von T_h1 Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen beschrieben werden. Weiterhin konnte belegt werden, dass die Hilfe durch Zytokine vermittelt wird, wobei diese sowohl von T_h1 Zellen direkt oder von LSEC, die durch T_h1 Zellen aktiviert wurden, stammen könnten. Allerdings ist weiterhin unklar, durch welches Zytokin oder welche Zytokine die frühe Granzym-B-Hochregulation nun induziert wird. Der Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6R war ein vielversprechender Kandidat, da durch Böttcher und Schanz bereits gezeigt werden konnte, dass die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC über IL-6 Trans-Signalübertragung zur Expression von Granzym B führt (Böttcher et al., 2014). T_h1 Zellen könnten somit LSEC aktivieren, was zu einer verstärkten Freisetzung von dem IL-6/sIL-6R-Komplex und einer gesteigerten Granzym-B-Expression führen könnte. In dem von Böttcher und Schanz vorgestellten Mechanismus bleibt dieser Komplex allerdings membrangebunden (Böttcher et al., 2014). Da bereits gezeigt wurde, dass der Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen alleine mit plattengebundenem CD3-Antikörper die frühe Granzym-B-Expression einleiten kann (Abb. 4.5.2), kann der hier beobachtete Phänotyp nicht ausschließlich über den membrangebundenen IL-6/sIL-6R-Komplex vermittelt werden. Es ist denkbar, dass LSEC nach Aktivierung durch T_h1 Zellen IL-6 und den sIL-6R freisetzen. Da der IL-6/sIL-6R-Komplex direkt nicht nachgewiesen werden kann, wurde die mögliche Beteiligung durch Blockade der Signalübertragung analysiert. Leider zeigte die Zugabe von IL-6 neutralisierendem Antikörper, der sowohl die klassische, als auch die IL-6 Trans-Signalübertragung inhibiert (Rose-John, 2012), keine Wirkung auf die Granzym-B-Expression der in der Kokultur stimulierten OT-I Zellen (Daten nicht gezeigt). Auch die spezifische Hemmung der IL-6 Trans-Signalübertragung durch das Protein sgp130Fc (Jostock et al., 2001) führte zu keiner verminderten Granzym-B-Expression (Daten nicht gezeigt). Ursache dafür könnten allerdings auch

technische Probleme gewesen sein, da auch die IL-6-Blockade in der Kokultur von LSEC und CD8⁺ T Zellen alleine wirkungslos war (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer interessanter und denkbarer Kandidat war IL-2. Es ist bekannt, dass IL-2 entscheidend für die Expression von Granzym B bei CD8⁺ Effektorzellen ist (Malek et al., 2001; Pipkin et al., 2010). Böttcher und Schanz konnten zeigen, dass die Blockade von IL-2 genau wie die Neutralisation von IL-6 zu einer Hemmung der Granzym-B-Expression führt. Allerdings konnte die Inkubation von CD8⁺ T Zellen mit DC und IL-2 keine frühe Granzym-B-Expression induzieren, im Gegensatz zu der Stimulation mit DC oder CD3/CD28 Partikeln und dem IL-6/sIL-6R-Komplex. Eine Granzym-B-Hochregulation durch die Inkubation von LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen mit IL-2 konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Damit konnte IL-2 keine direkte Beteiligung an der LSEC-induzierten frühen Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen nachgewiesen werden, eher die mögliche Rolle eines Kofaktors (Böttcher et al., 2014).

Die Bedeutung von IL-2 für die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC und die hier beobachtete T_h1-Helfer-Funktion wurde zunächst durch Neutralisation des Zytokins in der Kokultur von LSEC, OT-I und T_h1 Zellen und LSEC und OT-I Zellen alleine getestet (Abb. 4.7.1). Wie erwartet wurde die Granzym-B-Expression bei Zugabe eines IL-2-neutralisierenden Antikörpers zu der Kokultur von LSEC und OT-I Zellen signifikant inhibiert. Auch die CD25-Expression war signifikant vermindert, während CD44 auf der Oberfläche der Zellen sogar verstärkt vorhanden war. Interessanterweise zeigte sich der gleiche Effekt bei Zugabe des IL-2-neutralisierenden Antikörpers zu der Kokultur von LSEC, OT-I und T_h1 Zellen. Die Expression von Granzym B und CD25 war signifikant vermindert, während die CD44-Expression auch hier erhöht war. Durch die Isotypkontrolle des Antikörpers wurden keine vergleichbaren Effekte erzielt. Die Ergebnisse zeigen einerseits, dass die Anwesenheit von T_h1 Zellen nicht die Wirkung der IL-2-Neutralisation auf die LSEC-vermittelte Induktion von CD8⁺ T Zellen aufheben kann. Weiterhin deuten sie darauf hin, dass IL-2 auch für die beobachtete Helfer-Funktion von zentraler Bedeutung sein könnte.

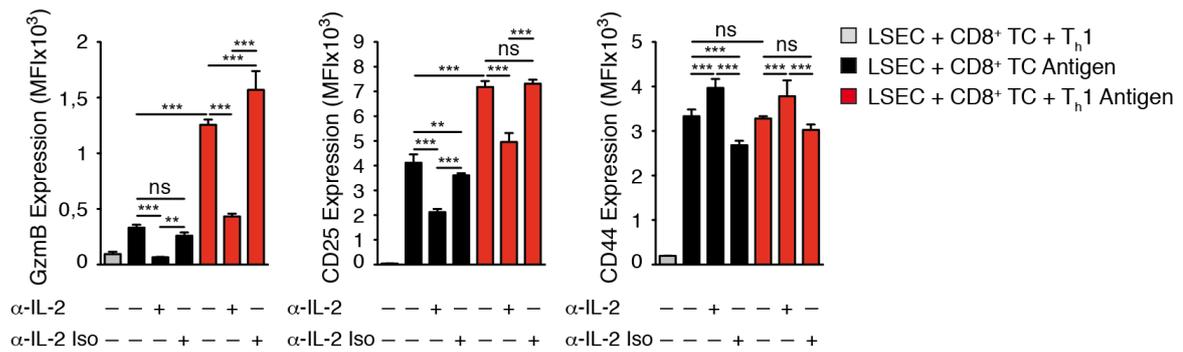


Abbildung 4.7.1: Durch Neutralisation von IL-2 wird die frühe Granzym-B-Hochregulation von CD8⁺ T Zellen gehemmt. Durchflusszytometrische Untersuchung von OT-I Zellen nach 18 h Kokultur mit LSEC oder LSEC und T_h1 Zellen. Die Bedeutung der IL-2-Signalübertragung wurde durch Zugabe von 10 µg/ml anti-IL-2-Antikörper oder 10 µg/ml der entsprechenden Isotypkontrolle getestet. Die Daten sind repräsentativ für n=3 unabhängige Experimente.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Blockade der IL-2-Signalübertragung auch die Granzym-B-Expression nach Stimulation der CD8⁺ T Zellen mit CD3-Antikörper und dem Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen verändert. Tatsächlich konnte in Anwesenheit des IL-2-neutralisierenden Antikörpers im Gegensatz zu der Isotypkontrolle eine signifikante Verminderung der Granzym-B-Expression beobachtet werden (Abb. 4.7.2a). Dieser Effekt konnte auch durch Verwendung eines CD25 blockierenden Antikörpers erzielt werden (Abb. 4.7.2b), was die Notwendigkeit der IL-2-Signalübertragung für die Granzym-B-Induktion und möglicherweise auch für die T_h1-vermittelte Helfer-Funktion weiter unterstreicht.

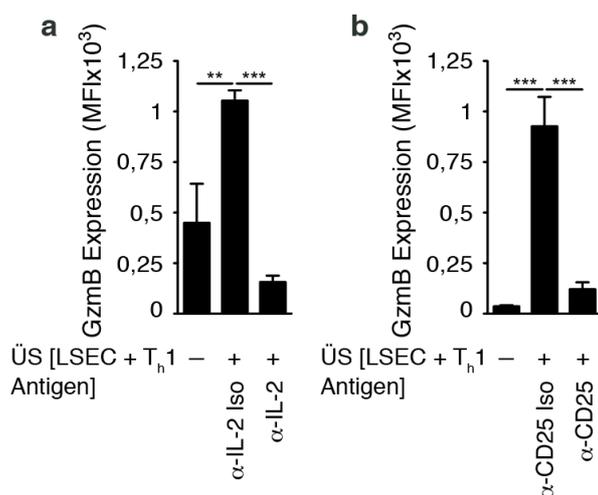


Abbildung 4.7.2: Durch Blockade von IL-2 wird die Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen nach Stimulation mit dem Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen verhindert. FACS-Analyse von CD8⁺ T Zellen nach der Stimulation mit plattengebundenem CD3-Antikörper und Überständen aus der Kokultur von LSEC und T_h1 Zellen. Die Granzym-B-Expression wurde durch Berechnung der MFI quantifiziert. (a) IL-2 im Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen wurde durch Zugabe von 10 µg/ml funktionalen IL-2-Antikörper neutralisiert. Als Negativkontrolle wurde die entsprechende Isotypkontrolle zugesetzt. (b) Durch Zugabe von 10 µg/ml eines CD25-blockierenden Antikörpers oder der entsprechenden Isotypkontrolle wurde die IL-2-Signalübertragung über den hochaffinen IL-2 Rezeptor gehemmt. Daten aus (a) sind repräsentativ für n=2 unabhängige Versuche, die Daten aus (b) stammen aus n=1 Experiment.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass IL-2 eine Rolle bei der Induktion der frühen Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen und möglicherweise auch der Helferfunktion von T_H1 Zellen spielt. Wie genau diese Rolle aussieht, sollte nun im Weiteren aufgeschlüsselt werden.

4.8 IL-2 ist erforderlich für die Granzym-B-Hochregulation durch IL-6 Trans-Signalübertragung

Die Granzym-B-Expression von CD4⁺ und CD8⁺ Effektor T Zellen wird durch IL-2-Signalübertragung eingeleitet und ist nach zwei bis drei Tagen Stimulation nachweisbar (Malek et al., 2001; Pipkin et al., 2010; Qui et al., 2011). Im Gegensatz dazu ist die LSEC-induzierte Granzym-B-Expression bereits nach 18 h messbar und nur vorübergehend während der Differenzierung zu Gedächtniszellen hochreguliert (Böttcher et al., 2014). Wie Böttcher und Schanz zeigen konnten, kann IL-2 alleine keine Granzym-B-Expression nach 18 h einleiten (Böttcher et al., 2014). Trotzdem zeigen die in Abschnitt 4.7 dargestellten Daten deutlich, dass die IL-2-Signalübertragung für die LSEC-vermittelte frühe Expression von Granzym B unerlässlich ist. Da die Granzym-B-Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC über IL-6 Trans-Signalübertragung eingeleitet wird, sollte das IL-2-Signal demnach unabhängig von LSEC generell für die Granzym-B-Induktion durch IL-6 Trans-Signalübertragung entscheidend sein. Analysiert werden konnte dies mit Hilfe des Fusionsproteins Hyper-IL-6, das aus IL-6 und dem sIL-6R zusammengesetzt ist und wie der natürlich vorkommende Komplex die IL-6 Trans-Signalübertragung einleiten kann (Fischer et al., 1997).

Um die Bedeutung von IL-2 auf die Hyper-IL-6-vermittelte Granzym-B-Expression zu testen, wurden CD8⁺ T Zellen mit plattengebundenem CD3-Antikörper und Hyper-IL-6 unter Zugabe von IL-2-neutralisierenden Antikörper oder der entsprechenden Isotypkontrolle stimuliert. Wie erwartet induzierte die Stimulation mit Hyper-IL-6 die Hochregulation von Granzym B bei den CD8⁺ T Zellen (Abb. 4.8.1). Nach Stimulation der Zellen ohne Hyper-IL-6 konnte nur eine basale Granzym-B-Expression gemessen werden. Durch Blockade des IL-2-Signals wurde die Hyper-IL-6-vermittelte Granzym-B-Expression signifikant vermindert. Auch die Expression von CD25 war erwartungsgemäß deutlich reduziert, da in Abwesenheit von IL-2 auch die Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors nicht durch IL-2-Signalübertragung positiv verstärkt wird (Kalia et al.,

2010). Interessant ist, dass Hyper-IL-6 neben Granzym B auch die Expression von CD25 signifikant steigerte (Abb. 4.8.1).

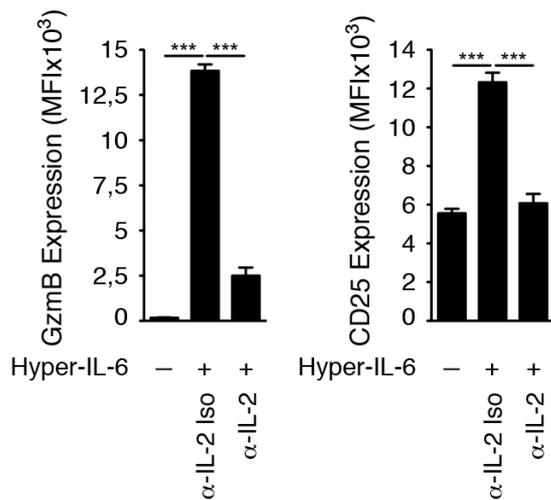


Abbildung 4.8.1: Durch die Blockade von IL-2 wird die Hyper-IL-6 vermittelte Granzym-B-Expression unterdrückt. Naive CD8⁺ T Zellen wurden mit plattengebundenem CD3-Antikörper und Hyper-IL-6 für 18 h stimuliert. Weiterhin wurde ein IL-2-neutralisierender Antikörper oder die entsprechende Isotypkontrolle zugefügt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Einfluss der IL-2-Neutralisation während der IL-6 Trans-Signalübertragung auf die Expression von Granzym B und CD25 untersucht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für n>3 unabhängige Experimente.

Durch Zugabe eines CD25-blockierenden Antikörpers wurde weiterhin untersucht, ob die Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors wichtig für die Granzym-B-Expression durch IL-6 Trans-Signalübertragung ist. Tatsächlich verminderte dies ebenfalls signifikant die Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen, die mit CD3-Antikörper und Hyper-IL-6 für 18 h stimuliert wurden (Abb. 4.8.2). Anhand der starken Verminderung der MFI von CD25 kann die Funktionalität der Blockade belegt werden.

Durch die in Abb. 4.8.1 und Abb. 4.8.2 gezeigten Daten wurde damit eindeutig belegt, dass das IL-2-Signal Bestandteil der durch IL-6 Trans-Signalübertragung eingeleiteten frühen Expression von Granzym B ist.

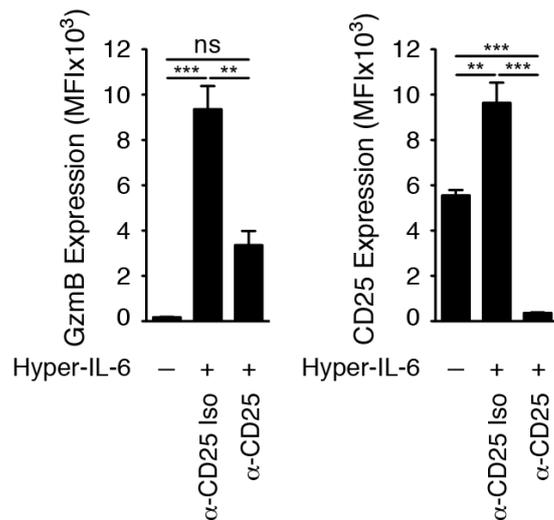


Abbildung 4.8.2: Die Blockade des hochaffinen IL-2 Rezeptors verhindert die Hyper-IL-6-induzierte Expression von Granzym B. FACS-Analyse von CD8⁺ T Zellen, die auf αCD3-beschichteten Zellkulturplatten mit Hyper-IL-6 stimuliert wurden. Weiterhin wurde CD25-blockierender Antikörper oder die entsprechende Isotypkontrolle zugefügt. Nach 18 h erfolgte die FACS-Analyse der Granzym-B- und CD25-Expression. Die Daten sind repräsentativ für n=3 voneinander unabhängige Versuche.

Mit dem Wissen, dass das IL-2-Signal zusammen mit der IL-6 Trans-Signalübertragung die frühe Granzym-B-Expression einleitet, war jedoch noch nicht belegt, dass die hier beschriebene Helfer-Funktion der T_h1 Zellen auch durch Bereitstellung von IL-2 vermittelt werden kann. Die zentrale Frage war daher, ob die frühe Granzym-B-Expression durch Hyper-IL-6 weiter gesteigert werden kann, wenn dem Zellkultur-Medium zusätzlich noch IL-2 zugesetzt wird. Wie in Abb. 4.8.3 dargestellt ist, konnte die Granzym-B-Expression durch IL-2-Zugabe während der Stimulation mit Hyper-IL-6 signifikant gesteigert werden. Auch die Expression von CD25 war durch zusätzliches IL-2 während der IL-6 Trans-Signalübertragung erhöht, wenn auch nicht signifikant. In Anwesenheit von IL-2 und dem CD3-Stimulus alleine konnte nur eine basale Granzym-B-Expression gemessen werden, vergleichbar mit der Stimulation durch den CD3-Antikörper in unbehandeltem Medium. Die CD25-Expression war wie erwartet auch in Anwesenheit von IL-2 ohne Hyper-IL-6 erhöht. Allerdings zeigt die Quantifizierung, dass die Expression vergleichbar mit der Stimulation durch den CD3-Antikörper und Hyper-IL-6 war. Durch IL-6 Trans-Signalübertragung scheint daher die Expression von CD25 gesteigert zu werden, was entweder direkt oder durch Produktion von IL-2 vermittelt werden könnte.

