

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Modulation von CD4⁺ T-Zellen durch professionelle und nicht-
professionelle antigenpräsentierende Zellen der Leber

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité –Universitätsmedizin Berlin

von

Ruth Marahiel
aus Berlin

Datum der Promotion: 06.09.2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 Die Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen.....	2
1.2.1 Aktivierung und Kostimulation von CD4 ⁺ T-Zellen.....	2
1.2.2 Gewebespezifische Migration und Zytokinexpression von CD4 ⁺ T-Zellen.....	4
1.3 Die Leber.....	5
1.3.1 Das Lebersinusendothel.....	6
1.3.2 Leber-residente professionelle APC.....	7
1.3.3 Toleranzinduktion in der Leber	8
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	9
2 Methodik	11
2.1 Versuchstiere.....	11
2.2 Geräte.....	11
2.3 Materialien.....	12
2.4 Reagenzien.....	13
2.5 Puffer und Medien.....	15
2.6 Antikörper und MicroBeads.....	16
2.7 Methoden.....	19
2.7.1 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung.....	19
2.7.2 <i>Ex vivo</i> Isolation von LSEC.....	20
2.7.3 <i>Ex vivo</i> Isolation von LAPC.....	22
2.7.4 <i>Ex vivo</i> Isolation von professionellen Milz-APC (<i>spleen-derived antigen presenting cells</i> , SAPC).....	23
2.7.5 <i>Ex vivo</i> Isolation von naiven CD4 ⁺ T-Zellen mit Neuetablierung der Depletion von antigenpräsentierenden Kontaminanten.....	24
2.7.6 <i>Immunhistochemische Färbung</i> von Makrophagen und B-Zellen in der LAPC <i>in situ</i> Ausgangspopulation.....	26

2.7.7 Immunfluoreszenz Färbung von dendritischen Zellen in der LAPC <i>in situ</i> Ausgangspopulation.....	26
2.7.8 <i>In vitro</i> -Aktivierung von naiven CD4 ⁺ T-Zellen durch verschiedene antigenpräsentierende Zellpopulationen der Leber.....	27
2.7.9 <i>In vitro</i> -Aktivierung von naiven CD4 ⁺ T-Zellen in Anwesenheit des Retinolsäure-Rezeptor Inhibitor LE 540.....	28
2.7.10 <i>In vitro</i> -Aktivierung von naiven CD4 ⁺ T-Zellen mit unterschiedlicher Aktivierungsstärke und zusätzlicher Kostimulation.....	28
2.7.11 Durchflusszytometrie.....	28
2.7.12 Nachweis von zellspezifisch exprimierten Oberflächenmolekülen zur Phänotypanalyse der <i>in vitro</i> aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	30
2.7.13 Nachweis von zellspezifisch exprimierten intrazellulären Zytokinen zur Phänotypanalyse der <i>in vitro</i> aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	31
2.7.14 Statistische Datenanalyse.....	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Charakterisierung des Phänotyps von CD4 ⁺ T-Zellen nach Aktivierung durch LAPC.....	32
3.1.1 <i>In situ</i> Nachweis der LAPC.....	32
3.1.2 Prozentuale Zusammensetzung der isolierten LAPC.....	33
3.1.3 Etablierung einer Methode zur Isolation von APC-freien naiven CD4 ⁺ T-Zellen...34	
3.1.4 Phänotyp der CD4 ⁺ T-Zellen nach Aktivierung durch hepatische APC-Populationen.....	35
3.2 Mechanismen der Induktion des Phänotyps von CD4 ⁺ T-Zellen, die durch APC der Leber aktiviert wurden.....	41
3.2.1 Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC.....	41
3.2.2 Einfluss der durch LSEC zur Verfügung gestellten Retinolsäure.....	43
3.2.3 Einfluss der Aktivierungsstärke.....	48
3.2.4 Einfluss der Kostimulation.....	53
4 Diskussion.....	59
4.1 Einfluss von professionellen LAPC und nicht-professionellen LSEC auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	59
4.2 Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	62

4.3 Einfluss der durch LSEC zur Verfügung gestellten Retinolsäure auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	63
4.4 Einfluss der Aktivierung auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	66
4.5 Einfluss der Kostimulation auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	68
4.6 In der Literatur beschriebener Einfluss von LSEC auf den Phänotyp von Th1-Zellen.....	70
4.7 Schlussfolgerungen und medizinische Relevanz.....	71
Literaturverzeichnis.....	74
Eidesstattliche Versicherung.....	84
Lebenslauf.....	85
Publikationen.....	87
Danksagung.....	88

Zusammenfassung

In der Regulation der Immunantwort ist die Leber für ihr tolerogenes Potential bekannt. Insbesondere Lebersinusendothelzellen (LSEC), eine Population nicht-professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC), die das Lumen der Sinusoide auskleiden, tragen zur Toleranzinduktion bei. LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimieren keine proinflammatorischen Zytokine und zeigen eine starke Expression der Darm-*Homing*-Moleküle α 4 β 7-Integrin und CCR9. Durch die Lebersinusoide zirkulierende CD4⁺ T-Zellen interagieren nicht nur mit LSEC, sondern werden auch durch professionelle APC der Leber (LAPC) aktiviert, die sich aus Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen zusammensetzen. Daher wurde anhand von *in vitro* Kulturen untersucht, welchen Anteil die verschiedenen APC-Populationen an der CD4⁺ T-Zellen-Antwort in der Leber haben und welche Mechanismen dem Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen zugrunde liegen.

Im Vergleich zu LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen, exprimieren LAPC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen viel IFN γ , wenig α 4 β 7-Integrin und ähnliche Mengen P-Lig, ein *Homing*-Rezeptor für die Haut und entzündetes Gewebe. Die Anwesenheit von zusätzlichen LSEC während der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch LAPC erhöhte die Expression von α 4 β 7-Integrin und reduzierte die IFN γ -Expression. Die Blockade des Retinolsäure-*Signaling* zeigte eine Inhibition der Expression von α 4 β 7-Integrin und führte zu einem Anstieg der Expression von IFN γ und P-Lig in Leber-aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Auch ein starkes kostimulatorisches Signal durch Zugabe eines anti-CD28 Antikörpers oder eine starke T-Zell-Aktivierung reduzierte die LSEC-induzierte α 4 β 7-Integrin-Expression, während die Expression von IFN γ und P-Lig anstieg. Diese Ergebnisse zeigen, dass in hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen die Bereitstellung von Retinolsäure und die geringe Expression der kostimulatorischen Moleküle durch LSEC die Migration in den Darm induziert und die Expression des proinflammatorischen Zytokines IFN γ senkt. Es ist festzuhalten, dass trotz optimaler Kostimulation und Blockade des Retinolsäure-*Signaling* LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zell nur geringe Mengen IFN γ exprimieren. Vermutlich ist das Fehlen von Th-1-induzierenden Faktoren wie IL-12 für die ausbleibende Th-1-Zell-Induktion durch LSEC verantwortlich.

Zusammenfassend wurden die Bereitstellung von Retinolsäure sowie die schwache Aktivierung und Kostimulation durch LSEC als Mechanismen identifiziert, die dem unterschiedlichen Phänotyp von LSEC- und LAPC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen zugrunde

liegen. Während die zusätzliche Anwesenheit von LAPC die schwache Aktivierung und Kostimulation durch LSEC ausgleicht, ist das Retinolsäure-*Signaling* ein aktiver Mechanismus, der die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, P-Lig und IFN γ in hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen reguliert.

Summary

In the regulation of immune responses the liver usually promotes tolerance rather than immunity. In particular, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), a population of hepatic non-professional antigen-presenting cells (APC) that line the liver sinusoids, shift T-cell responses towards tolerance. LSEC-activated CD4⁺ T cells do not express pro-inflammatory cytokines such as IFN γ and are characterized by the expression of the gut-homing molecules α 4 β 7 integrin and CCR9. In the sinusoids, circulating CD4⁺ T cells are not only activated by LSEC but also interact with professional hepatic APC (LAPC), comprised of dendritic cells, macrophages and B cells. Therefore in the present study we investigated, the relative contributions of hepatic non-professional and professional APC to the development of CD4⁺ T-cell responses by using *in vitro* co-culture systems. Furthermore, underlying mechanisms responsible for the described phenotype of liver-activated CD4⁺ T cells were analyzed.

In comparison to LSEC-activated CD4⁺ T cells, LAPC-activated CD4⁺ T cells expressed high amounts of IFN γ , low levels of α 4 β 7 integrin and similar level of P-Lig, a homing receptor for skin and inflammatory tissue. The presence of LSEC during CD4⁺ T cell activation by LAPC enhanced α 4 β 7 integrin expression and reduced IFN γ production. Blockage of retinoic acid signaling inhibited α 4 β 7 integrin expression and increased expression of IFN γ and P-Lig in liver-activated CD4⁺ T cells. Also a strong co-stimulatory signaling through an anti-CD28 antibody or strong T cell activation reduced the LSEC-mediated expression of α 4 β 7 integrin while expression of IFN γ and P-Lig was increased. These findings indicate that the provision of retinoic acid as well as the weak level of co-stimulation by LSEC is involved in the regulation of gut-homing receptors and IFN γ expression in hepatic-activated CD4⁺ T cells. Importantly, despite optimal stimulatory conditions and blockage of retinoic acid signaling LSEC induced only small levels of IFN γ in CD4⁺ T cells, suggesting that a lack of Th1-inducing factors such as IL-12 is responsible for the failure of Th1 induction on LSEC-activated CD4⁺ T cells.

In summary, the provision of retinoic acid as well as the LSEC-mediated lack of activation and co-stimulation belong to the mechanisms which resulting the different phenotype of LSEC- and LAPC-activated CD4⁺ T cells. Whereas the lack of activation and co-stimulation of LSEC-activated CD4⁺ T cells is balanced by the additional presence of LAPC, the provision of retinoic acid is an active mechanism, which regulates the expression of α 4 β 7 integrin, P-Lig and IFN γ in liver-activated CD4⁺ T cells.

Abkürzungsverzeichnis

APC	antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
BD	Becton Dickinson
BV	Brilliant Violet
BSA	bovines Serumalbumin
CCR	CC Chemokinrezeptor
cDMEM	Komplett-DMEM
CFSE	5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
cRPMI	Komplett-RPMI
Cy5	Indodicarbocyanin
DAPI	Diamidinophenylindol
DMEM	Dulbesso's Modified Eagle Medium
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward light scatter</i>
Geom.Mean	geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HPF	<i>high power field</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IM	Ionomycin
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>

L-Selektin	Leukozyten-Selektin
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHC-I, MHC-II	MHC-Klasse I, MHC-Klasse II
MHC-II ^{-/-}	MHC-II-defizient
MNC	Mononukleäre Zellen
MS	Multi Sort
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung
NPC	nicht-parenchymatische Zellen
Ns	Nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
P	<i>probability-value</i>
PBS	Phosphate buffered salt solution
PE	R-phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
P-Lig	P-Selektin-Ligand
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
P-Selektin	Thrombozyten- und Endothel-Selektin
RALDH	Retinal-Dehydrogenase
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
SAPC	spleen-derived antigen presenting cells
SSC	<i>sideward light scatter</i>
TCR	T-Zellrezeptor
Th1	T Helferzellen 1
T _{LAPC}	LAPC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen

T _{LSEC}	LSEC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen
T _{LSEC/LAPC}	LSEC- und LAPC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{regs}	Regulatorische T-Zellen
T _{SAPC}	SAPC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen
wRPMI	Wasch-RPMI
WM	Waschmedium
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau eines Leberlobulus.....	6
Abb. 2: Aufbau der Lebersinusoide.....	7
Abb. 3: Reinheit der isolierten LSEC.....	21
Abb. 4: Reinheit der isolierten LAPC.....	23
Abb. 5: Reinheit der isolierten naiven CD4 ⁺ T-Zellen.....	25
Abb. 6: <i>In situ</i> Nachweis hepatischer APC-Populationen.....	33
Abb. 7: Prozentuale Zusammensetzung der LAPC-Population.....	34
Abb. 8: Proliferation OVA-spezifischer naiver CD4 ⁺ T-Zellen in Anwesenheit von Ova.....	35
Abb. 9: Aktivierung und Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen, die durch verschiedene hepatische APC-Populationen antigenspezifisch stimuliert wurden.....	37
Abb. 10: Induktion von <i>Homing</i> -Molekülen auf CD4 ⁺ T-Zellen durch verschiedene APC-Populationen der Leber.....	38
Abb. 11: Zytokinprofil von CD4 ⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Populationen der Leber aktiviert wurden.....	40
Abb. 12: Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen, die durch LSEC aus MHC-II ^{-/-} -Mäusen oder WT-Mäusen aktiviert wurden.....	42
Abb. 13: Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC auf den Phänotyp von CD4 ⁺ T-Zellen.....	43
Abb. 14: Einfluss von Retinolsäure auf die Aktivierung und Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Populationen der Leber aktiviert wurden.....	44
Abb. 15: Einfluss von Retinolsäure auf die Expression von <i>Homing</i> -Rezeptoren auf CD4 ⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Populationen der Leber aktiviert wurden.....	45
Abb. 16: Einfluss von Retinolsäure auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in CD4 ⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Populationen der Leber aktiviert wurden.....	46
Abb. 17: Vergleich des Phänotyps von CD4 ⁺ T-Zellen die durch über Nacht vorkultivierte und gewaschene LAPC oder durch frisch isolierte LAPC aktiviert wurden.....	48
Abb. 18: Einfluss der Aktivierungsstärke auf die Aktivierung und Proliferation von CD4 ⁺	