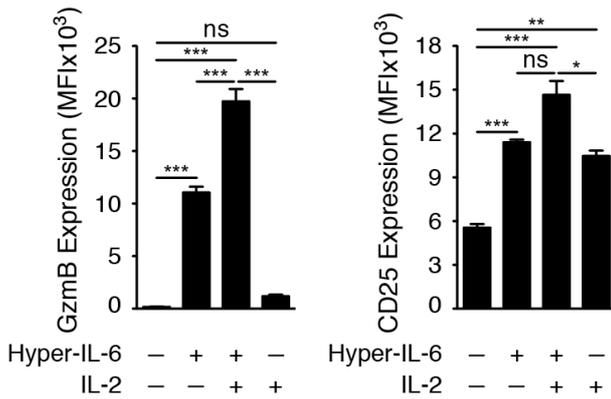


Abbildung 4.8.3: Die Zugabe von IL-2 verstärkt die Granzym-B-Hochregulation durch IL-6 Trans-Signalübertragung. Naive CD8⁺ T Zellen wurden mit plattengebundenem CD3-Antikörper für 18 h stimuliert. Wie angegeben wurde selektiv Hyper-IL-6 und/oder IL-2 zugegeben. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Daten sind repräsentativ für n>3 Experimente.

Der durch Hyper-IL-6 und IL-2 induzierte Effekt der gesteigerten Granzym-B-Expression war weiterhin abhängig von der Konzentration beider Zytokine titrierbar (Abb. 4.8.4). Dabei konnte durch zusätzliche 1 ng/ml und 5 ng/ml IL-2 im Medium jeweils noch eine Steigerung der Hyper-IL-6-eingeleiteten Granzym-B-Expression gemessen werden. Eine weitere Steigerung auf 10 ng/ml IL-2 brachte aber ungeachtet von der Hyper-IL-6-Konzentration keinen weiteren Zugewinn an Granzym-B-Expression. Dies zeigt, dass die T Zellen schon bei 5 ng/ml IL-2 maximal stimuliert waren.

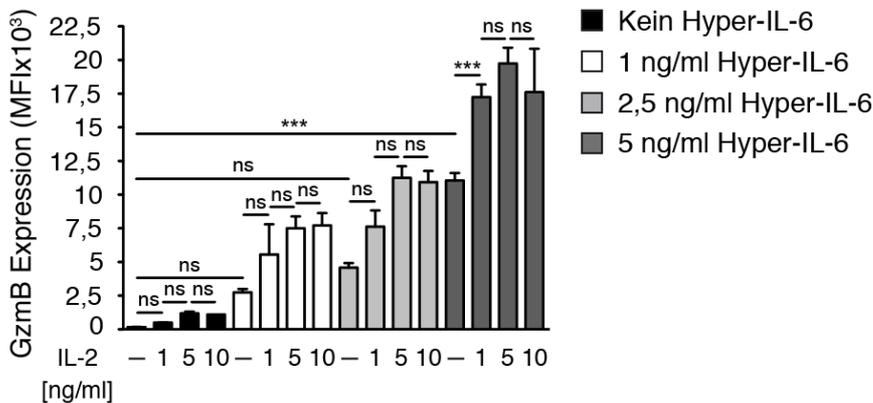


Abbildung 4.8.4: Die frühe Granzym-B-Expression und die weitere Hochregulation durch IL-2 sind titrierbar. Durchflusszytometrische Analyse von CD8⁺ T Zellen nach 18 h Stimulation mit plattengebundenem CD3-Antikörper. Dem T Zell-Medium wurde weiterhin Hyper-IL-6 und IL-2 in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Daten sind repräsentativ für n=3 voneinander unabhängige Versuche.

T_h1 Zellen sezernieren große Mengen an IL-2 nach Stimulation, was auch nach Antigen-spezifischer Interaktion mit LSEC nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.6.2b). Der Form halber wurde nicht gezeigt, dass von T_h1 Zellen freigesetztes IL-2 die Granzym-B-Expression nach LSEC-Stimulation steigert. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass IL-2

von T_h1 Zellen einen entscheidenden Anteil an der hier beschriebenen Helfer-Funktion bei der LSEC-vermittelten Induktion von $CD8^+$ T Zellen hat.

4.9 LSEC können nach Aktivierung die frühe Granzym-B-Expression von $CD8^+$ T Zellen Zytokin-vermittelt induzieren

Die Helfer-Funktion von T_h1 Zellen bei der frühen Granzym-B-Expression von $CD8^+$ T Zellen ist LSEC-spezifisch und kann auch alleine durch den Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen in Kombination mit plattengebundenem CD3-Antikörper eingeleitet werden. Dies deutet zusammen mit der fehlenden Granzym-B-Expression nach 18 h IL-2-Stimulation ohne Hyper-IL-6 darauf hin, dass auch LSEC die Expression von Granzym B durch Zytokin-Sekretion einleiten und steigern können. Durch Blockade mit funktionalem IL-6-Antikörper oder dem Protein sgp130Fc konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Beteiligung der IL-6 Trans-Signalübertragung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um dennoch eine mögliche Beteiligung der Zytokin-Sekretion durch LSEC zu analysieren, wurde alternativ ein Kultur-Überstand aus der Stimulation von T_h1 Zellen mit CD3/CD28-beschichteten Partikeln generiert, der nur inflammatorische Zytokine der T_h1 Zellen enthielt. Dieser Überstand löste vergleichbar mit dem T Zell-Medium der unbehandelten Probe nur eine basale Granzym-B-Expression aus (Abb. 4.9.1). Auch der Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen, der ohne Antigen generiert wurde, hatte, wie bereits gezeigt, kaum einen verstärkenden Effekt auf die Granzym-B-Expression der $CD8^+$ T Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten $CD8^+$ T Zellen, die mit CD3-Antikörper und dem Überstand von LSEC und T_h1 Zellen mit Antigen stimuliert wurden, eine starke Granzym-B-Expression. Diese war vergleichbar mit der Stimulation von Hyper-IL-6, was als Positivkontrolle eingesetzt wurde.

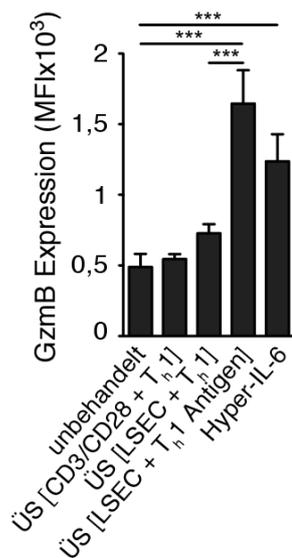


Abbildung 4.9.1: Die Zytokin-Sekretion von T_h1 Zellen reicht alleine nicht aus, um die Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen einzuleiten. Naive CD8⁺ T Zellen wurden für 18 h mit plattengebundenem CD3-Antikörper unter Zusatz verschiedener Zellkultur-Überstände, von Hyper-IL-6 als Positivkontrolle oder T Zell-Medium als Negativkontrolle (unbehandelt) stimuliert. Die Analyse der Granzym-B-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Daten sind repräsentativ für n>3 unabhängige Experimente.

Die in Abb. 4.9.1 analysierten Daten deuten darauf hin, dass LSEC die Expression von Granzym B bei CD8⁺ T Zellen nach T_h1-vermittelter Aktivierung durch Zytokin-Freisetzung einleiten können. Aber gilt das nur in Bezug auf die Stimulation durch T_h1 Zellen, oder für die Aktivierung von LSEC allgemein? Wie bereits anhand der gesteigerten Expression von VCAM-1, ICAM-1 und H-2K^b nachgewiesen werden konnte, werden LSEC auch durch die Stimulation mit LPS aktiviert. Die Überstände des in Abb. 4.6.1a-b analysierten Experimentes wurden im Folgenden zur Stimulation naiver CD8⁺ T Zellen in Kombination mit plattengebundenem CD3-Antikörper verwendet. Wie schon zuvor gezeigt, induzierte der Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen eine starke Granzym-B-Expression (Abb. 4.9.2). Interessanterweise zeigten CD8⁺ T Zellen, die mit dem Überstand aus der Kultur von LSEC mit LPS inkubiert wurden, ebenfalls eine signifikante Hochregulation von Granzym B. Durch die TCR-Stimulation der CD8⁺ T Zellen und die Inkubation mit unbehandeltem Medium oder dem Überstand von LSEC mit Antigen wurde nur eine basale Granzym-B-Expression eingeleitet. Man kann die Daten daher als weiteren Hinweis darauf verstehen, dass LSEC nach Aktivierung ein Zytokin oder verschiedene Zytokine sekretieren, was als Folge die Induktion der CD8⁺ T Zellen induziert.

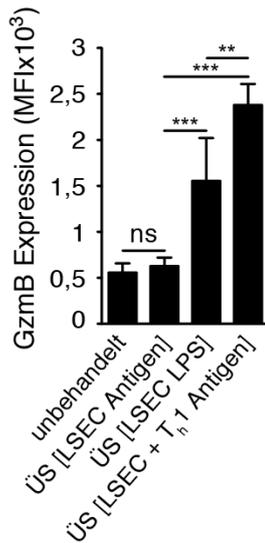


Abbildung 4.9.2: LSEC induzieren nach Aktivierung die Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen durch Zytokin-Sekretion. FACS-Analyse von CD8⁺ T Zellen, die auf α CD3-beschichteten Platten mit Zellkultur-Überständen von LSEC oder LSEC und T_h1 Zellen stimuliert wurden. Dargestellt ist die MFI-Analyse der T Zellen nach 18 h Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für n=3 voneinander unabhängige Experimente.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LSEC die Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen nach Aktivierung durch Freisetzung von Zytokinen einleiten können. T_h1 Zellen verstärken dies nach Antigen-spezifischer Interaktion mit LSEC ebenfalls durch Zytokin-Produktion. Im Fall von T_h1 Zellen wird die Steigerung der Granzym-B-Expression sehr wahrscheinlich durch IL-2 gesteuert. Es konnte nicht nachgewiesen werden, durch welches Zytokin LSEC die Hochregulation des Zytotoxizitätsmarkers bei CD8⁺ T Zellen induzieren. Da jedoch der Phänotyp zum Zeitpunkt von 18 h bei den T Zellen nach gesteigerter Aktivierung der LSEC nicht verändert, sondern nur verstärkt ist, ist durchaus denkbar, dass die Stimulation der T Zellen grundsätzlich weiterhin über die gleichen Signale vermittelt wird. In dem Fall würden LSEC IL-6 und den sIL-6R freisetzen, was als Komplex zusammen mit dem von T_h1 Zellen sekretierten IL-2 bei CD8⁺ T Zellen eine starke Expression von Granzym B bereits nach 18 h induziert.

5 Diskussion

Für die funktionale Aktivierung naiver T Zellen wird eine Kombination von drei Signalen benötigt. Diese bestehen aus der Antigen-spezifischen Stimulation des TCR, aus kostimulatorischen Signalen und aus inflammatorischen Signalen, die die Anwesenheit von Gefahr anzeigen (Curtsinger and Mescher, 2010; Curtsinger et al., 2005). Fehlen solche inflammatorischen Signale, so sind T Zell-Toleranz, Deletion und Anergie die Folge (Curtsinger et al., 2003; Curtsinger and Mescher, 2010; Kolumam et al., 2005). CD4⁺ T Helferzellen können die Unterstützung liefern, um eine Aktivierung und funktionale Differenzierung der CD8⁺ T Zellen einzuleiten und so die Bildung von Toleranz zu verhindern (Bevan, 2004). Die Hilfe von CD4⁺ T Zellen wird nicht generell, sondern abhängig von den inflammatorischen Stimuli für die Einleitung einer CTL-vermittelten primären Immunantwort gebraucht. Besonders wichtig ist sie aber bei Infektionen mit weniger starken einhergehenden inflammatorischen Signalen oder bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen in Abwesenheit von Inflammation (Bennett et al., 1997; Wang and Livingstone, 2003; Wiesel and Oxenius, 2012). Weiterhin ist die Fähigkeit von CD8⁺ T Zellen zur Bildung von Gedächtniszellen abhängig von der Anwesenheit von CD4⁺ T Zellen (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003).

Naive CD8⁺ T Zellen differenzieren unter homöostatischen Bedingungen durch LSEC-Induktion zu Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen (Böttcher et al., 2013), dem ein sehr früher, jedoch vorübergehender Gewinn zytotoxischer Effektorfunktionen vorausgeht (Böttcher et al., 2014). T_h1 Zellen werden, wie andere Effektor T Zellen auch, gezielt in die Leber rekrutiert (Derkow et al., 2011; Klugewitz et al., 2002b) und sind Quelle proinflammatorischer Zytokine, die die Aktivierung und Differenzierung von CD8⁺ T Zellen unterstützen können (Wan, 2010). Virus-spezifischen CD4⁺ T Zellen konnte eine Beteiligung an der Bekämpfung hepatischer Infektionen durch Mithilfe an der Induktion von CD8⁺ T Zellen nachgewiesen werden (Grakoui et al., 2003; Provine et al., 2014). Allerdings werden Effektorfunktionen von T_h1 Zellen unter homöostatischen Bedingungen von den in der Leber als APC vorherrschenden LSEC langfristig gehemmt (Carambia et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass T_h1 Zellen auch unter homöostatischen Bedingungen *in vitro* die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC unterstützen. Dabei steigerte die T_h1-vermittelte Hilfe spezifisch die frühe Expression von Granzym B bei LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen, während DC-induzierte CD8⁺ T Zellen keine verstärkte frühe Expression des Zytotoxizitätsmarkers aufwiesen. Der beobachtete

Effekt war abhängig von der Antigen-spezifischen Interaktion von LSEC und T_h1 Zellen und wurde durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine beider Zellpopulationen eingeleitet. LSEC konnten nach Aktivierung einen löslichen Botenstoff sekretieren, der die Granzym-B-Expression der CD8⁺ T Zellen induzierte und so erst ermöglichte. Im Fall von T_h1 Zellen ist es sehr wahrscheinlich, dass freigesetztes IL-2 die Expression von Granzym B und CD25 weiter steigerte. Durch die Analyse der beobachteten Helfer-Funktion konnte weiterhin die elementare Bedeutung von IL-2 bei der durch IL-6 Trans-Signalübertragung induzierten Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen nachgewiesen werden.

Die hier vorgestellten Daten belegen somit eine neue T_h1-vermittelte Helfer-Funktion bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC. Die CD4⁺ T Zellen können auch unter homöostatischen Bedingungen die frühe Expression von Granzym B und CD25 steigern und zu der optimalen Aktivierung von CD8⁺ T Zellen durch LSEC beitragen.

5.1 Die Interaktion von T_h1 Zellen mit LSEC führt zu einer frühen wechselseitigen Aktivierung

Die Hilfe von CD4⁺ T Zellen ist essenziell für die Generierung von CD8⁺ Gedächtniszellen nach Aktivierung durch professionelle APC (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Unter inflammatorischen Bedingungen konnte bereits gezeigt werden, dass Pathogen-spezifische Helferzellen auch wichtig für die optimale Induktion von CD8⁺ T Zellen in der Leber und die langfristige Bekämpfung hepatischer Infektionen sind (Gerlach et al., 1999; Grakoui et al., 2003; Provine et al., 2014). Es ist durchaus denkbar, dass CD4⁺ T Zellen auch an der Generierung Leber-induzierter Gedächtnis T Zellen unter homöostatischen Bedingungen mitwirken. Dagegen spricht, dass LSEC in Abwesenheit von Inflammation langfristig Effektorfunktionen von T_h1 Zellen inhibieren (Carambia et al., 2013). Daher stand neben der Frage, ob T Helferzellen an der Generierung Leber-induzierter Gedächtnis T Zellen beteiligt sind, die folgende Frage im Vordergrund: Sind CD4⁺ T Zellen dazu fähig, die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC zu unterstützen? Ziel dieser Arbeit war es, dies herauszufinden.

Wie bereits erwähnt, werden T_h1 Zellen gezielt in die Leber rekrutiert (Derkow et al., 2011; Klugewitz et al., 2002b), eine Interaktion mit LSEC findet also *in vivo* prinzipiell statt. Sie sekretieren inflammatorische Zytokine, die die Induktion von CD8⁺ T Zellen

unterstützen können und sind an der Einleitung Zell-vermittelter Immunantworten beteiligt (Wan, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Generierung von T_{h1} Zellen mit der Expression des charakteristischen Transkriptionsfaktors T-bet etabliert werden. Nach Restimulation exprimierten diese T_{h1} Zellen weiterhin die typischen Zytokine $IFN\gamma$ und TNF (siehe Abschnitt 4.1). Auch nach 18 h Kokultur mit LSEC oder LSEC und OT-I Zellen zeigten die Helferzellen Effektorfunktionen wie die Sekretion von $IFN\gamma$ und IL-2 sowie die Expression von Granzym B (siehe Abschnitt 4.6). Es scheint daher, dass die Interaktion mit LSEC nicht zu einer sofortigen Einschränkung der Effektorfunktionen von T_{h1} Zellen führt. Vielmehr konnten T_{h1} Zellen durch LSEC Antigen-spezifisch stimuliert werden und inflammatorische Zytokine freisetzen. LSEC waren DC und CD3/CD28-beschichteten Partikeln in Bezug auf die 18-stündige Stimulation der T_{h1} Zellen nicht unterlegen (siehe Abschnitt 4.6). Im Vergleich wirkt es sogar so, als ob LSEC effizienter in der kurzzeitigen Stimulation der $CD4^+$ T Zellen sind. *In vivo* unter nicht ganz so optimalen Interaktionsbedingungen ist dies aber unwahrscheinlich. Die Inhibierung der Effektorfunktionen der T Zellen durch LSEC tritt dagegen erst nach mehrtägiger Inkubation auf (Carambia et al., 2013) und beeinflusst nicht unbedingt die frühe Hilfe bei der Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC. T_{h1} Zellen, die außerhalb der Leber generiert wurden und deren Effektorfunktionen somit nicht direkt durch das tolerogene Milieu dieses Organs eingeschränkt sind, könnten daher die beobachtete Helferfunktion bei der Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC ausüben.