T-Zellen.....	50
Abb. 19: Einfluss der Aktivierungsstärke auf die Expression von <i>Homing</i> -Rezeptoren auf CD4 ⁺ T-Zellen.....	51
Abb. 20: Einfluss der Aktivierungsstärke auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in CD4 ⁺ T-Zellen.....	52
Abb. 21: Einfluss der Kostimulation auf die Aktivierungs- und Proliferationsstärke von antigenspezifisch aktivierten T _{LSEC} und T _{SAPC}	54
Abb. 22: Einfluss der Kostimulation auf die Expression von <i>Homing</i> -Rezeptoren auf antigenspezifisch aktivierten T _{LSEC} und T _{SAPC}	56
Abb. 23: Einfluss der Kostimulation auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in antigenspezifisch aktivierten T _{LSEC} und T _{SAPC}	57

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte mit Hersteller und Firmensitz.....	11
Tab. 2: Verwendete Materialien mit Hersteller und Firmensitz.....	12
Tab. 3: Verwendete Reagenzien mit Hersteller und Firmensitz.....	13
Tab. 4: Verwendete Puffer und Medien mit ihrer Zusammensetzung.....	15
Tab. 5: Am Durchflusszytometer verwendete Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima.....	16
Tab. 6: Verwendete Antikörper für die Fluoreszenzmarkierung von Zellen.....	16
Tab. 7: Verwendete Antikörper für die histologischen Färbungen.....	18
Tab. 8: Verwendete MicroBeads für die Isolation von Zellen.....	19

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein evolutionär entwickelter Schutzmechanismus, dessen Hauptaufgabe es ist, eindringende Pathogene und körpereigene apoptotische oder entartete Zellen zu eliminieren. Physiologische Selbst-Antigene müssen hingegen toleriert werden. Um die zu eliminierenden Proteine und Zellen zu erkennen, ist die Unterscheidung zwischen eigen und fremd sowie zwischen gefährlich und ungefährlich von entscheidender Bedeutung.

Die Relevanz einer angemessenen Immunantwort spiegelt sich in zahlreichen Krankheitsbildern. So resultieren Autoimmunkrankheiten wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa aus einer überschießenden Immunantwort, während hepatische Virusinfektionen Folge einer unzureichenden Immunabwehr von Pathogenen sind.

Das Immunsystem wird in eine angeborene (unspezifische) und adaptive (spezifische) Immunabwehr unterteilt. Die angeborene Immunabwehr ist von Geburt an verfügbar und kann umgehend aktiv werden, während die adaptive Immunabwehr erst durch den Kontakt mit Antigenen entwickelt wird und verzögert reagiert. Für eine effektive Immunabwehr ist ein Zusammenspiel der unspezifischen und spezifischen Immunantwort notwendig (Hoebe et al., 2004).

Zu der angeborenen Immunabwehr gehören unspezifische Mechanismen wie anatomische und physiologische Barrieren, die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen als auch die Phagozytose von Krankheitserregern durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten oder andere phagozytierende Zellen. Ein weiterer Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr ist das Komplementsystem, welches Pathogene lysiert oder für andere Immunzellen markiert (Medzhitov and Janeway, 2000; Levy, 2007).

Die adaptive Immunantwort wird durch B- und T-Lymphozyten vermittelt und zeichnet sich durch eine hohe Antigen-Spezifität und -Diversität aus. Bevor B- und T-Zellen Antigenkontakt hatten, werden sie als naiv bezeichnet. Durch Antigenpräsentation werden die Zellen aktiviert und differenzieren zu Effektorzellen. T-Zellen erkennen das von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentierte Antigen über den T-Zellrezeptor (TCR) und differenzieren daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen oder zu T-Helferzellen. B-Zellen verfügen über einen B-Zellrezeptor, welcher aus spezifischen membrangebundenen Immunglobulinen besteht und binden an lösliche Antigene. Erkennt die B-Zelle über ihren B-Zellrezeptor ein Antigen und erhält zusätzlich ein

kostimulatorisches Signal von einer T-Helferzelle, differenziert sie zu einer Plasmazelle und sezerniert Antikörper derselben Spezifität, wie das membrangebundene Immunglobulin. Ein Charakteristikum der adaptiven Immunantwort ist das Ausbilden von B- und T-Gedächtniszellen. Das immunologische Gedächtnis ermöglicht es dem Organismus im Fall einer Reinfektion mit einer schnelleren und effektiveren Immunantwort zu reagieren (Mackay, 1991; Sallusto et al., 2004).

1.2 Die Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen

Damit Antigene von T-Lymphozyten erkannt werden, müssen sie zuvor über *Major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle präsentiert werden. Das Antigen wird über Phagozytose aufgenommen, prozessiert und auf MHC-Molekülen exprimiert (Trombetta and Mellman, 2005). MHC-I-Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und dienen sowohl dem Schutz der körpereigenen Zellen wie auch der Interaktion mit CD8⁺ T-Zellen. MHC-II-Moleküle werden nur von speziellen APC exprimiert und dienen der Antigenerkennung von CD4⁺ T-Zellen. Je mehr MHC-II-Moleküle eine APC exprimiert, desto höher ist die Aktivierung der interagierenden T-Zellen (Koch et al., 1996). Zur Aktivierung einer T-Zelle durch eine APC ist nicht nur die Antigenpräsentation entscheidend, sondern auch die Kostimulation durch einen kostimulatorischen Liganden. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) werden von APC auf ihrer Oberfläche exprimiert. Um aktiviert zu werden, muss eine naive T-Zelle auf derselben APC sowohl das Antigen als auch das entsprechende kostimulatorische Molekül erkennen (Bachmann et al., 1996; Chambers and Allison, 1999).

Es werden professionelle APC und nicht-professionelle APC unterschieden. Professionelle APC zeigen eine höhere Expression von MHC-II-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen als nicht-professionelle APC. Somit können professionelle APC CD4⁺ T-Zellen stärker aktivieren. Zu den professionellen APC der Leber (LAPC) zählen dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Lebersinusendothelzellen (LSEC) gehören zu den nicht-professionellen APC der Leber (Lohse et al., 1996; Knolle et al., 1998; Diehl et al., 2008).

1.2.1 Aktivierung und Kostimulation von CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Lymphozyten werden über den TCR-Komplex aktiviert, welcher aus dem TCR (α : β -Heterodimer), zwei CD3-Rezeptoren (zwei ϵ -Ketten, eine δ -Kette und eine γ -Kette)

und einem Homodimer von zwei ζ -Ketten besteht. Der TCR erkennt das über MHC-II präsentierte Antigen, kann jedoch an die Zelle kein Signal aussenden, dass ein Antigen gebunden hat. Für diese Signalübertragung sind der CD3-Rezeptor und das ζ -Homodimer verantwortlich. Durch die Interaktion mit einem Antigen-beladenden MHC-II-Molekül erkennt der TCR also seinen Liganden und die $CD4^+$ T-Zelle wird daraufhin durch die Signalübertragung der CD3-Rezeptoren und ζ -Ketten aktiviert. Durch Zugabe eines stimulierenden anti-CD3 Antikörpers kann die $CD4^+$ T-Zelle auch antigen-unabhängig aktiviert werden. Während die Stimulation durch eine MHC-II-vermittelte Immunantwort von der Menge des zur Verfügung stehenden Antigens und der Anzahl der MHC-II-Moleküle auf der präsentierenden APC abhängt, ist die Stärke der Aktivierung durch einen anti-CD3 Antikörper davon unabhängig (Smith-Garvin et al., 2009).

Die Kostimulation von $CD4^+$ T-Zellen erfolgt über die Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den APC mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf der Zelloberfläche von naiven $CD4^+$ T-Zellen. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass naive $CD4^+$ T-Zellen nicht von Zellen aktiviert werden, die nur zufällig das Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Wird der CD28-Rezeptor einer T-Zelle stimuliert, wird das Überleben der $CD4^+$ T-Zelle gefördert und die Signalübertragung führt zu einer gesteigerten Proliferation und Zytokinproduktion. Auch kann eine Stimulation des CD28-Rezeptors eine Verstärkung des TCR-Signals induzieren. Durch Zugabe eines stimulierenden anti-CD28 Antikörpers kann ein kostimulatorisches Signal ausgelöst werden, welches unabhängig von der aktivierenden APC ist (Chambers and Allison, 1999).

Ebenso wie kostimulierende Rezeptoren von Lymphozyten exprimiert werden, werden auch koinhibitorische Rezeptoren exprimiert. *Programmed death-1* (PD-1) ist ein koinhibitorischer Rezeptor der auf aktivierten T-Zellen konstitutiv exprimiert wird und mit *programmed death-ligand-1* (PD-L1) und *programmed death-ligand-2* (PD-L2) interagiert. PD-L1 wird auf einer Vielzahl von Zellen vorübergehend exprimiert und die Induktion der PD-L2-Expression auf APC erfolgt durch entzündliche Prozesse. Durch die Liganden-Bindung an den PD-1-Rezeptor wird die Signalübertragung des TCR und die damit verbundene T-Zell-Antwort inhibiert (Iwai et al., 2003).

1.2.2 Gewebespezifische Migration und Zytokinexpression von CD4⁺ T-Zellen

T-Zellen zirkulieren kontinuierlich aus der Blutbahn in periphere Gewebe und über die Lymphabflusswege zurück in die Blutbahn (Gowans, 1966; Sprent, 1973). Die Migration der T-Zellen in bestimmte Organe wird durch die Expression von *Homing*-Rezeptoren reguliert (Butcher et al., 1999).

Ob eine Zelle die Immunantwort in Richtung Toleranz oder Inflammation beeinflusst, wird hingegen durch ihre funktionelle Subpopulation und die Expression von pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen bestimmt (Shevach, 2009; Schmitt and Ueno, 2015). Das Zusammenspiel der Expression von spezifischen *Homing*-Rezeptoren und Zytokinen ist demnach von zentraler Bedeutung für die Immunüberwachung und den Verlauf von Infektionen. Sowohl die Expression von *Homing*-Rezeptoren als auch die Zytokinexpression wird durch die aktivierende APC und das umgebende Mikromilieu beeinflusst (Rothoeft et al., 2003; Thomson and Knolle, 2010; Bakdash et al., 2014).

Für die CD4⁺ T-Zell-Migration in den Darm ist die Expression von α 4 β 7-Integrin und CC Chemokinrezeptor 9 (CCR9) essentiell. Die Expression der Darm-*Homing*-Rezeptoren wird durch Retinolsäure reguliert. Insbesondere die CCR9-Expression ist stark Retinolsäure-abhängig, während für α 4 β 7-Integrin auch eine geringe Retinolsäure-unabhängige Expression beschrieben ist (Sigmundsdottir and Butcher, 2008). Die Expression der Darm-*Homing*-Moleküle ist typisch für CD4⁺ T-Zellen, die in mesenterialen Lymphknoten aktiviert wurden, aber auch für LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurde eine Expression von α 4 β 7-Integrin und CCR9 nachgewiesen (Campbell and Butcher, 2002; Svensson et al., 2002; Johansson-Lindbom et al., 2005; Stenstad et al., 2006; Neumann et al., 2012).

Die T-Zell-Migration in die Haut wird durch die Expression des *Homing*-Rezeptors P-Selektin-Ligand (P-Lig) vermittelt. Die P-Lig-Expression ist Vitamin D3 abhängig. Vitamin D3 wird in der Epidermis mithilfe von UV-Strahlung gebildet, in der Leber zu 25(OH)Vitamin D3 umgewandelt und in der Niere zur aktiven Form metabolisiert (Sigmundsdottir and Butcher, 2008). Für Makrophagen und dendritische Zellen wurde gezeigt, dass sie Vitamin D3 metabolisieren und dadurch eine T-Zell-Migration in die Haut induzieren (Sigmundsdottir et al., 2007). Eine P-Lig-Expression ist typisch für CD4⁺ T-Zellen, die in peripheren Lymphknoten aktiviert wurden (Campbell and Butcher, 2002).