Neben den T_{h1} Zellen wurden auch LSEC durch die Antigen-spezifische Interaktion mit T_{h1} Zellen aktiviert. Nach Inkubation mit T_{h1} Zellen konnte auch im Vergleich zu der bereits aktivierenden Stimulation mit LPS eine signifikante Steigerung der Expression von VCAM-1, ICAM-1 und H-2K^b nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.6). Die verstärkte Präsenz von H-2K^b auf der Oberfläche der LSEC könnte *in vivo* und *in vitro* die ohnehin schon gute Effizienz der Zellen zur Präsentation von Antigenen für $CD8^+$ T Zellen weiter verbessern. VCAM-1 und ICAM-1 sind wichtig für die Einwanderung von $CD8^+$ T Zellen in die Leber (John and Crispe, 2004; Knolle and Gerken, 2000; Oo and Adams, 2010). *In vivo* könnte deren gesteigerte Expression daher zu einer verstärkten Rekrutierung der T Zellen führen. VCAM-1 reguliert weiterhin die Einwanderung von T_{h1} Zellen in hepatische Gewebe (Bonder et al., 2005; Oo and Adams, 2010). Es ist daher durchaus denkbar, dass eine Aktivierung von LSEC durch T_{h1} Zellen die Rekrutierung weiterer T_{h1} Zellen begünstigt.

Weiterhin konnten in den Überständen der Kokultur von LSEC und T_{h1} Zellen sowie LSEC, T_{h1} und OT-I Zellen gesteigerte Konzentrationen von IL-6, wenn auch nicht immer signifikant, nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.6). IL-6 alleine kann die Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC nicht steigern (Böttcher et al., 2014). An den IL-6R von LSEC gebundenes IL-6 könnte aber durchaus zu einer gesteigerten Granzym-B-Expression der T Zellen führen. Dieser Komplex auf LSEC ist so jedoch nicht nachweisbar. Im Zuge der Arbeit konnte keine Beteiligung der IL-6 Trans-Signalübertragung an der beobachteten Helfer-Funktion von T_{h1} Zellen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.7). Ursache dafür könnten jedoch auch technische Probleme gewesen sein.

Zusammenfassend konnte belegt werden, dass LSEC und T_{h1} Zellen Antigen-spezifisch interagieren. Dies führte zum frühen Zeitpunkt nach 18 h Kokultur zu der gegenseitigen Aktivierung beider Zellpopulationen, was die Grundlage für die im Folgenden diskutierte Hilfe von T_{h1} Zellen bei der Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC darstellt.

5.2 T_{h1} Zellen verstärken die frühe Expression von Granzym B und CD25 spezifisch bei LSEC-induzierten $CD8^+$ T Zellen

Die Induktion naiver $CD8^+$ T Zellen durch LSEC führt zu der Bildung von Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen, die die konventionelle Entwicklung von Effektor- und Gedächtniszellen ergänzen (Böttcher et al., 2013). Der Mechanismus der IL-6 Trans-Signalübertragung trägt elementar zu der Induktion der T Zellen durch die Leber-APCs bei (Böttcher et al., 2014). Eine Beteiligung der IL-6 Signalübertragung (MacLeod et al., 2011), auch in Kombination mit IL-2 (Okada et al., 1988; Takai et al., 1988), an der Differenzierung zu CTL und Gedächtniszellen konnte bereits beobachtet, aber nicht im Detail charakterisiert werden. Allerdings untersuchten die Studien nur die klassische IL-6 Signalübertragung und den Gewinn von Effektorfunktionen nach mehrtägiger Stimulation.

LSEC können sehr effizient im Blut zirkulierende lösliche Antigene aufnehmen und diese $CD8^+$ T Zellen kreuzpräsentieren (Knolle and Limmer, 2003). Unter homöostatischen Bedingungen resultiert dies in der Generierung langlebiger Gedächtniszellen, die in lymphatische Gewebe einwandern können und das Potenzial besitzen, neue Effektor T Zellen zu generieren. LSEC-induzierte Gedächtniszellen können nach Antigen-spezifischer Reaktivierung, die zusammen mit kostimulatorischen Signalen über CD28

und IL-12 erfolgt, effektiv an der Bekämpfung von Infektionen unter inflammatorischen Bedingungen beteiligt sein. Damit unterstützen die Endothelzellen die Induktion einer Immunantwort durch CD8⁺ T Zellen gegen zuvor zirkulierende Antigene. Dies kann besonders dann von Bedeutung sein, wenn Antigene ohne damit einhergehende Aktivierung des angeborenen Immunsystems systemisch verteilt werden, wie es beispielsweise bei Tumoren oder viralen Infektionen vorkommt (Böttcher et al., 2013). Kreuzpräsentation durch professionelle APC wie DC führt unter diesen Bedingungen zu Toleranz, Deletion und Anergie (Probst et al., 2005; Redmond and Sherman, 2005; Steinman et al., 2003). Durch Induktion von Gedächtniszellen verhindern LSEC somit die Eliminierung Antigen-spezifischer CD8⁺ T Zellen aus dem T Zell-Repertoire und ermöglichen zu einem späteren Zeitpunkt die Generierung Pathogen-spezifischer T Zell-Immunantworten (Böttcher et al., 2013).

Böttcher und Schanz konnten zeigen, dass der Differenzierung zu Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen eine sehr frühe, vorübergehende Expression von Granzym B vorausgeht. Die LSEC-induzierten T Zellen sind bereits nach 18 h in der Lage, zytotoxische Effektorfunktionen auszuüben und Zielzellen zu töten (Böttcher et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses experimentelle Modell verwendet, um den Einfluss von T_h1 Zellen auf die LSEC-vermittelte Induktion von CD8⁺ T Zellen zu analysieren. Die aktivierten CD8⁺ T Zellen wurden dafür auf die Expression von Granzym B, CD25 und CD44 hin untersucht. Die Granzym-B-Expression zeigt das zytotoxische Potenzial der Zellen (Heusel et al., 1994; Trapani and Smyth, 2002), während die Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25) wichtig für die angehende Differenzierung, Proliferation und Expansion der Zellen ist (Lan et al., 2008). Erhöhte Level des Adhäsionsmoleküls CD44 zeigen die Antigen-spezifische Stimulation der T Zellen (Baaten et al., 2010).

CD8⁺ T Zellen, die durch Kreuzpräsentation von LSEC aktiviert wurden, weisen bereits eine starke Expression von Granzym B, CD25 und CD44 auf (Böttcher et al., 2014). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In Anwesenheit von T_h1 Zellen wurde die Expression von Granzym B und CD25 auf LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen weiter erhöht (siehe Abschnitt 4.2). Dies deutet auf ein verstärktes zytotoxisches Potenzial und die gesteigerte Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung durch Hilfe von T_h1 Zellen hin und passt zu der durch T_h1 Zellen verstärkten Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen unter inflammatorischen Bedingungen in der Leber (Derkow et al., 2011). Die Expression von CD44 war in Gegenwart der CD4⁺ T Zellen nicht verändert (siehe Abschnitt 4.2). In wenigen Experimenten steigerte die Anwesenheit von T_h1 Zellen auch

die Expression von CD44 (siehe Abschnitt 4.3 und Abschnitt 4.5). Dies konnte jedoch nur selten beobachtet werden und ändert nichts an dem hier beschriebenen Phänotyp der LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen. Die beobachtete Expression von Granzym B, CD25 und CD44 trat nur ein, wenn LSEC das OVA-Antigen präsentierten. In Abwesenheit der APC oder des Antigens fand keine Aktivierung der Zellen statt, vielmehr konnte ein Phänotyp vergleichbar mit naiven OT-I Zellen (0 h Zeitpunkt) beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.2). T Zellen ohne Kontakt zu LSEC wiesen eine erhöhte Mortalität auf, was durch die Inkubation von OT-I Zellen zusammen mit T_h1 Zellen reduziert war (Daten nicht gezeigt). Eine verstärkte Expression von Granzym B, CD25 und CD44 konnte aber auch hier nicht beobachtet werden. LSEC-induzierte CD8⁺ T Zellen erhalten neben der Präsentation von Antigenen Überlebenssignale durch die APC und exprimieren das anti-apoptotische Protein Bcl-2 (Böttcher et al., 2013; Diehl et al., 2008). Auch T_h1 Zellen scheinen Überlebenssignale in der Kokultur mit OT-I Zellen bereitzustellen. Zu der Aktivierung der CD8⁺ T Zellen führt dies jedoch nicht.

Böttcher und Schanz konnten bereits zeigen, dass die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch DC nicht zu einer signifikanten frühen Expression von Granzym B führt. Sie sahen jedoch keine Unterschiede bei der Expression von CD25 und CD44 zwischen LSEC- und DC-induzierten OT-I Zellen (Böttcher et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Stimulation von DC ebenfalls nur eine geringe Granzym-B-Expression in CD8⁺ T Zellen induziert werden. Dies konnte auch durch die Hilfe von T_h1 Zellen nicht verändert werden (siehe Abschnitt 4.3). In dem in Abschnitt 4.3 analysierten Experiment waren DC jedoch durchaus in der Lage, im Vergleich zu LSEC eine höhere Expression von CD25 und CD44 einzuleiten. Die Expression von CD25 war dabei in Anwesenheit von T_h1 Zellen weiter signifikant erhöht. Das deutet darauf hin, dass die CD4⁺ T Zellen auch die Stimulation von OT-I Zellen durch DC unterstützten, jedoch führte dies nicht zu einer Steigerung der frühen Granzym-B- und CD44-Expression. Ein Zusammenhang zwischen der Hilfe durch CD4⁺ T Zellen und der Hochregulation von CD25 konnte bereits *in vivo* für virale und bakterielle Infektionen nachgewiesen werden (Obar et al., 2010). Die CD25-Hochregulation kann dabei durch Lizenzierung der APC oder aber direkt durch IL-2-Sekretion stimulierter Helferzellen erfolgen (Cox et al., 2011; Obar et al., 2010).

Die Unterschiede in der Expression von CD25 und CD44 waren nicht in jedem Versuch so signifikant, wie in dem in Abschnitt 4.3 gezeigten Experiment. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei der Kokultur von vier verschiedenen primären Zellarten

durchaus die Vitalität der einzelnen Zellpopulationen schwanken kann. Dies ändert aber grundsätzlich nichts an dem hier beschriebenen Phänotyp.

Interessant ist, dass in Anwesenheit von T_H1 Zellen die Expression bestimmter Marker gesteigert wurde. Der grundsätzliche Phänotyp, der hier durch die Art der APC und die damit einhergehende Kombination stimulatorischer Signale bestimmt wurde, blieb jedoch zum frühen Zeitpunkt von 18 h auch in Anwesenheit der Helferzellen erhalten. LSEC-stimulierte $CD8^+$ T Zellen exprimierten auch unter dem Einfluss von T_H1 Zellen weiterhin Granzym B, CD25 und CD44. Granzym B und CD25 wurden durch die Hilfe der $CD4^+$ T Zellen aber weiter hochreguliert. DC-stimulierte $CD8^+$ T Zellen zeigten dagegen auch nach Unterstützung der Induktion durch T_H1 Zellen keine signifikante Expression von Granzym B. Die CD44-Expression blieb jedoch erhalten und CD25 wurde hochreguliert, was auf die Hilfe der $CD4^+$ T Zellen hindeutet. T_H1 Zellen scheinen daher die Induktion der $CD8^+$ T Zellen durch LSEC und DC zu unterstützen. Zumindest zu dem frühen Zeitpunkt von 18 h verändern sie diese aber nicht.

5.3 T_H1 Zellen verstärken die Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC Antigen-spezifisch

Für die Induktion von naiven $CD8^+$ T Zellen durch LSEC und der daraus resultierenden frühen Granzym-B-Expression ist eine Antigen-spezifische Interaktion zwischen dem TCR der T Zellen und dem Peptid/MHC-I-Komplex der APC unabdingbar. Dies konnte bereits durch Böttcher und Schanz gezeigt werden (Böttcher et al., 2014) und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt (siehe Abschnitt 4.2).

Die Helfer-Funktion von $CD4^+$ T Zellen bei der Induktion von HSV-spezifischen $CD8^+$ T Zellen durch DC beruht ebenfalls auf der MHC-II-vermittelten, Antigen-spezifischen Interaktion der Zellen (Smith et al., 2004). LSEC exprimieren konstitutiv jedoch nur geringe Mengen an MHC-II (Thomson and Knolle, 2010). Deshalb wurde der Kokultur zur Ermöglichung der optimalen Interaktion von LSEC und T_H1 Zellen neben OVA auch das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉, das OT-II Zellen auf I-Ab Molekülen wegen ihres transgenen TCR erkennen können, zugesetzt. Da die Anwesenheit von Antigen aber Grundvoraussetzung für die Aktivierung der $CD8^+$ T Zellen ist und LSEC auch aufgenommenes OVA prozessieren und über MHC-II präsentieren können, war weiterhin unklar, ob die beobachtete Helfer-Funktion wirklich der Antigen-spezifischen

Interaktion von LSEC und T_H1 Zellen bedarf. Dies wurde untersucht, indem die OVA-basierte Interaktion auf der TCR/MHC-Ebene unterbunden wurde.

T_H1 -differenzierte Zellen mit einem Wildtyp-TCR, der nicht das durch LSEC präsentierte OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid erkennt, konnten die Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch die Endothelzellen nicht unterstützen (siehe Abschnitt 4.4). Gleiches konnte beobachtet werden, wenn durch Verwendung von MHC-II defizienten LSEC die Antigen-spezifische Interaktion mit T_H1 Zellen unterbunden wurde. In diesem Fall löste die Anwesenheit von OT-II T_H1 Zellen eine leicht erhöhte Granzym-B- und CD25-Expression aus (siehe Abschnitt 4.4). Es ist möglich, dass T_H1 Zellen aufgrund der Voraktivierung geringe Mengen an Zytokinen sekretierten, was die leichte Hochregulation von Granzym B und CD25 bei den $CD8^+$ T Zellen induzierte. Die geringe Steigerung deutet aber nicht darauf hin, dass hier eine Antigen-unspezifische T_H1 -Hilfe stattfand.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass auch bei der Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC die Antigen-spezifische Interaktion mit T_H1 Zellen Voraussetzung für die beobachtete Helfer-Funktion ist.

5.4 Die LSEC-spezifische Helfer-Funktion von T_H1 Zellen ist Zytokin-vermittelt und abhängig von IL-2

T_H1 Zellen steigern LSEC- und Antigen-spezifisch die frühe Granzym-B- und CD25-Expression von OT-I Zellen. Diese neue Helfer-Funktion weist die Möglichkeit auf, dass T_H1 Zellen auch unter homöostatischen Bedingungen an der Induktion von $CD8^+$ T Zellen in der Leber beteiligt sein könnten.

Von der Aktivierung von $CD8^+$ T Zellen durch DC ist bereits bekannt, dass $CD4^+$ T Zellen über verschiedene Mechanismen ihre Helfer-Funktion ausüben können. Dies kann über die Lizenzierung der APC (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Smith et al., 2004) oder aber über die Freisetzung von Zytokinen (Bos and Sherman, 2010; Cox et al., 2011) erfolgen. Wie die neue Helfer-Funktion bei der Aktivierung von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC vermittelt wird, sollte im Folgenden herausgefunden werden. Erschwert wurde dies jedoch durch die Tatsache, dass die $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen in der Kokultur durch dieselben an der Zellkulturplatte adhären APC stimuliert wurden. Zur Analyse einer möglichen Zytokin-vermittelten Helfer-Funktion wurden daher Überstände aus der Kokultur von LSEC und T_H1 Zellen analog zu den Versuchsbedingungen aus der Kokultur

von LSEC, OT-I und T_{h1} Zellen generiert. Diese Überstände, die alle potenziellen von LSEC und T_{h1} Zellen sekretierten Zytokine enthielten, wurden im Folgenden als Medium für die Stimulation von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC verwendet. Bei der LSEC-Stimulation von OT-I Zellen in Anwesenheit dieser Überstände konnte eine Erhöhung der Granzym-B- und CD25-Expression im Vergleich zu der Stimulation in unbehandeltem T Zell-Medium nachgewiesen werden. Diese Hochregulation war vergleichbar mit der Expression von Granzym B und CD25 auf $CD8^+$ T Zellen, die durch LSEC mit der Hilfe von T_{h1} Zellen induziert wurden (siehe Abschnitt 4.5). Die beobachtete Helfer-Funktion von T_{h1} Zellen wird damit durch Zytokine vermittelt. Die Ergebnisse schließen jedoch trotzdem nicht aus, dass T_{h1} Zellen LSEC zusätzlich lizenzieren und so die Aktivierung von $CD8^+$ T Zellen weiter steigern können.

Eine Lizenzierung von APC resultiert unter anderem in der verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle (Ahmed et al., 2012; Caux et al., 1994; Cella et al., 1996). Böttcher und Schanz konnten zeigen, dass für die LSEC-induzierte frühe Expression von Granzym B keine konventionellen kostimulatorischen Signale benötigt werden (Böttcher et al., 2014). Die Auswirkung auf das Ausbleiben kostimulatorischer Signale und damit die Bedeutung der Lizenzierung von LSEC durch T_{h1} -Hilfe wurden deshalb untersucht, indem $CD8^+$ T Zellen auf $\alpha CD3$ -beschichteten Zellkulturplatten stimuliert wurden. Als Medium dienten die Überstände aus der Kokultur von LSEC und T_{h1} Zellen. Damit konnten zur Aktivierung der T Zellen nur die Stimulation des TCR durch den CD3-Antikörper und die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Zytokine beitragen. Durch Verwendung des Kokultur-Überstandes von LSEC und T_{h1} Zellen, der unter Antigen-Zusatz generiert wurde, zeigten die $\alpha CD3$ -aktivierten T Zellen analog zu der Stimulation durch LSEC eine Hochregulation von Granzym B (siehe Abschnitt 4.5). Damit konnte gezeigt werden, dass auch hier für die beobachtete Einleitung der Granzym-B-Expression von $CD8^+$ T Zellen kostimulatorische Signale nicht zwingend notwendig sind. Die beobachtete Granzym-B-Induktion bei $CD8^+$ T Zellen ist damit wie bereits erwähnt Zytokin-vermittelt und scheint keiner weiteren Lizenzierung der LSEC zu bedürfen, wenn das Zytokin-Milieu, welches durch die Interaktion von LSEC und T_{h1} Zellen entsteht, bereits vorhanden ist.

Die Helfer-Funktion von T_{h1} Zellen bei der Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC beruht auf der Antigen-spezifischen Interaktion der Helfer T Zellen mit den Leber-APCs, was außerdem zu der Aktivierung dieser beiden Zelltypen führt. Daher könnten potenziell T_{h1} Zellen sowie LSEC für die Freisetzung des Zytokins oder der Zytokine

verantwortlich sein, die die Granzym-B-Expression der CD8⁺ T Zellen induzieren und steigern. Tatsächlich sekretieren sowohl T_h1 Zellen als auch LSEC potenziell in Frage kommende Zytokine in der Kokultur (siehe Abschnitt 4.6).

Seit der von Böttcher und Schanz veröffentlichten Studie ist bekannt, dass der Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6R (sIL-6R) die frühe Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen induziert. Sie untersuchten die Wirkung dieses Komplexes durch Verwendung des aus IL-6 und dem sIL-6R bestehenden Fusionsproteins Hyper-IL-6. Für die Induktion durch LSEC konnte jedoch keine Beteiligung des löslichen IL-6/sIL-6R-Komplexes nachgewiesen werden. Vielmehr konnte belegt werden, dass IL-6 an den membranständigen IL-6R auf LSEC bindet. Dieser Komplex in Trans konnte dann mit dem auf CD8⁺ T Zellen exprimierten Protein gp130 interagieren, was zu der Dimerisierung von gp130 führte und die IL-6 Trans-Signalübertragung trotz des Fehlens des löslichen IL-6/IL-6R-Komplexes ermöglichte (Böttcher et al., 2014). Dies kann bei der hier beobachteten Granzym-B-Induktion durch LSEC mit Hilfe von T_h1 Zellen jedoch zumindest nicht alleine für den frühen Gewinn zytoxischer Eigenschaften der CD8⁺ T Zellen verantwortlich sein, da auch die Stimulation mit dem Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen zusammen mit plattengebundenen CD3-Antikörper einen vergleichbaren Phänotyp hervorrief (siehe Abschnitt 4.5). Denkbar ist daher, dass LSEC nach Aktivierung durch T_h1 Zellen IL-6 und den sIL-6R freisetzen können. Der IL-6/sIL-6R-Komplex könnte dann die Granzym-B-Hochregulation der T Zellen induzieren. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung der IL-6 Trans-Signalübertragung jedoch nicht nachgewiesen werden. Die kombinierte Blockade der klassischen und der IL-6 Trans-Signalübertragung durch IL-6 neutralisierenden Antikörper hatte keinen Einfluss auf die Granzym-B-Expression der CD8⁺ T Zellen. Auch die spezifische Inhibierung der IL-6 Trans-Signalübertragung durch das Protein sgp130Fc zeigte keine Wirkung (Daten nicht gezeigt). Dies widerspricht jedoch dem durch Böttcher und Schanz postulierten Mechanismus, nach dem zumindest die Expression von Granzym B durch IL-6-neutralisierenden Antikörper in der Kokultur von LSEC und OT-I Zellen inhibiert sein sollte (Böttcher et al., 2014). Ursache für die ausbleibende Wirkung der IL-6 Blockade könnten demnach technische Probleme wie die fehlende Funktionalität des IL-6-Antikörpers gewesen sein. Ein Nachweis der Beteiligung der IL-6 Trans-Signalübertragung konnte deshalb nicht erfolgen, ausgeschlossen werden kann dies jedoch auch nicht. Fest steht, dass der Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen einen Botenstoff oder eine Kombination verschiedener Zytokine enthält, die die Expression von Granzym B bei CD8⁺ T Zellen induzieren.

Böttcher und Schanz konnten bereits die Beteiligung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-12, Typ I IFN oder IL-15 an der frühen Granzym-B-Induktion von CD8⁺ T Zellen ausschließen. Auch die Blockade von IFN γ [?] [?] [?] [?] [?] [?] [?] [?] [?] [?]. Durch IL-2-neutralisierenden Antikörper konnte jedoch sowohl die LSEC-induzierte frühe Hochregulation von Granzym B, als auch die späte DC-induzierte Expression des Zytotoxizitätsmarkers unterbunden werden. Umgekehrt induzierte die Stimulation mit IL-2 jedoch keine Granzym-B-Expression der T Zellen nach 18 h, auch eine steigernde Wirkung durch die Inkubation von LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen mit IL-2 konnte nicht beobachtet werden. Eine direkte Einleitung der frühen Expression von Granzym B durch IL-2 wurde deshalb ausgeschlossen (Böttcher et al., 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch die Blockade von IL-2 ebenfalls die Granzym-B-Hochregulation von LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen verhindert werden. Auch die Expression von CD25 war unter diesen Bedingungen signifikant vermindert. Die Zugabe von IL-2-neutralisierendem Antikörper verringerte ebenfalls in Anwesenheit von T_h1 Zellen signifikant die Expression von Granzym B und CD25 (siehe Abschnitt 4.7). Die verminderte Expression von Granzym B durch die Blockade von IL-2 konnte nicht nur bei der Kokultur mit LSEC beobachtet werden, sondern auch bei der Stimulation von CD8⁺ T Zellen mit CD3-Antikörper und dem Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen. Dies wurde ebenfalls durch Verwendung eines CD25-blockierenden Antikörpers erreicht (siehe Abschnitt 4.7), was die Notwendigkeit der IL-2-Signalübertragung und die Anwesenheit des hochaffinen IL-2 Rezeptors für die frühe Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen weiter unterstreicht.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass die Anwesenheit von T_h1 Zellen nicht die Wirkung der IL-2 Blockade auf die LSEC-vermittelte Induktion von CD8⁺ T Zellen aufheben kann. Zusammen mit der Tatsache, dass T_h1-Hilfe den frühen Phänotyp von CD8⁺ T Zellen nur steigert und nicht verändert, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Helferzellen den grundsätzlichen Mechanismus der T Zell-Induktion durch LSEC nicht verändern. IL-2 könnte weiterhin auch für die beobachtete Helfer-Funktion von zentraler Bedeutung sein und zu einer Steigerung der Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen führen.

5.5 Die Bedeutung von IL-2 für die durch IL-6 Trans-Signalübertragung induzierte Expression von Granzym B

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Blockade von IL-2 deuten zusammen mit den von Böttcher und Schanz veröffentlichten Ergebnissen darauf hin, dass die IL-2-Signalübertragung wichtig für die LSEC-vermittelte frühe Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen ist. Es ist bekannt, dass die Stimulation mit IL-2 essenziell für die Expression von Granzym B, Perforin und IFN γ von Effektor T Zellen ist und diese auch induzieren kann. Allerdings kann dieser Phänotyp erst nach mehrtägiger Stimulation beobachtet werden (Belz and Masson, 2010; Malek et al., 2001; Pipkin et al., 2010; Qui et al., 2011). IL-2 induziert die Granzym-B- und Perforin-Hochregulation abhängig von STAT5-verstärkter Expression von T-bet und Eomes (Grange et al., 2013; Pipkin et al., 2010). Durch IL-2 wird auch die Expression der für den hochaffinen IL-2R wichtigen IL-2 Rezeptor β -Kette (CD25) gesteigert. Eine starke Expression von CD25 wiederum geht mit einer Hochregulation von Granzym B und Perforin einher (Kalia et al., 2010). Dies passt auch zu der in der vorliegenden Arbeit beobachteten simultanen Steigerung von Granzym B und CD25 durch T_h1-Hilfe. IL-2-Signalübertragung leitet neben der hauptsächlichen Rekrutierung von STAT5A und STAT5B auch begrenzt die Aktivierung über STAT1 und STAT3 ein (Liao et al., 2013). Interessant für die vorliegende Arbeit ist dabei besonders STAT3, da die IL-6 Trans-Signalübertragung bei CD8⁺ T Zellen zu der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt. Allerdings gibt es auch Belege, dass die durch IL-2 geförderte späte Granzym-B- und Perforin-Expression gleichzeitig zu einer Hemmung der IL-6-Signalübertragung führt, was durch Inhibierung der Expression der IL-6R β -Untereinheit und durch Verminderung der Expression von gp130 reguliert wird (Grange et al., 2013). Dies konnte für die mehrtägige Stimulation mit CD3- und CD28-Antikörpern belegt werden. Für die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC, bei der die frühe Granzym-B-Expression STAT3-abhängig durch IL-6 Trans-Signalübertragung eingeleitet wird (Böttcher et al., 2014), kann dies jedoch nicht zutreffen. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag daher zunächst nicht auf einer potenziell durch IL-2 vermittelten Helfer-Funktion der T_h1 Zellen.

Die stark verminderte Granzym-B-Expression, die nach Neutralisation von IL-2 beobachtet werden konnte, deutet jedoch darauf hin, dass die IL-2-Signalübertragung möglicherweise ein wichtiger Bestandteil der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC ist. Da LSEC die Granzym-B-Expression unabhängig von konventionellen kostimulatorischen Signalen durch IL-6 Trans-Signalübertragung induzieren und dies auch durch Stimulation

von CD8⁺ T Zellen mit CD3-Antikörper und dem Fusionsprotein Hyper-IL-6 *in vitro* nachgestellt werden kann (Böttcher et al., 2014), wurde im Folgenden mit Hilfe dieses experimentellen Modells die Bedeutung von IL-2 für die Granzym-B-Induktion durch IL-6 Trans-Signalübertragung analysiert. Durch Zugabe von IL-2-neutralisierendem Antikörper konnte die Hyper-IL-6-vermittelte Granzym-B-Hochregulation signifikant vermindert werden. Auch die Expression von CD25 war deutlich verringert, was wenig überrascht, wenn die durch IL-2 positiv-verstärkende Wirkung auf die Expression von CD25 nicht erfolgt. Der gleiche Phänotyp konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn ein CD25-blockierender Antikörper anstelle der IL-2-Neutralisation verwendet wurde (siehe Abschnitt 4.8). Dies belegt eindeutig, dass die Stimulation mit IL-2 integraler Bestandteil der durch IL-6 Trans-Signalübertragung-induzierten Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen ist. Damit konnte gezeigt werden, dass für den frühen Gewinn von zytotoxischen Eigenschaften der T Zellen im Gegensatz zu den bisher vermuteten zwei Signalen drei Signale essenziell sind. Das erste Signal erfolgt durch die Antigen-spezifische Stimulation des TCR, das zweite Signal besteht aus der IL-6 Trans-Signalübertragung. Als drittes Signal leitet die Stimulation mit IL-2 die beobachtete Expression von Granzym B ein. Die Bereitstellung von zusätzlichem IL-2 könnte daher durchaus ein denkbarer Mechanismus für die Hilfe von T_h1 Zellen bei der Induktion von OT-I Zellen durch LSEC sein. In der Tat wird IL-2 nur in geringen Mengen von CD8⁺ T Zellen sekretiert, vielmehr sind CD4⁺ T Zellen für die starke Produktion des Zytokins verantwortlich (Malek and Castro, 2010). Dies könnte nicht nur zum frühen Zeitpunkt von 18 h wichtig sein, sondern *in vivo* die Induktion der Lymphozyten langfristig beeinflussen. Die IL-2 Produktion von CD8⁺ T Zellen nach Aktivierung wird nach wenigen Tagen eingestellt, weshalb die Lymphozyten zur weiteren Proliferation und Differenzierung auf Signale wie beispielsweise extrinsisches IL-2 von CD4⁺ Helferzellen angewiesen sind (Deeths et al., 1999; Tham et al., 2002).

Interessant war weiterhin die Beobachtung, dass die Stimulation mit Hyper-IL-6 neben der Hochregulation von Granzym B auch die Expression von CD25 steigerte (siehe Abschnitt 4.8). Dies ist auch für Signale durch das inflammatorische Zytokin IL-12 bekannt (Valenzuela et al., 2002; Wiesel et al., 2010). Ähnlich zu der durch IL-12 induzierten CD25-Hochregulation könnte auch die verstärkte Anwesenheit des hochaffinen IL-2R durch IL-6 Trans-Signalübertragung die Differenzierung von CD8⁺ T Zellen durch IL-2-Signale weiter vorantreiben. Übereinstimmend damit ist, dass die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC durchaus zu einer initialen Produktion von IL-2 und einer transienten Expression von CD25 führt (Diehl et al., 2008; Schurich et al.,

2009; von Oppen et al., 2009). Eine Verstärkung der IL-2-Signalübertragung durch IL-2 von T_H1 Zellen könnte somit auch die Differenzierung der LSEC-induzierten $CD8^+$ T Zellen vorantreiben ohne unbedingt den Phänotyp der Zellen zu verändern. Dagegen spricht, dass hohe IL-2-Konzentrationen während der Induktion durch LSEC in einer Aufhebung der Leber-induzierten Toleranz von $CD8^+$ T Zellen resultieren (Schurich et al., 2010). Mit dem heutigen Wissen ist klar, dass so nicht die Toleranz aufgehoben wird, sondern die Differenzierung der Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen in Richtung der Generierung von Effektor T Zellen verschoben wird. Es ist bekannt, dass dies durch die Konzentration von IL-2 während der T Zell-Induktion beeinflusst wird (Belz and Masson, 2010). Die Hilfe von T_H1 Zellen scheint jedoch zumindest zum frühen Zeitpunkt von 18 h den Phänotyp der LSEC-induzierten $CD8^+$ T Zellen nicht zu verändern, sondern nur zu steigern. Es war daher interessant zu sehen, welche Auswirkung die Zugabe von IL-2 während der Stimulation mit CD3-Antikörper und Hyper-IL-6 auf den Phänotyp der $CD8^+$ T Zellen hat. Die in Abschnitt 4.8 dargestellten Daten belegen eindeutig, dass die frühe Expression von Granzym B durch erhöhte Konzentration von IL-2 signifikant gesteigert werden kann. IL-2 alleine konnte, wie bereits durch Böttcher und Schanz demonstriert (Böttcher et al., 2014), die Expression des Zytotoxizitätsmarkers nicht induzieren.

Zusammengefasst belegen die Daten eindeutig, dass die Stimulation mit IL-2 zu dem frühen Zeitpunkt von 18 h nicht die IL-6 Trans-Signalübertragung inhibiert. Vielmehr ist das IL-2-Signal integraler Bestandteil bei der Granzym-B-Induktion von $CD8^+$ T Zellen und kann diese auch weiter steigern. IL-2 scheint daher als Kofaktor zu fungieren, der nicht die Richtung der Differenzierung vorgibt, aber als eine Art „Scharf-Schalter“ wichtig für die Initialisierung des komplexen Differenzierungsprogrammes ist.

T_H1 Zellen sezernieren große Mengen an IL-2 nach Antigen-spezifischer Stimulation, was auch für die Interaktion mit LSEC nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.6). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht belegt, dass explizit von T_H1 Zellen freigesetztes IL-2 die Granzym-B-Expression nach LSEC-Stimulation steigert. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass das IL-2 von T_H1 Zellen einen entscheidenden Anteil an der Helfer-Funktion bei der Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC hat. T_H1 Zellen könnten möglicherweise weiterhin durch Bereitstellung von IL-2 das tolerogene Milieu in der Leber überwinden und die Einleitung lokaler Immunantworten begünstigen. Da jedoch nicht klar ist, welchen Effekt die T_H1 -Hilfe langfristig auf die Differenzierung der LSEC-induzierten $CD8^+$ T Zellen hat, kann an dieser Stelle nur gemutmaßt werden.

5.6 LSEC können die frühe Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen nach Aktivierung Zytokin-vermittelt induzieren

T_h1 Zellen steigern LSEC-spezifisch die frühe Granzym-B-Expression von CD8⁺ T Zellen. Weiterhin kann dies auch alleine durch den Kokultur-Überstand von LSEC und T_h1 Zellen in Kombination mit plattengebundenem CD3-Antikörper eingeleitet werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Zytokine wie IFN γ oder IL-2, die typischerweise von T_h1 Zellen produziert werden, keine frühe Expression des Zytotoxizitätsmarkers einleiten können (siehe Abschnitt 4.8) (Böttcher et al., 2014). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin ein Zellkulturüberstand aus der 18-stündigen Stimulation von T_h1 Zellen mit CD3/CD28-beschichteten Partikeln generiert. Dieser Überstand enthielt alle von T_h1 Zellen sekretierten Zytokine, jedoch keine Botenstoffe, die potenziell von LSEC in der Kokultur produziert werden. Die Stimulation von CD8⁺ T Zellen mit diesem Überstand und CD3-Antikörper konnte keine signifikante Hochregulation von Granzym B induzieren. Ein ähnlicher Phänotyp der Zellen konnte beobachtet werden, wenn unbehandeltes T Zell-Medium oder der Überstand aus der Kokultur von LSEC und T_h1 Zellen ohne Antigen verwendet wurde (siehe Abschnitt 4.9). Die Daten belegen damit eindeutig, dass T_h1 Zellen alleine nicht die beobachtete frühe Granzym-B-Expression einleiten können. Sie können die Hochregulation jedoch LSEC-spezifisch im Zuge der Helfer-Funktion unterstützen. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass T_h1 Zellen den frühen Phänotyp von LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen nur steigern und nicht verändern. Die LSEC-spezifische Unterstützung der Granzym-B-Hochregulation beruht daher nicht darauf, dass T_h1 Zellen den Faktor bereitstellen, der die Expression des Zytotoxizitätsmarkers initiieren kann. Vielmehr scheint es so, dass T_h1 Zellen durch Sekretion von IL-2 die Expression von Granzym B weiter steigern können.