Die Expression des Leukozyten-Selektins (L-Selektin) CD62L ist für die T-Zell-Migration in die Lymphknoten notwendig (Gallatin et al., 1983). CD62L wird auf den meisten CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Naive CD4⁺ T-Zellen zeigen eine sehr hohe Expression von L-Selektin, während die Expression dieses Selektins bei Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen herunter reguliert ist (Bradley et al., 1994). Auch für LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurde eine starke CD62L-Expression beschrieben (Böttcher et al., 2013).

In Abhängigkeit vom Mikromilieu und der aktivierenden APC-Population können CD4⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Subpopulationen differenzieren (Schmitt and Ueno, 2015). Th1-Zellen exprimieren die proinflammatorischen Zytokine Interferon(IFN) γ , Interleukin (IL)-2 und Tumornekrosefaktor(TNF)- α . Durch Expression dieser proinflammatorischen Zytokine lösen Th1-Zellen eine Immunantwort aus und begünstigen eine Inflammation (Mosmann and Coffman, 1989; Dinarello, 2000). Th2-Zellen zeigen hingegen eine Expression der Zytokine IL-4 und IL-10 und induzieren eine antiinflammatorische T-Zell-Antwort (Mosmann and Coffman, 1989; Saraiva and O'Garra, 2010). Regulatorische T-Zellen (T_{regs}) exprimieren die Interleukin 2 Rezeptor α -Kette CD25 sowie den Transkriptionsfaktor *forkheas box* protein 3 FoxP3. Sie wirken antiinflammatorisch und führen zu einer Regulation der Immunantwort (Billerbeck et al., 2007).

1.3 Die Leber

Die Leber ist durch ihren einzigartigen Feinbau in ihrer Funktion als Stoffwechselorgan aber auch in ihrer immunologischen Funktion geprägt. Sie besteht aus einem rechten und einem linken Leberlappen, die zusammen acht Segmente ergeben. Diese Segmente sind wiederum in kleine Leberläppchen (Lobuli) gegliedert. Charakteristisch für den Aufbau der Leber ist ihre duale Blutzufuhr. Aus der Leberarterie wird sie mit sauerstoffreichem Blut aus dem Kreislauf versorgt und die Pfortader führt das nährstoffreiche Blut aus dem Verdauungstrakt in die Leber. Das venöse und arterielle Blut der beiden Gefäße vereinigt sich in einem Netzwerk aus Kapillaren, den Lebersinusoiden. Die Lebersinusoiden sind durch schmale Hepatozytenbälkchen voneinander getrennt und werden von LSEC ausgekleidet. Zwischen den Hepatozyten, die das Parenchym der Leber bilden, und den LSEC liegt der Disse'sche Raum, in dem sich die Ito-Zellen befinden, welche als Lipid- und Vitamin A-Speicher dienen (Blomhoff and Wake, 1991). Nachdem das Blut die Sinusoide durchquert hat, verlässt es die Leber über die Lebervene und wird dem systemischen Kreislauf zugeführt.

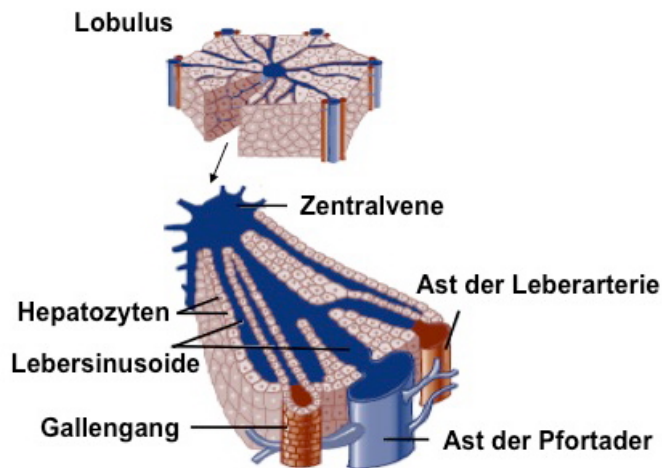


Abb. 1: Aufbau eines Leberlobulus. Das Blut der Pfortader und der Leberarterie vereinigt sich in den Lebersinusoiden. Nach der Passage durch das Kapillarnetz der Sinusoide verlässt das Blut die Leber über die Lebervene. Modifiziert nach Cunningham et al. (Cunningham and Van Horn, 2003).

Neben ihrer Aufgabe als wichtigstes Stoffwechselorgan hat die Leber zahlreiche Funktionen im Immunsystem. Im Rahmen der angeborenen Immunabwehr ist sie an der Produktion von Akute-Phase-Proteinen beteiligt. Auch die Synthese der Proteine für das Komplementsystem findet in der Leber statt. Durch die Interaktion mit T-Lymphozyten hat die Leber Anteil an der Regulation der adaptiven Immunabwehr und trägt beispielsweise durch die Deletion aktivierter T-Zellen zur Toleranzinduktion bei (Huang et al., 1994; Parker and Picut, 2005).

1.3.1 Das Lebersinusendothel

Das Endothel der Leber unterscheidet sich morphologisch und phänotypisch von den vaskulären Endothelien anderer Gewebe. Es liegen keine Basalmembran oder *Tight junctions* zwischen den LSEC und den Hepatozyten, sondern die Trennung erfolgt allein durch den Disse'schen Raum (Smedsrød et al., 1994). Durch die in Clustern angeordneten *fenestra* kommt es zu einem intensiven Stoffaustausch zwischen LSEC und Hepatozyten (Wisse, 1970).

Im Lumen der Lebersinusoiden sind hauptsächlich Kupffer-Zellen angesiedelt, die Leber-residenten Makrophagen. Auch dendritische Zellen und Lymphozyten befinden sich in den Sinusoiden (Blouin et al., 1977; Doherty and O'Farrelly, 2000; Lau and Thomson, 2003; Klugewitz et al., 2004). Durch den dualen Blutfluss, der durch die Lebersinusoiden fließt, kommt es zur Interaktion zwischen den Leber-ansässigen APC und im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus dem Gastrointestinaltrakt sowie dem systemischen Kreislauf. Diese Interaktion wird durch das sehr schmale Lumen der Sinusoide und die

langsame Flussgeschwindigkeit des Blutes gefördert (Bertolino et al., 2002; Knolle and Limmer, 2003).