Wie bereits erwähnt, besagt der von Böttcher und Schanz postulierte Mechanismus, dass die von LSEC über IL-6 Trans-Signalübertragung-induzierte Expression von Granzym B nicht über den löslichen IL-6/sIL-6R-Komplex vermittelt wird. Belegt wurde dies unter anderem, da die spezifische Blockade des IL-6/sIL-6R-Komplexes durch das rekombinante Protein sgp130Fc keine Wirkung zeigte (Böttcher et al., 2014). Während der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung der IL-6 Trans-Signalübertragung an der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC und der beobachteten Helfer-Funktion generell nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ursache dafür können, wie bereits diskutiert, auch technische Probleme gewesen sein. Die vorliegenden Daten legen aber

dennoch nahe, dass LSEC auch Zytokin-vermittelt die Expression von Granzym B induzieren können und T_H1 Zellen dies weiter steigern. Um dies zu untersuchen, wurden auch Zellkulturüberstände generiert, für die LSEC 18 h in Gegenwart von Antigen oder LPS stimuliert wurden. Die Inkubation mit Antigen führte zu keiner signifikanten Aktivierung der Leber-APC, während die Aktivierung durch LPS die Zytokin-Freisetzung als Ersatz für die Stimulation durch T_H1 Zellen nachstellen sollte (siehe Abschnitt 4.6). Die Stimulation von $CD8^+$ T Zellen mit CD3-Antikörper und dem Überstand aus der Kultur von LSEC und Antigen führte nur zu einer basalen Granzym-B-Expression, vergleichbar mit der Verwendung von unbehandeltem T Zell-Medium (siehe Abschnitt 4.9). Ohne Aktivierung scheinen LSEC somit keine Zytokine freizusetzen, die an der Induktion der $CD8^+$ T Zellen beteiligt sind. Lag jedoch eine Aktivierung der LSEC vor, wie hier durch 18 h Stimulation mit LPS, so konnte auch der auf diese Weise generierte Zellkultur-Überstand eine Hochregulation von Granzym B auslösen. In dem in Abschnitt 4.9 analysierten Experiment war die durch diesen Überstand induzierte Granzym-B-Expression geringer im Vergleich zu der Stimulation mit dem Überstand aus der Kokultur von LSEC und T_H1 Zellen. Dies traf jedoch auch auf die Aktivierung der LSEC zu (siehe Abschnitt 4.6). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass IL-2, das potenziell von T_H1 Zellen produziert wird, die Expression von Granzym B bei $CD8^+$ T Zellen weiter steigern kann (siehe Abschnitt 4.8). Dieses Zytokin war in dem Überstand aus der Stimulation von LSEC mit LPS nicht enthalten, was ebenfalls die Ursache für die unterschiedlich starke Granzym-B-Hochregulation im Vergleich der Überstände darstellen könnte.

Die analysierten Daten lassen darauf schließen, dass LSEC die Expression von Granzym B bei $CD8^+$ T Zellen Zytokin-vermittelt induzieren können. Voraussetzung dafür ist jedoch die Aktivierung der Leber-APC, was für die Interaktion mit T_H1 Zellen nachgewiesen werden konnte. Durch welchen löslichen Botenstoff LSEC die Granzym-B-Expression von $CD8^+$ T Zellen induzieren, kann nur gemutmaßt werden. Eine Beteiligung des löslichen Komplexes aus IL-6 und dem sIL-6R ist aber nicht ausgeschlossen. Ob die Aktivierung der LSEC durch T_H1 Zellen Grundlage der beobachteten Helfer-Funktion ist, ist jedoch unklar, da möglicherweise bereits $CD8^+$ T Zellen die Endothelzellen in der Kokultur aktivieren und so einen ähnlichen Zytokin-vermittelten Effekt hervorrufen können. Neben der möglichen Aktivierung von LSEC können T_H1 Zellen jedoch sehr wahrscheinlich auch durch die Freisetzung von IL-2 die Expression von Granzym B bei den $CD8^+$ T Zellen steigern. Ein Hinweis darauf ist auch die damit einhergehende Hochregulation von CD25 durch T_H1 -Hilfe. Während der vorliegenden Arbeit konnte somit eine neue Helfer-

Funktion von CD4⁺ T Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC beschrieben werden. Weiterhin wurden potenzielle Mechanismen zur Einleitung dieser Helferfunktion, die möglicherweise auch in Kombination für den hier beobachteten Phänotyp verantwortlich sind, aufgedeckt. Eine direkte Beteiligung dieser Mechanismen wurde jedoch nicht belegt und kann daher nur vermutet werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation widersprechen nicht der durch Böttcher und Schanz veröffentlichten Studie. Einerseits ist unklar, ob auch in der Kokultur von LSEC und OT-I Zellen alleine eine Zytokin-vermittelte Granzym-B-Induktion stattfindet. Möglich ist, dass dies nur erfolgt, wenn LSEC wie bei der Interaktion mit T_h1 Zellen aktiviert werden. Da LSEC *in vivo* ständig Endotoxinen wie LPS aus dem Gastrointestinaltrakt ausgesetzt sind, ist auch eine Beteiligung des Zytokin-vermittelten Mechanismus zusammen mit der durch Böttcher und Schanz beschriebenen IL-6 Trans-Signalübertragung *in vivo* denkbar. Ein Beitrag durch potenziell von LSEC produziertes IL-6, das zusammen mit im Blut zirkulierendem sIL-6R den IL-6/sIL-6R-Komplex bildet, würde allerdings durch den ebenfalls im Blut vorkommenden Inhibitor sgp130 erschwert werden (Narazaki et al., 1993; Rose-John, 2012). Dies ist auch wichtig, da der lösliche IL-6/sIL-6R-Komplex neben den CD8⁺ Lymphozyten auch auf andere Zellen wirken und beispielsweise die Proliferation von Hepatozyten induzieren kann (Peters et al., 1998). Unter inflammatorischen Bedingungen wäre es dagegen von Vorteil, wenn der potenzielle Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R neben der Verstärkung der Induktion Antigen-spezifischer CD8⁺ T Zellen auch gleichzeitig regenerative Mechanismen wie die Proliferation von Hepatozyten einleiten könnte. Durch den von Böttcher und Schanz gezeigten Mechanismus der IL-6 Trans-Signalübertragung mit Hilfe des membranständigen IL-6R auf LSEC kann aber auch eine spezifische Induktion zu Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen unter homöostatischen Bedingungen erfolgen und sichergestellt werden. Dies schließt, wie bereits erwähnt, eine Beteiligung des löslichen IL-6/sIL-6R-Komplexes nicht aus. Auch eine Art „Bystander-Aktivierung“ durch andere IL-6 produzierende Zellen in der Leber wie Kupfferzellen oder plasmazytoide DC (Protzer et al., 2012; Thomson and Knolle, 2010; Wu et al., 2007) ist durchaus denkbar.

Die Möglichkeit, dass die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC gleichzeitig über IL-6 Trans-Signalübertragung mit dem membranständigen IL-6R in Trans und durch den löslichen IL-6/sIL-6R-Komplex erfolgen kann, erschwert die Untersuchung der Mechanismen. Da schon eine Anzahl von 50 bis 100 IL-6/sIL-6R-Komplexen ausreichend für die Einleitung der Trans-Signalübertragung ist (Jones et al., 2011), ist sowohl ein

Nachweis des löslichen als auch des membrangebundenen Komplexes technisch sehr schwierig. Selbst wenn während der Induktion von OT-I Zellen durch LSEC ohne T_H1-Hilfe der lösliche IL-6/sIL-6R-Komplex vorliegt und zu der Aktivierung der T Zellen beiträgt, ist der Nachweis durch Blockade mittels sgp130Fc nicht möglich, da die IL-6 Trans-Signalübertragung gleichzeitig mit Hilfe des membrangebundenen IL-6R in Trans erfolgt. Die Daten der vorliegenden Arbeit widersprechen daher nicht der von Böttcher und Schanz veröffentlichten Studie, sondern ergänzen eher das Wissen zu dem Mechanismus der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC.

5.7 Die potenzielle Bedeutung der Hilfe von T_H1 Zellen bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen in der Leber

Die Hilfe von CD4⁺ T Zellen greift zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Einleitung von Immunantworten durch CD8⁺ T Zellen und wird über eine Vielzahl von Mechanismen übermittelt. Dies ermöglicht die optimale Anpassung von Immunantworten an die Art der Infektion.

In der Leber werden unter homöostatischen Bedingungen Leber-induzierte CD8⁺ Gedächtnis T Zellen generiert, die auch spezifisch für zirkulierende Antigene sind, die ohne damit einhergehende Aktivierung des angeborenen Immunsystems systemisch verteilt werden. Diese Gedächtniszellen können in lymphatische Gewebe einwandern und zu einem späteren Zeitpunkt an der Eliminierung von viralen Infektionen und Tumoren beteiligt sein (Böttcher et al., 2013). Eine Helfer-Funktion von CD4⁺ T Zellen unter homöostatischen Bedingungen ist in der Leber bisher nicht bekannt. Unter inflammatorischen Bedingungen wie viralen Infektionen wiederum konnte bereits gezeigt werden, dass die Hilfe von Virus-spezifischen CD4⁺ T Zellen essenziell für die langfristige Bekämpfung der Infektion ist (Provine et al., 2014). Die Abwesenheit dieser Hilfe resultiert unter anderem in einer verringerten Anzahl Pathogen-spezifischer CD8⁺ T Zellen, was die Bekämpfung der Infektion erschwert (Yang et al., 2007). Die Anwesenheit der Helferzellen ist weiterhin nicht nur während der akuten Phase zur Bekämpfung der Infektion wichtig. Ein Verlust der Pathogen-spezifischen T Zellen zu einem späteren Zeitpunkt kann die Wiederkehr der Infektion zur Folge haben (Gerlach et al., 1999). Wichtig ist, dass die Helferzellen nicht in der Leber generiert werden, da beispielsweise die Induktion von CD4⁺ T Zellen durch Hepatozyten zu der Differenzierung

von T_H2 Zellen und einer beeinträchtigten Bekämpfung viraler Infektionen führt (Wiegard et al., 2007). Außerdem ist bekannt, dass die Fähigkeit der inflammatorischen Helferzellen zur Produktion von $IFN\gamma$ und IL-2 entscheidend für die Beseitigung viraler Infektionen in der Leber ist (Semmo et al., 2005; Tsai et al., 1997). Die Freisetzung von $IFN\gamma$ fördert die MHC-I-Expression der APCs in der Leber und steigert damit die Fähigkeit zur Antigenpräsentation (Yang et al., 1995). Von T Helferzellen freigesetztes, extrinsisches IL-2 kann eine optimale Differenzierung der $CD8^+$ T Zellen unterstützen (Cox et al., 2011) und weiterhin das Überleben der Lymphozyten steigern (Wiesel et al., 2010). Es ist denkbar, dass $CD4^+$ T Zellen auf diese Weise auch unter nicht-inflammatorischen Bedingungen langfristig die Induktion von $CD8^+$ Lymphozyten in der Leber unterstützen können.

Auch unter homöostatischen Bedingungen ist die IL-2-Signalübertragung wichtig für das Überleben und die Differenzierung von LSEC-induzierten $CD8^+$ T Zellen. Die Stimulation durch die Endothelzellen führt zu einer initialen Produktion von IL-2 bei den $CD8^+$ T Zellen und zu einer transienten Expression von CD25 (Diehl et al., 2008; Schurich et al., 2009; von Oppen et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen weiterhin, dass das IL-2-Signal elementarer Bestandteil der IL-6 Trans-Signalübertragung und damit der Stimulation durch LSEC unter homöostatischen Bedingungen ist. Die IL-2-Expression der $CD8^+$ T Zellen fördert, auch wenn sie nur begrenzt ist, das Überleben der Zellen langfristig vermutlich genauso, wie es auch schon für Gedächtnis T Zellen beschrieben ist (Castro et al., 2011; Malek and Castro, 2010). Es ist allerdings unklar, welchen langfristigen Effekt die Helfer-Funktion von T_H1 Zellen durch Bereitstellung von zusätzlichem IL-2 während der Induktion von $CD8^+$ T Zellen in der Leber hat. Es ist bekannt, dass hohe IL-2-Konzentrationen während der Induktion durch LSEC die Generierung von Effektor T Zellen begünstigen. Dies konnte auch während viraler Infektionen der Leber und damit einhergehender verstärkter Antigenpräsentation beobachtet werden (Kern et al., 2010; Schurich et al., 2010). Während der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp der LSEC-induzierten $CD8^+$ T Zellen durch T_H1 -Hilfe zum frühen Zeitpunkt nicht verändert, sondern nur gesteigert. Späte Zeitpunkte und somit die potenzielle Generierung von Effektor- oder Gedächtniszellen in Anwesenheit von T_H1 Zellen wurden nicht untersucht und stellen eine interessante Fragestellung für zukünftige Experimente dar. Allerdings muss die kurzfristige Generierung von Effektorzellen aufgrund hoher IL-2-Konzentration während der Induktion durch LSEC nicht zwangsweise bedeuten, dass diese Zellen *in vivo* langfristig nicht doch noch zu Gedächtniszellen differenzieren können. $CD8^+$ T Zellen, die durch LSEC in Kombination

mit hoher IL-2-Konzentration induziert werden, entwickeln zwar Effektorfunktionen wie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, sie behalten aber auch die für LSEC-induzierte CD8⁺ T Zellen typische Expression von CD62L und CD44 bei (Schurich et al., 2010). Böttcher konnte zeigen, dass LSEC-induzierte CD44⁺CD62L⁺CD8⁺ T Zellen dank der Expression des L-Selektins wie TCM fähig sind, in lymphatische Gewebe einzuwandern (Böttcher et al., 2013). Da auch LSEC-induzierte Effektorzellen diesen Phänotyp besitzen, ist eine Einwanderung in lymphatische Gewebe und eine spätere Differenzierung zu Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen zumindest nicht ganz ausgeschlossen. Gleiches gilt auch für CD8⁺ T Zellen, die durch LSEC mit Hilfe von T_H1 Zellen induziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass durch T_H1-Hilfe neben Granzym B auch CD25 auf LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen hochreguliert wird. Ausgelöst wurde dies vermutlich durch die IL-2-Produktion von T_H1 Zellen. CD25 wird nicht konstitutiv von CD8⁺ T Zellen exprimiert, sondern vorübergehend durch inflammatorische Stimuli wie IL-12 oder auch direkt durch IL-2-Signalübertragung hochreguliert (Kalia et al., 2010; Obar et al., 2010; Pipkin et al., 2010; Valenzuela et al., 2002). Durch IL-6 Trans-Signalübertragung wird CD25 von CD8⁺ T Zellen ebenfalls verstärkt exprimiert (siehe Abschnitt 4.8). Die Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette legt die Fähigkeit der Zellen fest, IL-2-Signale wahrzunehmen, was wiederum die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen maßgeblich beeinflusst (Cox et al., 2011). CD8⁺ T Zellen sind abhängig von dem inflammatorischen Stimulus auf Hilfe von CD4⁺ T Zellen zur Hochregulation von CD25 angewiesen (Obar et al., 2010). Somit verstärken CD4⁺ Helfer T Zellen einerseits die Expression von CD25 und fördern durch die Produktion von IL-2 die Proliferation und Differenzierung der CD25⁺CD8⁺ T Zellen (Cox et al., 2011). Die Stärke und Dauer der CD25-Expression und damit auch der IL-2-Signalübertragung bestimmt anschließend die Differenzierung zu Effektor- oder Gedächtniszellen (Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010).

Wie bereits erwähnt ist die IL-2-Signalübertragung und dadurch vermutlich auch die Hilfe von CD4⁺ T Zellen wichtig für die Generierung eines funktionalen T Zell-Gedächtnisses (Cox et al., 2011; Williams et al., 2006). Lang anhaltende und starke Signale durch IL-2 verschieben aber das Gleichgewicht in Richtung der Differenzierung zu Effektorzellen (Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010). Daher ist durchaus denkbar, dass mit T_H1-Hilfe die Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC auch zu der Differenzierung von Effektor- und nicht Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen führt.

Die Granzym-B-Expression von LSEC-induzierten CD8⁺ T Zellen kann durch inflammatorische Stimuli wie Typ I IFN, IL-12 oder IFN γ verlängert und verstärkt werden (Böttcher et al., 2014). Eine verlängerte Granzym-B-Expression der CD8⁺ T Zellen durch T_h1-Hilfe wurde nicht untersucht, ist aber denkbar. LSEC-induzierte CD8⁺ Lymphozyten müssen ihre Effektorfunktionen nicht unbedingt in der Leber ausführen, da sie die Fähigkeit besitzen in lymphatische Organe einzuwandern (Böttcher et al., 2013). Die beobachtete Helfer-Funktion der CD4⁺ T Zellen könnte daher auch unter homöostatischen Bedingungen *in vivo* zu der verbesserten Bekämpfung systemisch zirkulierender Pathogene beitragen und die Eliminierung von viralen Infektionen und Tumoren unterstützen. Eine Beteiligung an der Bekämpfung derartiger Infektionen durch die Leber-induzierten Gedächtnis T Zellen wurde bereits vermutet (Böttcher et al., 2013).

Die Hilfe von CD4⁺ T Zellen kann weiterhin wichtig sein, um der Erschöpfung von CD8⁺ T Zellen während chronischer viraler Infektionen vorzubeugen. Therapeutisch könnte dies auch eingesetzt werden, um die körpereigene Immunabwehr bei hepatischen Infektionen langfristig zu unterstützen. Allerdings unterliegen CD4⁺ Helfer T Zellen wie CD8⁺ T Zellen auch den Mechanismen der T Zell-Erschöpfung in der Leber (Protzer et al., 2012; Raziorrouh et al., 2011), weshalb nur ein kurzes Zeitfenster zur therapeutischen Vorbeugung dieses Phänotyps bliebe. Ein Zusammenhang zwischen dem langfristigen Erhalt funktionaler Virus-spezifischer CD4⁺ T Zellen und der Vorbeugung chronischer hepatischer Infektionen konnte in der Tat bereits hergestellt werden (Schulze zur Wiesch et al., 2012). Der langfristige Effekt der T_h1-Hilfe und der steigernden Wirkung durch IL-2 ist noch nicht geklärt. Solange die Generierung von Gedächtniszellen aber weiter gewährleistet ist, könnte vor allem die steigernde Wirkung von IL-2 auch interessant für die Verbesserung von Impfstoffen sein.

Es ist zu beachten, dass die Daten der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von *in vitro*-Modellen erhoben wurden. *In vitro*-Systeme können nicht die Komplexität nachstellen, die *in vivo* zu der Generierung von Immunantworten beiträgt. Ergebnisse aus *in vitro*-Experimenten können aber als Wegweiser, die helfen die *in vivo* vorliegende Komplexität zu verstehen, verstanden werden (Belz and Masson, 2010). Die Validierung der *in vivo*-Relevanz der beobachteten T_h1-Helfer-Funktion bei der Induktion von CD8⁺ T Zellen durch LSEC ist daher wichtig, um die Einleitung von Immunantworten in der Leber besser zu verstehen und potenziell unterstützen zu können.

5.8 Schlussfolgerung

Während der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Helfer-Funktion von T_h1 Zellen bei der Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC belegt werden. Die Analyse des potenziellen Mechanismus dieser Helfer-Funktion lieferte weiterhin neue Erkenntnisse zu der Stimulation von $CD8^+$ T Zellen durch LSEC mittels IL-6 Trans-Signalübertragung.

Böttcher und Schanz konnten bereits demonstrieren, dass LSEC über zwei Signale die frühe Granzym-B-Expression der $CD8^+$ T Zellen einleiten. Signal eins stellt die Antigen-spezifische Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC-I-Molekül dar. Signal zwei erfolgt durch Interaktion des Proteins gp130 auf der T Zelle mit dem Komplex aus IL-6R und IL-6 auf der Endothelzelle in Trans (Böttcher et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass ein Signal drei in Form der IL-2-Signalübertragung für die Induktion der Granzym-B-Expression notwendig ist (Abb. 5.8.1). $CD8^+$ T Zellen sind selbst in der Lage, nach Stimulation durch LSEC begrenzt IL-2 zu produzieren, weshalb die Induktion der frühen Granzym-B-Expression nicht notwendigerweise auf die Hilfe von $CD4^+$ T Zellen angewiesen ist.

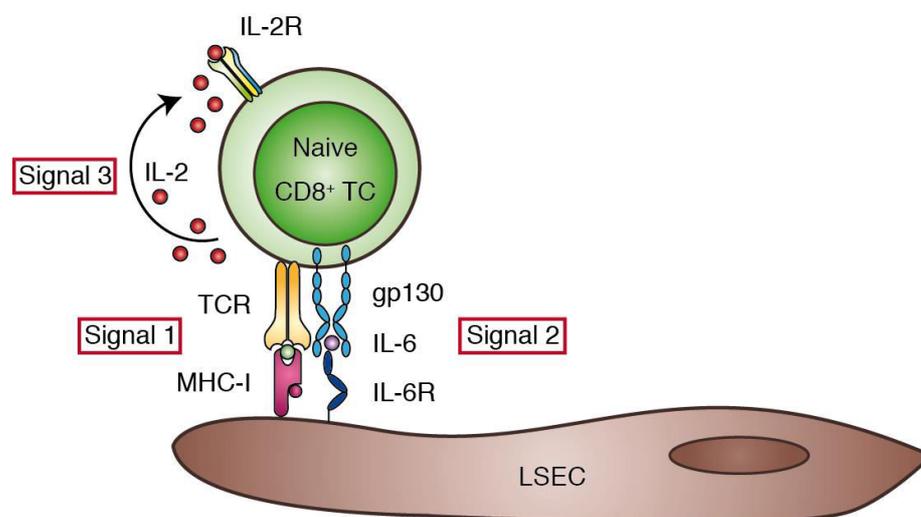


Abbildung 5.8.1: Zusammenfassung der LSEC-vermittelten Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch IL-6 Trans-Signalübertragung. Modifiziert nach (Lambotin et al., 2010; Rose-John, 2012).

Die durch LSEC-Induktion vermittelte frühe Expression von Granzym B und CD25 ist in Anwesenheit von T_h1 Zellen jedoch noch weiter gesteigert. Grundlage für diese Helfer-Funktion ist die Antigen-spezifische Interaktion der T Zellen mit den Leber APCs. LSEC und T_h1 Zellen aktivieren sich gegenseitig, was zu der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine durch beide Zellpopulationen führt. Die gemeinsame Sekretion dieser Zytokine

durch LSEC und T_h1 Zellen ist ausreichend, um die Granzym-B-Expression von $CD8^+$ T Zellen in Kombination mit der Stimulation des TCR einzuleiten. LSEC produzieren nach Aktivierung den Faktor, der die Granzym-B-Expression initiiert. Der Faktor selber konnte während der Dissertation nicht identifiziert werden. Es ist jedoch möglich, dass es sich dabei um den löslichen IL-6/sIL-6R-Komplex handelt. T_h1 Zellen setzen nach Aktivierung das Zytokin IL-2 frei, das die durch IL-6 Trans-Signalübertragung-induzierte Granzym-B-Expression weiter steigern kann. Eine direkte Beteiligung des T_h1 -produzierten IL-2 konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch naheliegend, da zusammen mit der verstärkten Granzym-B-Expression auch der hochaffine IL-2R hochreguliert wurde (Abb. 5.8.2).

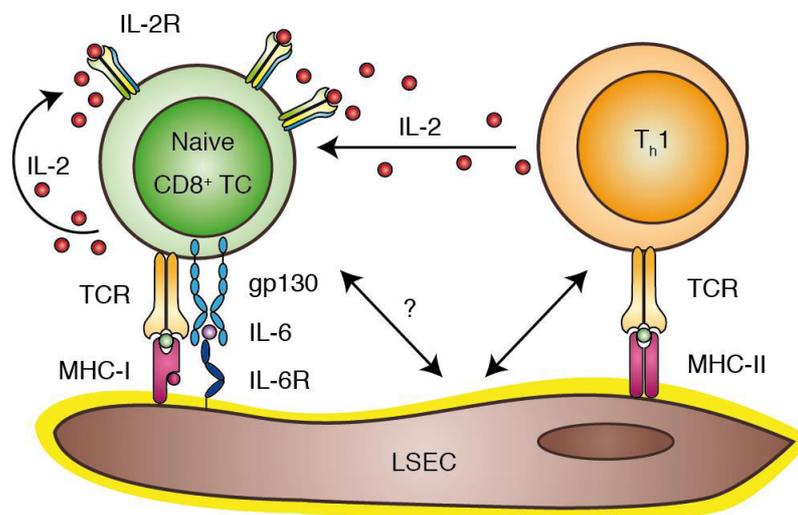


Abbildung 5.8.2: Zusammenfassung der Helfer-Funktion von T_h1 Zellen bei der LSEC-vermittelten Induktion von $CD8^+$ T Zellen durch IL-6 Trans-Signalübertragung. Modifiziert nach (Lambotin et al., 2010; Rose-John, 2012).

Zusammenfassend können T_h1 Zellen LSEC nach Antigen-spezifischer Interaktion aktivieren. Diese Aktivierung der Endothelzellen ermöglicht oder verstärkt die Sekretion eines Faktors, der die Expression von Granzym B bei $CD8^+$ T Zellen induzieren kann. Weiterhin produzieren T_h1 Zellen nach Stimulation durch LSEC IL-2, was bei $CD8^+$ T Zellen die Expression von CD25 positiv verstärken und die Expression von Granzym B steigern kann.

6 Literaturverzeichnis

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Accapezzato, D., Francavilla, V., Paroli, M., Casciaro, M., Chircu, L.V., Cividini, A., Abrignani, S., Mondelli, M.U., and Barnaba, V. (2004). Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Investigation* 113, 963-972.

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

Ahmed, K.A., Wang, L., Munegowda, M.A., Mulligan, S.J., Gordon, J.R., Griebel, P., and Xiang, J. (2012). Direct in vivo evidence of CD4+ T cell requirement for CTL response and memory via pMHC-I targeting and CD40L signaling. *Journal of Leukocyte Biology* 92, 289-300.

Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (1998). Control of Neonatal Tolerance to Tissue Antigens by Peripheral T Cell Trafficking. *Science* 282, 1338-1341.

Allard, E.-L., Hardy, M.-P., Leignadier, J., Marquis, M., Rooney, J., Lehoux, D., and Labrecque, N. (2007). Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation. *European Journal of Immunology* 37, 3069-3077.

Allison, J.P. (1994). CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Current Opinion in Immunology* 6, 414-419.

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Chen, Z., Berzins, S.P., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). The Cellular Mechanism of Aire Control of T Cell Tolerance. *Immunity* 23, 227-239.

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., *et al.* (2002). Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298, 1395-1401.

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

Asabe, S., Wieland, S.F., Chattopadhyay, P.K., Roederer, M., Engle, R.E., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2009). The Size of the Viral Inoculum Contributes to the Outcome of Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology* 83, 9652-9662.

Baaten, B.J.G., Li, C.-R., and Bradley, L.M. (2010). Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Communicative & Integrative Biology* 3, 508-512.

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

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 18, 767-811.

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

Barbier, L., Tay, S.S., McGuffog, C., Triccas, J.A., McCaughan, G.W., Bowen, D.G., and Bertolino, P. (2012). Two lymph nodes draining the mouse liver are the preferential site of DC migration and T cell activation. *Journal of Hepatology* 57, 352-358.

Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based [agr]- and [bgr]-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76, 34-40.

Belz, G.T., and Kallies, A. (2010). Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination. *Current Opinion in Immunology* 22, 279-285.

Belz, G.T., and Masson, F. (2010). Interleukin-2 Tickles T Cell Memory. *Immunity* 32, 7-9.

Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.

Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1997). Induction of a CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Response by Cross-priming Requires Cognate CD4+ T Cell Help. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 65-70.

Berg, M., Wingender, G., Djandji, D., Hegenbarth, S., Momburg, F., Hämmerling, G., Limmer, A., and Knolle, P. (2006). Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance. *European Journal of Immunology* 36, 2960-2970.

Bertolino, P., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Fazekas de St. Groth, B. (2001). Antigen-Specific Primary Activation of CD8+ T Cells Within the Liver. *The Journal of Immunology* 166, 5430-5438.

Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.-C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *European Journal of Immunology* 28, 221-236.

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.

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

Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8+ T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4, 595-602.

Billerbeck, E., Blum, H.E., and Thimme, R. (2007). Parallel Expansion of Human Virus-Specific FoxP3- Effector Memory and De Novo-Generated FoxP3+ Regulatory CD8+ T Cells upon Antigen Recognition In Vitro. *The Journal of Immunology* 179, 1039-1048.

- Bluestone, J.A., Mackay, C.R., O'Shea, J.J., and Stockinger, B. (2009). The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9, 811-816.
- Bonder, C.S., Norman, M.U., Swain, M.G., Zbytnuik, L.D., Yamanouchi, J., Santamaria, P., Ajuebor, M., Salmi, M., Jalkanen, S., and Kubes, P. (2005). Rules of Recruitment for Th1 and Th2 Lymphocytes in Inflamed Liver: A Role for Alpha-4 Integrin and Vascular Adhesion Protein-1. *Immunity* 23, 153-163.
- Bos, R., and Sherman, L.A. (2010). CD4+ T-Cell Help in the Tumor Milieu Is Required for Recruitment and Cytolytic Function of CD8+ T Lymphocytes. *Cancer Research* 70, 8368-8377.
- Bose, T.O., Pham, Q.-M., Jellison, E.R., Mouries, J., Ballantyne, C.M., and Lefrançois, L. (2013). CD11a Regulates Effector CD8 T Cell Differentiation and Central Memory Development in Response to Infection with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 81, 1140-1151.
- Böttcher, J., and Knolle, P.A. (2015). Global transcriptional characterization of CD8+ T cell memory. *Seminars in Immunology* 27, 4-9.
- Böttcher, J.P., Knolle, P.A., and Stabenow, D. (2011). Mechanisms Balancing Tolerance and Immunity in the Liver. *Digestive Diseases* 29, 384-390.
- Böttcher, Jan P., Schanz, O., Garbers, C., Zaremba, A., Hegenbarth, S., Kurts, C., Beyer, M., Schultze, Joachim L., Kastenmüller, W., Rose-John, S., *et al.* (2014). IL-6 trans-Signaling-Dependent Rapid Development of Cytotoxic CD8+ T Cell Function. *Cell Reports* 8, 1318-1327.
- Böttcher, Jan P., Schanz, O., Wohlleber, D., Abdullah, Z., Debey-Pascher, S., Staratschek-Jox, A., Höchst, B., Hegenbarth, S., Grell, J., Limmer, A., *et al.* (2013). Liver-Primed Memory T Cells Generated under Noninflammatory Conditions Provide Anti-infectious Immunity. *Cell Reports* 3, 779-795.
- Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 201, 579-590.
- Boyman, O., Purton, J.F., Surh, C.D., and Sprent, J. (2007). Cytokines and T-cell homeostasis. *Current Opinion in Immunology* 19, 320-326.
- Braet, F., and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative Hepatology* 1, 1-1.
- Brown, D.M. (2010). Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cellular Immunology* 262, 89-95.
- Brown, D.M., Kamperschroer, C., Dilzer, A.M., Roberts, D.M., and Swain, S.L. (2009). IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cellular Immunology* 257, 69-79.
- Brown, S.A., Palmer, K.L., and Whiteley, M. (2008). Revisiting the host as a growth medium. *Nat Rev Micro* 6, 657-666.
- Buller, R.M.L., Holmes, K.L., Hugin, A., Frederickson, T.N., and Morse, H.C. (1987). Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* 328, 77-79.

Burgdorf, S., and Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 20, 89-95.

Carambia, A., Frenzel, C., Bruns, O.T., Schwinge, D., Reimer, R., Hohenberg, H., Huber, S., Tiegs, G., Schramm, C., Lohse, A.W., *et al.* (2013). Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of Hepatology* 58, 112-118.

Carambia, A., Freund, B., Schwinge, D., Heine, M., Laschtowitz, A., Huber, S., Wraith, D.C., Korn, T., Schramm, C., Lohse, A.W., *et al.* (2014). TGF- β -dependent induction of CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of Hepatology* 61, 594-599.

Carambia, A., and Herkel, J. (2010). CD4 T cells in hepatic immune tolerance. *Journal of Autoimmunity* 34, 23-28.

Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890-895.

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

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of Experimental Medicine* 180, 1263-1272.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of Experimental Medicine* 184, 747-752.

Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S3-S23.

Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H.A., Hu-Li, J., Zhu, J., and Paul, W.E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3880-3885.

Cox, M.A., Harrington, L.E., and Zajac, A.J. (2011). Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends in Immunology* 32, 180-186.

Crispe, I.N. (2009). The Liver as a Lymphoid Organ. *Annual Review of Immunology* 27, 147-163.

Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annual Review of Immunology* 29, 621-663.

Cui, W., Joshi, N.S., Jiang, A., and Kaech, S.M. (2009). Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* 27, 2177-2187.

Cui, W., and Kaech, S.M. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological Reviews* 236, 151-166.

- Cui, W., Liu, Y., Weinstein, Jason S., Craft, J., and Kaech, Susan M. (2011). An Interleukin-21-Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity* 35, 792-805.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells: Dissociating Proliferation and Development of Effector Function. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 1141-1151.
- Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology* 22, 333-340.
- Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K., and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4⁺ and CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* 162, 3256-3262.
- Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., and Mescher, M.F. (2005). Cutting Edge: Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation. *The Journal of Immunology* 174, 4465-4469.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells. *Nat Immunol* 9, 1347-1355.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- Deeths, M.J., Kedl, R.M., and Mescher, M.F. (1999). CD8⁺ T Cells Become Nonresponsive (Anergic) Following Activation in the Presence of Costimulation. *The Journal of Immunology* 163, 102-110.
- Derkow, K., Müller, A., Eickmeier, I., Seidel, D., Rust Moreira, M.V., Kruse, N., Klugewitz, K., Mintern, J., Wiedenmann, B., and Schott, E. (2011). Failure of CD4 T-Cells to Respond to Liver-Derived Antigen and to Provide Help to CD8 T-Cells. *PLoS ONE* 6, e21847.
- 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. *The Journal of Experimental Medicine* 193, 233-238.
- 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.
- Diepolder, H.M., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Jung, M.C., Pape, G.R., Wierenga, E.A., Santantonio, T., and Eichenlaub, D. (1995). Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *The Lancet* 346, 1006-1007.
- Doherty, D.G., Norris, S., Madrigal-Estebas, L., McEntee, G., Traynor, O., Hegarty, J.E., and O'Farrelly, C. (1999). The Human Liver Contains Multiple Populations of NK Cells, T Cells, and CD3⁺CD56⁺ Natural T Cells with Distinct Cytotoxic Activities and Th1, Th2, and Th0 Cytokine Secretion Patterns. *The Journal of Immunology* 163, 2314-2321.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* *10*, 857-863.