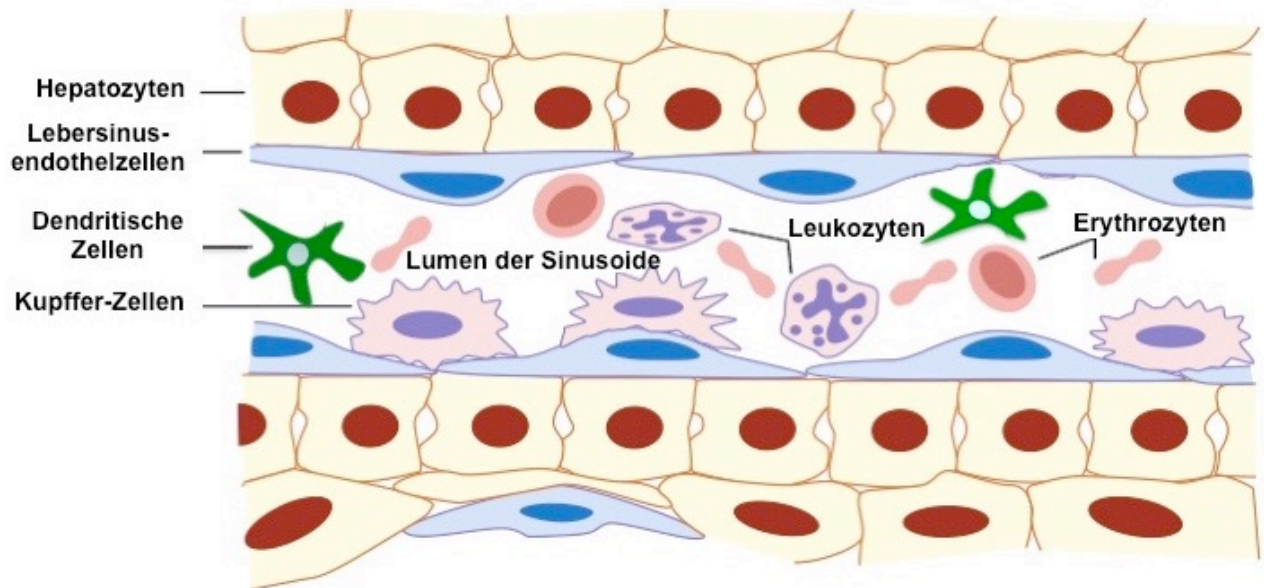


Abb. 2: Aufbau der Lebersinusoiden. Querschnitt eines Lebersinusoids mit Darstellung und Lokalisation der Zellpopulationen. Modifiziert nach Lalor and Adams (Lalor and Adams, 2002).

CD4⁺ T-Zellen, die durch die nicht-professionelle APC-Population der LSEC aktiviert wurden, werden in der vorliegenden Arbeit als T_{LSEC} bezeichnet. Zum Phänotyp der T_{LSEC} wurden bereits zahlreiche Studien veröffentlicht. Es wurde gezeigt, dass T_{LSEC} keine proinflammatorischen Zytokine exprimieren und somit zur Toleranzinduktion in der Leber beitragen (Knolle et al., 1999; Kruse et al., 2009). Weiterhin ist bekannt, dass T_{LSEC} die Darm-*Homing*-Rezeptoren $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 exprimieren, während P-Lig, ein *Homing*-Rezeptor für die Haut und entzündetes Gewebe, nur wenig exprimiert wird (Neumann et al., 2012).

1.3.2 Leber-residente professionelle APC

Die professionellen APC der Leber setzen sich aus Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen zusammen. Kupffer-Zellen, die ansässigen Makrophagen der Leber, stellen die Hauptpopulation der LAPC dar (Racanelli and Rehermann, 2006). Sie befinden sich in den Portalfeldern der Leber und den Lebersinusoiden (MacPhee et al., 1992, 1995). Auch dendritische Zellen sind in den Portalfeldern und den Sinusoiden zu finden (Prickett et al., 1988; Woo et al., 1994; Thomson and Knolle, 2010). B-Zellen sind hauptsächlich in den Lebersinusoiden, sowie im Parenchym und den Portalfeldern lokalisiert (Doherty and O'Farrelly, 2000; Foureau et al., 2015). Demnach können die

professionellen LAPC mit den nicht-professionellen LSEC und passierenden CD4⁺ T-Zellen in den Lebersinusoiden interagieren.

LAPC unterscheiden sich von den APC-Populationen anderer Gewebe durch ihren tolerogenen Phänotyp (Bertolino et al., 2002; Lau et al., 2003; Carambia and Herkel, 2010; Jenne and Kubes, 2013). Kupffer-Zellen tragen unter physiologischen Bedingungen zur IL-10 Synthese bei und führen so zur Toleranzinduktion (Erhardt et al., 2007). Auch können Kupffer-Zellen die Aktivierung von bereits aktivierten T-Zellen supprimieren (You et al., 2008) und sind an der Toleranzinduktion durch T_{regs} beteiligt (Wiegard et al., 2005; Breous et al., 2009). Dendritische Zellen wirken tolerogen, indem sie wenig MHC-II und kostimulatorische Moleküle, dafür aber verstärkt koinhibitorische Moleküle exprimieren und so zur Induktion von T_{regs} führen (Lau et al., 2003; De Creus et al., 2005; Matta et al., 2012). Für B-Zellen ist beschrieben, dass sie im Rahmen einer primären biliären Cholangitis zur tolerogenen Immunantwort beitragen können (Moritoki et al., 2009; Dhirapong et al., 2011).

Die CD4⁺ T-Zellen die in dieser Arbeit durch LAPC aktiviert wurden, werden nachfolgend als T_{LAPC} bezeichnet.

1.3.3 Toleranzinduktion in der Leber

Die vielfältigen immunologischen Funktionen der Leber verlangen eine lokale Regulation der Immunantwort. Pathogene Mikroorganismen müssen beseitigt werden, während gastrointestinale Nahrungsmittelantigene toleriert werden sollen (Knolle and Gerken, 2000). Zu den Toleranz-induzierenden Mechanismen der Leber gehören die Deletion aktivierter T-Zellen (Huang et al., 1994; Parker and Picut, 2005) und die Induktion der oralen und peripheren Toleranz. Die orale Toleranz zeichnet sich dadurch aus, dass Nahrungsmittelantigene aus dem Magen-Darm-Trakt als ungefährlich erkannt und toleriert werden (Callery et al., 1989). Unter peripherer Toleranz versteht man die Toleranzinduktion reifer Lymphozyten, welche die zentralen lymphatischen Organe verlassen haben. Die Relevanz der Leber-induzierten Toleranz wurde beispielsweise im Transplantationsmodell gezeigt. Eine Leber wird im Vergleich zu anderen Organtransplantaten besser akzeptiert und auch die Toleranz von weiteren Organen steigt, wenn diese gleichzeitig mit einer Leber transplantiert werden (Rasmussen et al., 1995; Calne, 2000).