Ekkens, M.J., Shedlock, D.J., Jung, E., Troy, A., Pearce, E.L., Shen, H., and Pearce, E.J. (2007). Th1 and Th2 Cells Help CD8 T-Cell Responses. *Infection and Immunity* *75*, 2291-2296.

Elvevold, K., Simon-Santamaria, J., Hasvold, H., McCourt, P., Smedsrød, B., and Sørensen, K.K. (2008). Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity. *Hepatology* *48*, 2007-2015.

Erb, P., Grogg, D., Troxler, M., Kennedy, M., and Fluri, M. (1990). CD4+ T cell-mediated killing of MHC class II-positive antigen-presenting cells. I. Characterization of target cell recognition by in vivo or in vitro activated CD4+ killer T cells. *The Journal of Immunology* *144*, 790-795.

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., *et al.* (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation* *119*, 3573-3585.

Fallarino, F., Grohmann, U., Bianchi, R., Vacca, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2000). Th1 and Th2 Cell Clones to a Poorly Immunogenic Tumor Antigen Initiate CD8+ T Cell-Dependent Tumor Eradication In Vivo. *The Journal of Immunology* *165*, 5495-5501.

Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular Helper T Cells: Lineage and Location. *Immunity* *30*, 324-335.

Filippi, C.M., Juedes, A.E., Oldham, J.E., Ling, E., Togher, L., Peng, Y., Flavell, R.A., and von Herrath, M.G. (2008). Transforming Growth Factor- β Suppresses the Activation of CD8+ T-Cells When Naïve but Promotes Their Survival and Function Once Antigen Experienced : A Two-Faced Impact on Autoimmunity. *Diabetes* *57*, 2684-2692.

Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P.G., Kallen, K.-J., Wollmer, A., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (1997). A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotech* *15*, 142-145.

Foulds, K.E., Rotte, M.J., and Seder, R.A. (2006). IL-10 Is Required for Optimal CD8 T Cell Memory following *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology* *177*, 2565-2574.

Friedman, S.L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver, Vol 88.

Gagliani, N., Vesely, M.C.A., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limon, P., Paiva, R.S., Ching, T., *et al.* (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* *523*, 221-225.

Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central Tolerance to Tissue-specific Antigens Mediated by Direct and Indirect Antigen Presentation. *The Journal of Experimental Medicine* *200*, 1039-1049.

Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2006). Central tolerance: good but imperfect. *Immunological Reviews* *209*, 290-296.

- Garcia, K.C., and Adams, E.J. (2005). How the T Cell Receptor Sees Antigen—A Structural View. *Cell* *122*, 333-336.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., *et al.* (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* *17*, 1290-1297.
- Gerlach, C., van Heijst, J.W.J., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J., Schepers, K., and Schumacher, T.N.M. (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* *207*, 1235-1246.
- Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C.A., Santantonio, T., and Pape, G.R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* *117*, 933-941.
- Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.-H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. (2003). HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. *Science* *302*, 659-662.
- Grange, M., Verdeil, G., Arnoux, F., Griffon, A., Spicuglia, S., Maurizio, J., Buferne, M., Schmitt-Verhulst, A.-M., and Auphan-Anezin, N. (2013). Active STAT5 Regulates T-bet and Eomesodermin Expression in CD8 T Cells and Imprints a T-bet-Dependent Tc1 Program with Repressed IL-6/TGF- β 1 Signaling. *The Journal of Immunology* *191*, 3712-3724.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). THE B7 FAMILY REVISITED. *Annual Review of Immunology* *23*, 515-548.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., and Amigorena, S. (2002). ANTIGEN PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS. *Annual Review of Immunology* *20*, 621-667.
- Hall, C.H.T., Kassel, R., Tacke, R.S., and Hahn, Y.S. (2010). HCV Hepatocytes Induce Human Regulatory CD4+ T Cells through the Production of TGF- β . *PLoS ONE* *5*, e12154.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* *6*, 1123-1132.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). CROSS-PRESENTATION, DENDRITIC CELLS, TOLERANCE AND IMMUNITY. *Annual Review of Immunology* *19*, 47-64.
- Hegazy, A.N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Fröhlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Radbruch, A., and Löhning, M. (2010). Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3+T-bet+ Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions. *Immunity* *32*, 116-128.
- Hennecke, J., and Wiley, D.C. (2001). T Cell Receptor–MHC Interactions up Close. *Cell* *104*, 1-4.
- Herkel, J., Jagemann, B., Wiegand, C., Lazaro, J.F.G., Lueth, S., Kanzler, S., Blessing, M., Schmitt, E., and Lohse, A.W. (2003). MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology* *37*, 1079-1085.

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-987.

Hickman, H.D., Takeda, K., Skon, C.N., Murray, F.R., Hensley, S.E., Loomis, J., Barber, G.N., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2008). Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nat Immunol* 9, 155-165.

Hivroz, C., Chemin, K., Turret, M., and Bohineust, A. (2012). Crosstalk between T Lymphocytes and Dendritic Cells. *32*, 139-155.

Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5, 971-974.

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.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.

Hu, J., Srivastava, K., Wieland, M., Runge, A., Mogler, C., Besemfelder, E., Terhardt, D., Vogel, M.J., Cao, L., Korn, C., *et al.* (2014). Endothelial Cell-Derived Angiopoietin-2 Controls Liver Regeneration as a Spatiotemporal Rheostat. *Science* 343, 416-419.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16, 343-353.

Janeway, C.A. (1989). Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54, 1-13.

Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annual Review of Immunology* 20, 197-216.

Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12, 557-569.

John, B., and Crispe, I.N. (2004). Passive and Active Mechanisms Trap Activated CD8+ T Cells in the Liver. *The Journal of Immunology* 172, 5222-5229.

Jones, S.A., Scheller, J., and Rose-John, S. (2011). Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 121, 3375-3383.

Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* 27, 281-295.

Joshi, N.S., and Kaech, S.M. (2008). Effector CD8 T Cell Development: A Balancing Act between Memory Cell Potential and Terminal Differentiation. *The Journal of Immunology* 180, 1309-1315.

- Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., and Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *European Journal of Biochemistry* 268, 160-167.
- Jungermann, K. (1995). Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* 103, 81-91.
- Junt, T., Scandella, E., and Ludewig, B. (2008). Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* 8, 764-775.
- Kaczmarek, J., Homsy, Y., van Üüm, J., Metzger, C., Knolle, P.A., Kolanus, W., Lang, T., and Diehl, L. (2014). Liver Sinusoidal Endothelial Cell-Mediated CD8 T Cell Priming Depends on Co-Inhibitory Signal Integration over Time. *PLoS ONE* 9, e99574.
- Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 12, 749-761.
- Kaech, S.M., and Wherry, E.J. (2007). Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity* 27, 393-405.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2, 251-262.
- Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged Interleukin-2R α Expression on Virus-Specific CD8+ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo. *Immunity* 32, 91-103.
- Kern, M., Popov, A., Scholz, K., Schumak, B., Djandji, D., Limmer, A., Eggle, D., Sacher, T., Zawatzky, R., Holtappels, R., *et al.* (2010). Virally Infected Mouse Liver Endothelial Cells Trigger CD8+ T-Cell Immunity. *Gastroenterology* 138, 336-346.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9, 833-844.
- Klugewitz, K., Adams, D.H., Emoto, M., Eulenburg, K., and Hamann, A. (2004). The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends in Immunology* 25, 590-594.
- Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P.A., Hamann, A., and Crispe, I.N. (2002a). Immunomodulatory Effects of the Liver: Deletion of Activated CD4+ Effector Cells and Suppression of IFN- γ -Producing Cells After Intravenous Protein Immunization. *The Journal of Immunology* 169, 2407-2413.
- Klugewitz, K., Scheffold, A., Radbruch, A., and Hamann, A. (2000). Transfer of IFN γ -depleted CD4+ T cells together with CD8+ T cells leads to rejection of murine kidney sarcoma in mice. *International Journal of Cancer* 87, 673-679.
- Klugewitz, K., Topp, S.A., Dahmen, U., Kaiser, T., Sommer, S., Kury, E., and Hamann, A. (2002b). Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into murine liver. *Hepatology* 35, 568-578.

Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., zum Büschenfelde, K.-H.M., and Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Journal of Hepatology* 22, 226-229.

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

Knolle, P.A., Germann, T., Treichel, U., Uhrig, A., Schmitt, E., Hegenbarth, S., Lohse, A.W., and Gerken, G. (1999a). Endotoxin Down-Regulates T Cell Activation by Antigen-Presenting Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *The Journal of Immunology* 162, 1401-1407.

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

Knolle, P.A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1999b). Induction of cytokine production in naive CD4+ T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116, 1428-1440.

Knolle, P.A., and Thimme, R. (2014). Hepatic Immune Regulation and Its Involvement in Viral Hepatitis Infection. *Gastroenterology* 146, 1193-1207.

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

Konkel, J.E., Frommer, F., Leech, M.D., Yagita, H., Waisman, A., and Anderton, S.M. (2010). PD-1 signalling in CD4+ T cells restrains their clonal expansion to an immunogenic stimulus, but is not critically required for peptide-induced tolerance. *Immunology* 130, 92-102.

Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Kühl, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Hamann, A., *et al.* (2009). Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology* 50, 1904-1913.

Kurts, C., Carbone, F.R., Barnden, M., Blanas, E., Allison, J., Heath, W.R., and Miller, J.F.A.P. (1997a). CD4+ T Cell Help Impairs CD8+ T Cell Deletion Induced by Cross-presentation of Self-Antigens and Favors Autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 2057-2062.

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. *The Journal of Experimental Medicine* 184, 923-930.

Kurts, C., Heath, W.R., Carbone, F.R., Kosaka, H., and Miller, J.F. (1998). Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity. *Novartis Foundation symposium* 215, 172-181; discussion 181-190.

Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1997b). Class I-restricted Cross-Presentation of Exogenous Self-Antigens Leads to Deletion of Autoreactive CD8+ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 239-245.

Kurts, C., Robinson, B.W.S., and Knolle, P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 10, 403-414.

- Lafdil, F., Miller, A.M., Ki, S.H., and Gao, B. (2010). Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 7, 250-254.
- Lambotin, M., Raghuraman, S., Stoll-Keller, F., Baumert, T.F., and Barth, H. (2010). A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat Rev Micro* 8, 350-360.
- Lan, R.Y., Selmi, C., and Gershwin, M.E. (2008). The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *Journal of Autoimmunity* 31, 7-12.
- Lanzavecchia, A. (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Current Opinion in Immunology* 8, 348-354.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., and Paul, W.E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of Experimental Medicine* 172, 921-929.
- Lefrancois, L., and Marzo, A.L. (2006). The descent of memory T-cell subsets. *Nat Rev Immunol* 6, 618-623.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annual Review of Immunology* 14, 233-258.
- Liao, W., Lin, J.-X., and Leonard, Warren J. (2013). Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity* 38, 13-25.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., *et al.* (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 15137-15142.
- Limmer, A., and Knolle, P.A. (2001). Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49 Suppl 1, S7-11.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.-G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348-1354.
- Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jüngerkes, F., Schumak, B., Djandji, D., Scholz, K., Klevenz, A., Hegenbarth, S., *et al.* (2005). Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *European Journal of Immunology* 35, 2970-2981.
- Lin, J.-X., and Leonard, W.J. (1997). Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8, 313-332.
- Lu, Kristina T., Kanno, Y., Cannons, Jennifer L., Handon, R., Bible, P., Elkahloun, Abdel G., Anderson, Stacie M., Wei, L., Sun, H., O'Shea, John J., *et al.* (2011). Functional and Epigenetic Studies Reveal Multistep Differentiation and Plasticity of In Vitro-Generated and In Vivo-Derived Follicular T Helper Cells. *Immunity* 35, 622-632.
- Lüth, S., Huber, S., Schramm, C., Buch, T., Zander, S., Stadelmann, C., Brück, W., Wraith, D.C., Herkel, J., and Lohse, A.W. (2008). Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *The Journal of Clinical Investigation* 118, 3403-3410.

- MacLeod, M.K.L., McKee, A.S., David, A., Wang, J., Mason, R., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2011). Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 7914-7919.
- 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, Vol 269.
- Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D., and Fugger, L. (1999). Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 10338-10343.
- Malek, T.R., and Castro, I. (2010). Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity* *33*, 153-165.
- Malek, T.R., Yu, A., Scibelli, P., Lichtenheld, M.G., and Codias, E.K. (2001). Broad Programming by IL-2 Receptor Signaling for Extended Growth to Multiple Cytokines and Functional Maturation of Antigen-Activated T Cells. *The Journal of Immunology* *166*, 1675-1683.
- Malovic, I., Sørensen, K.K., Elvevold, K.H., Nedredal, G.I., Paulsen, S., Erofeev, A.V., Smedsrød, B.H., and McCourt, P.A.G. (2007). The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor. *Hepatology* *45*, 1454-1461.
- Mardiney, M.r., and Malech, H. (1996). Enhanced engraftment of hematopoietic progenitor cells in mice treated with granulocyte colony-stimulating factor before low-dose irradiation: implications for gene therapy, Vol 87.
- Masopust, D., Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2004). The role of programming in memory T-cell development. *Current Opinion in Immunology* *16*, 217-225.
- Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2006). Cutting Edge: Gut Microenvironment Promotes Differentiation of a Unique Memory CD8 T Cell Population. *The Journal of Immunology* *176*, 2079-2083.
- Matzinger, P., and Kamala, T. (2011). Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol* *11*, 221-230.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* *1*, 135-145.
- Medzhitov, R., and Janeway Jr, C.A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* *91*, 295-298.
- Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F., and Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological Reviews* *211*, 81-92.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* *136*, 2348-2357.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunology Today* *8*, 223-227.

- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology* 7, 145-173.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Current Opinion in Immunology* 24, 297-302.
- Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130, Vol 82.
- Neefjes, J., Jongstra, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11, 823-836.
- Nemazee, D. (2006). Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 6, 728-740.
- Neumann, K., Rudolph, C., Neumann, C., Janke, M., Amsen, D., and Scheffold, A. (2015). Liver sinusoidal endothelial cells induce immunosuppressive IL-10-producing Th1 cells via the Notch pathway. *European Journal of Immunology*, n/a-n/a.
- Nishimura, T., and Ohta, A. (1999). A Critical Role for Antigen-Specific Th1 Cells in Acute Liver Injury in Mice. *The Journal of Immunology* 162, 6503-6509.
- Nowell, M.A., Williams, A.S., Carty, S.A., Scheller, J., Hayes, A.J., Jones, G.W., Richards, P.J., Slinn, S., Ernst, M., Jenkins, B.J., *et al.* (2009). Therapeutic Targeting of IL-6 Trans Signaling Counteracts STAT3 Control of Experimental Inflammatory Arthritis. *The Journal of Immunology* 182, 613-622.
- O'Shea, J.J., and Murray, P.J. (2008). Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity* 28, 477-487.
- Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J., and Lefrançois, L. (2010). CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 193-198.
- Oh, S., Perera, L.P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T.A., and Berzofsky, J.A. (2008). IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5201-5206.
- 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.
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988). IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology* 141, 1543-1549.

Oldstone, M.B.A., 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.

Oo, Y.H., and Adams, D.H. (2010). The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Journal of Autoimmunity* 34, 45-54.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141.

Peters, M., Müller, A.M., and Rose-John, S. (1998). Interleukin-6 and Soluble Interleukin-6 Receptor: Direct Stimulation of gp130 and Hematopoiesis, Vol 92.

Pipkin, M.E., and Lieberman, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology* 19, 301-308.

Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* 32, 79-90.

Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., and van den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6, 280-286.

Protzer, U., Maini, M.K., and Knolle, P.A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* 12, 201-213.

Provine, N.M., Larocca, R.A., Penaloza-MacMaster, P., Borducchi, E.N., McNally, A., Parenteau, L.R., Kaufman, D.R., and Barouch, D.H. (2014). Longitudinal Requirement for CD4+ T Cell Help for Adenovirus Vector–Elicited CD8+ T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 192, 5214-5225.

Pulendran, B., Palucka, K., and Banchereau, J. (2001). Sensing Pathogens and Tuning Immune Responses. *Science* 293, 253-256.

Qui, H.Z., Hagymasi, A.T., Bandyopadhyay, S., St. Rose, M.-C., Ramanarasimhaiah, R., Ménoret, A., Mittler, R.S., Gordon, S.M., Reiner, S.L., Vella, A.T., *et al.* (2011). CD134 Plus CD137 Dual Costimulation Induces Eomesodermin in CD4 T Cells To Program Cytotoxic Th1 Differentiation. *The Journal of Immunology* 187, 3555-3564.

Racanelli, V., and Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54-S62.

Rahemtulla, A., Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Kundig, T.M., Sambhara, S.R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C.J., Zinkernagel, R.M., *et al.* (1991). Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353, 180-184.

Rao, R.R., Li, Q., Odunsi, K., and Shrikant, P.A. (2010). The mTOR Kinase Determines Effector versus Memory CD8+ T Cell Fate by Regulating the Expression of Transcription Factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32, 67-78.