Die Toleranzinduktion in der Leber wird nicht nur durch LSEC und die ansässigen

professionellen APC induziert, sondern auch durch das einzigartige Mikromilieu in der Leber bestimmt. Wichtige Zytokine, die zum tolerogenen Mikromilieu der Leber beitragen, sind IL-10 und *transforming growth factor* (TGF)- β . An der Expression dieser Zytokine sind LSEC, Kupffer-Zellen, dendritische Zellen und Hepatozyten beteiligt (Doherty and O'Farrelly, 2001; Thomson and Knolle, 2010). Während Kupffer-Zellen IL-10 und TGF- β konstitutiv exprimieren und die Expression Endotoxin-abhängig nach oben regulieren, exprimieren Hepatozyten IL-10 abhängig von der auto- und parakrinen TGF- β -Sekretion (Bissell et al., 1995; Thomson and Lu, 1999; Knolle and Gerken, 2000). IL-10 führt durch die Inhibition von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen auf APC zur Toleranzinduktion und spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion von T_{regs} (Asseman et al., 1999; Moore et al., 2001). TGF- β trägt durch die Inhibition der T-Zell-Proliferation (Delisle et al., 2013) sowie durch Induktion von Apoptose in den T-Zellen (Weller et al., 1994) zur Toleranz bei. Auch ist TGF- β entscheidend an der Induktion der oralen Toleranz sowie der Induktion von T_{regs} beteiligt (Weiner, 1994).

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

LSEC sind eine Population von hepatischen nicht-professionellen APC, die maßgeblich zur Toleranzinduktion in der Leber beitragen. Durch LSEC aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimieren keine proinflammatorischen Zytokine und wirken als regulatorische T-Zellen. Sie migrieren sowohl in die Leber als auch in den Darm und können dort Immunantworten modulieren. In den Lebersinusoiden befinden sich neben den LSEC auch die professionelle LAPC. Deshalb können durch die Leber zirkulierende CD4⁺ T-Zellen sowohl durch LSEC als auch durch LAPC aktiviert werden, wobei der daraus resultierende T-Zell-Phänotyp unbekannt ist. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu charakterisieren. Dazu sollte die T-Zell-Aktivierung sowie die Expression bestimmter Zytokine und *Homing*-Rezeptoren untersucht werden. Folgende Fragestellungen sollten im ersten Abschnitt dieser Arbeit *in vitro* untersucht werden:

- Welchen Phänotyp zeigen LAPC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen?
- Welcher Phänotyp wird in CD4⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger Anwesenheit von LSEC und LAPC induziert?

Der Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen wird durch die Interaktion mit lokalen APC und das umgebende Mikromilieu bestimmt. Die Mechanismen, die den Phänotyp von Leber-

aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinflussen sind noch nicht vollständig geklärt. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde folgende Frage untersucht:

- Über welche Mechanismen wird der in Teil 1 der Arbeit beschriebene Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen induziert?

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zum Verständnis der Leber-induzierten Modulation von Immunantworten beitragen.

2 Methodik

2.1 Versuchstiere

Die Tierhaltung aller Versuchstiere entsprach spezifisch pathogenfreien Bedingungen und den nationalen Richtlinien. Die Tötung der Tiere wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (Berlin) unter der Tötungsnummer T0183/07 genehmigt. Die Tiere wurden per Isofluran betäubt und anschließend durch Luxation der Halswirbelsäule getötet.

Der Wildtyp (WT)-Mausstamm C57BL/6 (H-2^b) wurde von Charles River (Sulzfeld) oder aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Berlin bezogen. Der MHC-II^{-/-} (MHC-II-defizient)-Stamm ABBN5-M (H-2^b), dessen Zellen keine MHC-II-Moleküle exprimieren, wurde von Taconic Germantown (NY, USA) erworben (Grusby et al., 1991). Vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin) wurden Ovalbumin-T-Zell-Rezeptor (OVA-TCR) transgene Mäuse des Stammes OT2xB6/PL (H-2^b) bezogen (Barnden et al., 1998). Der TCR dieser Mäuse erkennt das OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid.

2.2 Geräte

Tab. 1: Verwendete Geräte mit Hersteller und Firmensitz

Gerät	Firmensitz, Ort
AxioCam MRc	Carl Zeiss MicroImaging, Heidelberg
CO ₂ -Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Inkubationsschüttler TH 25	Edmund Bühler, Hechingen
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Helmut Hund, Wetzlar
Sterilbank HERAsafe®	Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Vakuum-Membranpumpe	Lactan, Graz, A
Vortex Mixer	Th. Geyer, Berlin
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Langenselbold

Zentrifuge Heraeus Megafuge [®] 2.0	Kendro Laboratory Product, Hanau
Zentrifuge Multifuge [®] 1S-R	ThermoScientific, Langenselbold

2.3 Materialien

Tab. 2: Verwendete Materialien mit Hersteller und Firmensitz

Material	Firmensitz, Ort
Einmal-Pipetten 5, 10, 25 ml steril	BD, Heidelberg
Einmal-Spritzen und -Kanülen	BD, Heidelberg
Entsorgungsbeutel	Carl Roth, Karlsruhe
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
Falcon-Tube 15, 50 ml	BD, Heidelberg
Filterpipettenspitzen 1000 µl	NerbePlus, Winsen/Luhe
Handschuhe	VWR, Darmstadt
<i>magnetic cell separation</i> (MACS)- Magneten, -Säulen, -Ständer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Präseparationsfilter	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Nycodenzröhrchen	Greiner Bioone, Frickenhausen
Petrischalen	Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zellkulturplatten	Corning Costar oder Nunc, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Zellsieb (100 µm Nylon)	BD, Heidelberg