Raziorrouh, B., Ulsenheimer, A., Schraut, W., Heeg, M., Kurktschiev, P., Zachoval, R., Jung, M.C., Thimme, R., Neumann–Haefelin, C., Horster, S., *et al.* (2011). Inhibitory Molecules That Regulate

- Expansion and Restoration of HCV-Specific CD4+ T Cells in Patients With Chronic Infection. *Gastroenterology* 141, 1422-1431.e1426.
- Redmond, W.L., and Sherman, L.A. (2005). Peripheral Tolerance of CD8 T Lymphocytes. *Immunity* 22, 275-284.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.
- Rock, K.L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological Reviews* 207, 166-183.
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences* 8, 1237-1247.
- Ryu, S.J., Kang, B., Kim, S.-H., Kim, T.W., Chang, J., and Choi, E.Y. (2012). Requirement of CD4 Help for Induction of CD8 T Cell Response Specific for Virally Derived H60. *Immune Network* 12, 118-125.
- Sanjabi, S., Mosaheb, M.M., and Flavell, R.A. (2009a). Opposing Effects of TGF- β and IL-15 Cytokines Control the Number of Short-Lived Effector CD8+ T Cells. *Immunity* 31, 131-144.
- Sanjabi, S., Zenewicz, L.A., Kamanaka, M., and Flavell, R.A. (2009b). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 447-453.
- Schietinger, A., Delrow, J.J., Basom, R.S., Blattman, J.N., and Greenberg, P.D. (2012). Rescued Tolerant CD8 T Cells Are Preprogrammed to Reestablish the Tolerant State. *Science* 335, 723-727.
- Schildberg, F.A., Hegenbarth, S.I., Schumak, B., Limmer, A., and Knolle, P.A. (2008). Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *European Journal of Immunology* 38, 957-967.
- Schildberg, F.A., Wojtalla, A., Siegmund, S.V., Endl, E., Diehl, L., Abdullah, Z., Kurts, C., and Knolle, P.A. (2011). Murine hepatic stellate cells veto CD8 T cell activation by a CD54-dependent mechanism. *Hepatology* 54, 262-272.
- Schmitt, E., Hoehn, P., Huels, C., Goedert, S., Palm, N., Rude, E., and Germann, T. (1994). T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon- γ and is inhibited by transforming growth factor- β . *European Journal of Immunology* 24, 793-798.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E.M., van der Voort, E.I.H., Ofringa, R., and Melief, C.J.M. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schölzel, K., Schildberg, F.A., Welz, M., Börner, C., Geiger, S., Kurts, C., Heikenwälder, M., Knolle, P.A., and Wohlleber, D. (2014). Transfer of MHC-class-I molecules among liver sinusoidal cells facilitates hepatic immune surveillance. *Journal of Hepatology* 61, 600-608.
- Schulze zur Wiesch, J., Ciuffreda, D., Lewis-Ximenez, L., Kasproicz, V., Nolan, B.E., Streeck, H., Aneja, J., Reyor, L.L., Allen, T.M., Lohse, A.W., *et al.* (2012). Broadly directed virus-specific CD4+ T

cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 61-75.

Schurich, A., Berg, M., Stabenow, D., Böttcher, 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. *The Journal of Immunology* 184, 4107-4114.

Schurich, A., Böttcher, 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.

Semmo, N., Day, C.L., Ward, S.M., Lucas, M., Harcourt, G., Loughry, A., and Klenerman, P. (2005). Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 41, 1019-1028.

Shedlock, D.J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory. *Science* 300, 337-339.

Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 1645-1655.

Smedsrod, B. (2004). Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol* 3 *Suppl* 1, S22.

Smith, C.M., Wilson, N.S., Waithman, J., Villadangos, J.A., Carbone, F.R., Heath, W.R., and Belz, G.T. (2004). Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 5, 1143-1148.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T Cell Activation. *Annual review of immunology* 27, 591-619.

Sørensen, K.K., McCourt, P., Berg, T., Crossley, C., Couteur, D.L., Wake, K., and Smedsrød, B. (2012). The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity, Vol 303.

Sprent, J., Cho, J.-H., Boyman, O., and Surh, C.D. (2008). T cell homeostasis. *Immunol Cell Biol* 86, 312-319.

Srinivasan, M., and Frauwirth, K.A. (2009). Peripheral tolerance in CD8+ T cells. *Cytokine* 46, 147-159.

Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., *et al.* (2010). Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells. *Immunity* 33, 192-202.

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.

Steinman, R.M. (1991). The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annual Review of Immunology* 9, 271-296.

Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). TOLEROGENTIC DENDRITIC CELLS*. *Annual Review of Immunology* 21, 685-711.

- Stemberger, C., Neuenhahn, M., Gebhardt, F.E., Schiemann, M., Buchholz, V.R., and Busch, D.H. (2009). Stem cell-like plasticity of naïve and distinct memory CD8⁺ T cell subsets. *Seminars in Immunology* *21*, 62-68.
- Sun, J., Madan, R., Karp, C.L., and Braciale, T.J. (2009). Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* *15*, 277-284.
- Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2003). Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help. *Science* *300*, 339-342.
- Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2004). Cutting Edge: Long-Lived CD8 Memory and Protective Immunity in the Absence of CD40 Expression on CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* *172*, 3385-3389.
- Sun, J.C., Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2004). CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat Immunol* *5*, 927-933.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2008). Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity* *29*, 848-862.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *The Journal of Immunology* *145*, 3796-3806.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* *100*, 655-669.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). MOLECULAR MECHANISMS REGULATING TH1 IMMUNE RESPONSES. *Annual Review of Immunology* *21*, 713-758.
- Takai, Y., Wong, G.G., Clark, S.C., Burakoff, S.J., and Herrmann, S.H. (1988). B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Immunology* *140*, 508-512.
- Tham, E.L., Shrikant, P., and Mescher, M.F. (2002). Activation-Induced Nonresponsiveness: A Th-Dependent Regulatory Checkpoint in the CTL Response. *The Journal of Immunology* *168*, 1190-1197.
- Théry, 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 α - and β -Chains. *The Journal of Immunology* *161*, 2106-2113.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2003). CD8⁺ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology* *77*, 68-76.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* *10*, 753-766.
- Tiegs, G. (2007). Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. *Z Gastroenterol* *45*, 63-70.

- Tiegs, G., and Lohse, A.W. (2010). Immune tolerance: What is unique about the liver. *Journal of Autoimmunity* 34, 1-6.
- Tosi, M.F. (2005). Innate immune responses to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, 241-249.
- Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat Immunol* 10, 864-871.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- Tsai, S., Liaw, Y., Chen, M., Huang, C., and Kuo, G.C. (1997). Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 25, 449-458.
- 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., Schmidt, C., and Mescher, M. (2002). The Roles of IL-12 in Providing a Third Signal for Clonal Expansion of Naive CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* 169, 6842-6849.
- Veldhoen, M., Uytendhoeve, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9, 1341-1346.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.
- 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.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15, 388-400.
- Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8, 607-618.
- Wakim, L.M., and Bevan, M.J. (2010). From the thymus to longevity in the periphery. *Current Opinion in Immunology* 22, 274-278.
- Wan, Y.Y. (2010). Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 130, 166-171.
- Wang, J.-C.E., and Livingstone, A.M. (2003). Cutting Edge: CD4+ T Cell Help Can Be Essential for Primary CD8+ T Cell Responses In Vivo. *The Journal of Immunology* 171, 6339-6343.

- Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.-Y., Watford, W.T., *et al.* (2009). Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4⁺ T Cells. *Immunity* 30, 155-167.
- Wiegard, C., Wolint, P., Frenzel, C., Cheruti, U., Schmitt, E., Oxenius, A., Lohse, A.W., and Herkel, J. (2007). Defective T Helper Response of Hepatocyte-Stimulated CD4 T Cells Impairs Antiviral CD8 Response and Viral Clearance. *Gastroenterology* 133, 2010-2018.
- Wiesel, M., Joller, N., Ehlert, A.-K., Crouse, J., Spörri, R., Bachmann, M.F., and Oxenius, A. (2010). Th Cells Act Via Two Synergistic Pathways To Promote Antiviral CD8⁺ T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 185, 5188-5197.
- Wiesel, M., and Oxenius, A. (2012). From crucial to negligible: Functional CD8⁺T-cell responses and their dependence on CD4⁺T-cell help. *European Journal of Immunology* 42, 1080-1088.
- Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 441, 890-893.
- Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of Ultrastructure Research* 31, 125-150.
- Wisse, E., de Zanger, R.B., Charels, K., van der Smissen, P., and McCuskey, R.S. (1985). The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse. *Hepatology* 5, 683-692.
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gärtner, K., Frings, Marianne K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., Börner, C., Arnold, B., Hämmerling, G., Nieswandt, B., *et al.* (2012). TNF-Induced Target Cell Killing by CTL Activated through Cross-Presentation. *Cell Reports* 2, 478-487.
- Wowk, M.E., and Trapani, J.A. (2004). Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B. *Microbes and Infection* 6, 752-758.
- Wu, J., Lu, M., Meng, Z., Trippler, M., Broering, R., Szczeponek, A., Krux, F., Dittmer, U., Roggendorf, M., Gerken, G., *et al.* (2007). Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology* 46, 1769-1778.
- Wu, Y., and Liu, Y. (1994). Viral induction of co-stimulatory activity on antigen-presenting cells bypasses the need for CD4⁺ T-cell help in CD8⁺ T-cell responses. *Current Biology* 4, 499-505.
- Yang, T.C., Millar, J., Groves, T., Zhou, W., Grinshtein, N., Parsons, R., Evelegh, C., Xing, Z., Wan, Y., and Bramson, J. (2007). On the Role of CD4⁺ T Cells in the CD8⁺ T-Cell Response Elicited by Recombinant Adenovirus Vaccines. *Mol Ther* 15, 997-1006.
- Yang, Y., Xiang, Z., Ertl, H.C., and Wilson, J.M. (1995). Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 7257-7261.
- Zehn, D., and Bevan, M.J. (2006). T Cells with Low Avidity for a Tissue-Restricted Antigen Routinely Evade Central and Peripheral Tolerance and Cause Autoimmunity. *Immunity* 25, 261-270.

Zhang, N., and Bevan, Michael J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* 35, 161-168.

Zheng, W.-p., and Flavell, R.A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 89, 587-596.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults, Vol 112.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.6.4: Die Induktion von CD8 ⁺ T Zellen durch LSEC mit Hilfe der IL-6 Trans-Signalübertragung.....	24
Abbildung 4.1.1: T _h 1 Zellen sind nach Differenzierung T-bet-positiv und exprimieren die Zytokine IFN γ und TNF.....	50
Abbildung 4.2.1: T _h 1 Zellen verstärken die frühe Granzym-B- und CD25-Expression von LSEC-induzierten CD8 ⁺ T Zellen.....	52
Abbildung 4.2.2: Die spezifische Induktion von CD8 ⁺ T Zellen und die dabei beobachtete T _h 1-Hilfe findet nur statt, wenn CD8 ⁺ T Zellen und T _h 1 Zellen von LSEC als APC in Gegenwart von Antigen stimuliert werden.	53
Abbildung 4.3.1: Die frühe Steigerung der Granzym-B-Expression durch T _h 1-Hilfe ist LSEC-spezifisch.	54
Abbildung 4.4.1: Wildtyp T _h 1 Zellen haben im Gegensatz zu Antigen-spezifischen T _h 1 Zellen keinen Einfluss auf die LSEC-vermittelte Induktion von CD8 ⁺ T Zellen.....	56
Abbildung 4.4.2: OT-II T _h 1 Zellen können nicht mit I-Ab ^{-/-} LSEC interagieren und die LSEC-vermittelte Induktion von CD8 ⁺ T Zellen beeinflussen.	57
Abbildung 4.5.1: Der Kokultur-Überstand von LSEC und T _h 1 Zellen zeigt eine Helfer-Funktion vergleichbar mit der Anwesenheit von T _h 1 Zellen.	58
Abbildung 4.5.2: Die Stimulation mit CD3-Antikörper und dem Kokultur-Überstand von LSEC und T _h 1 Zellen ist ausreichend für die Induktion der frühen Granzym-B-Expression von CD8 ⁺ T Zellen.	60
Abbildung 4.6.1: LSEC werden durch T _h 1-Kontakt aktiviert. (a-b) FACS-Analyse von LSEC nach 18 h Kokultur mit T _h 1 Zellen im Vergleich zu der Stimulation mit LPS.	61
Abbildung 4.6.2: T _h 1 Zellen werden von LSEC Antigen-spezifisch aktiviert.....	63
Abbildung 4.6.3: LSEC und T _h 1 Zellen sind auch in der Kokultur mit CD8 ⁺ T Zellen durch Antigen-spezifische Interaktion aktiviert.....	64
Abbildung 4.7.1: Durch Neutralisation von IL-2 wird die frühe Granzym-B-Hochregulation von CD8 ⁺ T Zellen gehemmt.....	67

Abbildung 4.7.2: Durch Blockade von IL-2 wird die Granzym-B-Expression von CD8 ⁺ T Zellen nach Stimulation mit dem Kokultur-Überstand von LSEC und T _h 1 Zellen verhindert.	67
Abbildung 4.8.1: Durch die Blockade von IL-2 wird die Hyper-IL-6 vermittelte Granzym-B-Expression unterdrückt.	69
Abbildung 4.8.2: Die Blockade des hochaffinen IL-2 Rezeptors verhindert die Hyper-IL-6-induzierte Expression von Granzym B.	70
Abbildung 4.8.3: Die Zugabe von IL-2 verstärkt die Granzym-B-Hochregulation durch IL-6 Trans-Signalübertragung.	71
Abbildung 4.8.4: Die frühe Granzym-B-Expression und die weitere Hochregulation durch IL-2 sind titrierbar.	71
Abbildung 4.9.1: Die Zytokin-Sekretion von T _h 1 Zellen reicht alleine nicht aus, um die Granzym-B-Expression von CD8 ⁺ T Zellen einzuleiten.	73
Abbildung 4.9.2: LSEC induzieren nach Aktivierung die Granzym-B-Expression von CD8 ⁺ T Zellen durch Zytokin-Sekretion.	74
Abbildung 5.8.1: Zusammenfassung der LSEC-vermittelten Induktion von CD8 ⁺ T Zellen durch IL-6 Trans-Signalübertragung.	96
Abbildung 5.8.2: Zusammenfassung der Helfer-Funktion von T _h 1 Zellen bei der LSEC-vermittelten Induktion von CD8 ⁺ T Zellen durch IL-6 Trans-Signalübertragung.	97

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1.5.1: FACS-Antikörper, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.....	35
Tabelle 3.1.5.2: ELISA-Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.....	36
Tabelle 3.1.5.3: Funktionale Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> verwendet wurden.....	36
Tabelle 3.1.9.1: Mauslinien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.....	38
Tabelle 3.1.10.1: Computersoftware, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.....	39

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AIRE	<i>Engl.:</i> Autoimmune regulator
APC	Antigen-präsentierende Zellen (<i>Engl.:</i> antigen-presenting cells)
B7-H1	B7-Homolog 1 bzw. PD-Ligand 1
Bcl	<i>Engl.:</i> B-cell lymphoma
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Engl.:</i> bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen (<i>Engl.:</i> cluster of differentiation)
CTL	zytotoxische T Zellen (<i>Engl.:</i> cytotoxic T lymphocytes)
CTLA-4	<i>Engl.:</i> Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DC	dendritische Zellen (<i>Engl.:</i> dendritic cells)
DMEM	<i>Engl.:</i> Dulbeccos Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Engl.:</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Eomes	Eomesodermin
Et al.	und andere (<i>Lat.:</i> et alteres)
FACS	<i>Engl.:</i> fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum (<i>Engl.:</i> fetal calf serum)
FMO	<i>Engl.:</i> Fluorescence Minus One
Foxp3	Forkhead-Box P3
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GBSS	<i>Engl.:</i> Grey's Balanced Salt Solution
GzmB	Granzym B
h	Stunde (<i>Engl.:</i> hour)
H2	<i>Engl.:</i> Histocompatibility-2
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	<i>Engl.:</i> Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
iT _{reg}	induzierte regulatorische T Zellen (<i>Engl.</i> : induced regulatory T cells)
IMDM	<i>Engl.</i> : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
l	Liter
LFA-1	<i>Engl.</i> : Leukocyte function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	sinusoidale Endothelzellen der Leber (<i>Engl.</i> : liver sinusoidal endothelial cells)
M	Molar
m	milli bzw. Meter
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>Engl.</i> : Magnetic Activated Cell Sorting)
MFI	<i>Engl.</i> : Mean Fluorescence Intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Engl.</i> : major histocompatibility complex)
Min.	Minute
mm	Millimeter
MPEC	<i>Engl.</i> : memory precursor effector cells
mTec	medulläre Thymus Epithelzellen (<i>Engl.</i> : Medullary thymic epithelial cells)
mTOR	<i>Engl.</i> : mammalian target of Rapamycin
n	nano
ns	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
p	P-Wert
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (<i>Engl.</i> : pathogen associated molecular patterns)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Engl.</i> : phosphate buffered saline)
PD-1	<i>Engl.</i> : Programmed death-1
PD-L1	<i>Engl.</i> : Programmed death-ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Lat.</i> : potentia Hydrogenii
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Muster-Erkennungsrezeptoren (<i>Engl.</i> : pattern recognition receptors)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Engl.</i> : revolutions per minute)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>Engl.</i> : standard deviation)

SIINFEKL	OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid
SLEC	<i>Engl.:</i> short-lived effector cells
STAT	<i>Engl.:</i> Signal Transducer and Activator of Transcription
TC	T Zelle, <i>Engl.:</i> T cell
TCM	zentrale Gedächtnis T Zellen (<i>Engl.:</i> central memory T cells)
TCR	T Zell Rezeptor (<i>Engl.:</i> T cell receptor)
TEM	Effektor Gedächtnis T Zellen (<i>Engl.:</i> effector memory T cells)
T _{fh}	follikuläre Helfer T Zellen (<i>Engl.:</i> Follicular helper T cells)
TGF-β	<i>Engl.:</i> Transforming growth factor-β
T _h	T Helferzelle (<i>Engl.:</i> T helper cell)
TLR	<i>Engl.:</i> Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRM	organresidente Gedächtnis T Zellen (<i>Engl.:</i> tissue resident memory T cells)
U	Unit, Internationale Einheit der Enzymaktivität
v/v	Volumenprozent
VCAM-1	<i>Engl.:</i> Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLA-4	<i>Engl.:</i> very late antigen-4
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
α	anti-
μ	mikro