2.4 Reagenzien

Tab. 3: Verwendete Reagenzien mit Hersteller und Firmensitz

Reagenz	Firmensitz, Ort
Anti-CD3 mab	BD, Heidelberg
Anti-CD28 mab	BD, Heidelberg
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemi, Steinheim
5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester (CFSE)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Diamidinophenylindol (DAPI)	Roche Pharma, Grenzach-Whyhlen
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dulbesso's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin, mit Natrium-Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	J.T. Baker, Mallinckrodt-Deventer, NL
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS flow	Beckton Dickinson
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeaktiviert (30 min. bei 56°)	Linaris, Wertheim
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Gelatine (2%)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Hank's BSS (Hanks balanced salt solution, HBSS) mit Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen	PAA Laboratories, Pasching, A

Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer-Lösung (HEPES: 1M)	Biochrom AG, Berlin
Ionomycin (IM)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
LE 540	Wako, Richmond, VA, USA
MicroBeads, MultisortBeads und Release Reagent	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung (NEAA: 10 mM))	Invitrogen, Karlsruhe
Nycodenz	Progen Biotechnik, Heidelberg
Ova-Peptid (Sequenz: ³²³ -ISQAVHAAHAEINEAGR ⁻³³⁹)	Institut für Biochemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KgaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10000 U /10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Percoll	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, S
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
1xPhosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered salt solution, PBS)	PAA Laboratories, Pasching, A
10xPBS	PAA Laboratories, Pasching, A
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) mit L-Glutamin, mit HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypanblau (4%)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

2.5 Puffer und Medien

Tab. 4: Verwendete Puffer und Medien mit ihrer Zusammensetzung

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH 7,5)	10 mM KHCO ₃ , 155 mM NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA in Aqua dest. (pH 7,5)
Komplett-DMEM (cDMEM)	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Natrium-Pyruvat, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) MEM NEAA, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Komplett-RPMI (cRPMI)	RPMI 1640 mit GlutaMAX TM und HEPES, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Natrium-Pyruvat, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Nycodenz-Lösung (30%)	50 % (v/v) NycoPrep TM Universal in Aqua dest.
Paraformaldehydlösung	1xPBS, 2 g/l PFA (pH 7)
PBS/BSA	1xPBS, 2 g/l BSA
Percoll-Lösung (35%)	31,5 % (v/v) Percoll, 3,5 % (v/v) 10xPBS, 65 % 1xPBS
P-Lig Färbe-Puffer	1xHBSS, 1 % (v/v) HEPES, 2 % (v/v) BSA
Saponin-Puffer	1xPBS, 5 g/l Saponin, 2 g/l BSA
Verdaumedium (VM)	RPMI 1640 mit GlutaMAX TM und HEPES, 5 % (v/v) FCS, 0,05 % (v/v) Collagenase Typ IV, 0,002 % (v/v) DNase I
Waschmedium (WM)	RPMI, 5 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Natrium-Pyruvat, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

2. 6 Antikörper und MicroBeads

Tab. 5: Am Durchflusszytometer verwendete Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission (nm)
Brilliant Violet 421	407	421
AlexaFluor 647	650	668
Allophycocyanin (APC)	650	660
Indodicarbocyanin (Cy5)	650	670
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495	520
R-phycoerythrin (PE)	564	575
PE-Cy7	496	785
Propidiumjodid (PI)	550	650
V450 eFluor	404	448
V500 Am Cyan	457	491

Tab. 6: Verwendete Antikörper für die Fluoreszenzmarkierung von Zellen

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
Maus $\alpha 4\beta 7$ -Integrin	PE	DATK32	Ratte IgG2a	BD, Heidelberg	1:200
Maus CCR9	Alexa Fluor 647	CW-1.2	Maus IgG2b	R&D Systems, Wiesbaden	1:500
Maus CD4	APC	GK1.5	Ratte IgG2b	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:1000
Maus CD4	V500 AmCyan	L3T4	Ratte IgG2a	BD, Heidelberg	1:800
Maus CD11c	Brilliant Violet (BV) 421	N418	Armenian Hamster IgG	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:100

Maus CD16/CD32		2.4G2	Ratte IgG2a	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:200
Maus CD19	BV	6D5	Ratte IgG2a	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:100
Maus CD25	PE-Cy7	PC61.5	Ratte IgG1	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:400
Maus CD45	APC	30-F11	Ratte IgG2b	BioLegend, San Diego, CA, USA	1 :000
Maus CD62L	FITC	MEL-14	Ratte IgG2a	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:1500
Maus CD62L	APC	MEL-14	Ratte IgG2a	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:1000
Maus CD90.1	V450 eFluor	OX-7	Maus IgG1	BD, Heidelberg	1:1000
Maus CD90.2	V450 eFluor	01.02.53	Ratte IgG2a	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:1000
Maus CD146	FITC PE	ME-9F1	Ratte IgG2a	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:800 1:700
Maus IL-2	PE	JES65H4	Ratte IgG2b	BD, Heidelberg	1:200
Maus IL-4	PE	11B11	Ratte IgG1	BD, Heidelberg	1:50

Maus IL-10	APC	JES516E3	Ratte IgG2b	BD, Heidelberg	1:50
Maus INF- γ	APC	XMG1.2	Ratte IgG1	BD, Heidelberg	1:200
Maus F4/80	PE	BM8	Ratte IgG2a	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:500
Maus MHC-II	FITC	MS/114.152	Ratte IgG2b	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:2000
Maus P-Selektin/ Human IgG Fc Chimäre				BD, Heidelberg	1:200
Maus TNF- α	PE-Cy-7	MP6-XT22	Ratte IgG1	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:100
Mensch IgG	PE		Affe, humanes Fc-Fragment	Dianova, Hamburg	1:300
Ratte IgG				Dianova, Hamburg	1:100

Tab. 7: Verwendete Antikörper für die histologischen Färbungen

Spezifität	Klon	Hersteller	Verdünnung
Armenischer Hamster anti-Maus CD11c-Antikörper	N418	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:100
Biotinylierter Ratte anti-Maus B220	RA3-6B2	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:200
Kaninchen anti-Ratte Sekundärantikörper		Invitrogen, Karlsruhe	1:200

Ratte anti-Maus F4/80	BM8	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:100
Ziege anti- armenischer Hamster- Sekundärantikörper		Invitrogen, Karlsruhe	1:100

Tab. 8: Verwendete MicroBeads für die Isolation von Zellen

MicroBeads	Hersteller	Verdünnung
anti-APC Multi Sort (MS)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach	1:10/1:25
anti-CD62L	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach	1:50
anti-FITC	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach	1:5/1:10/1:35

2.7 Methoden

2.7.1 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung

Die verwendeten Zellpopulationen wurden mit Hilfe der magnetisch-aktivierten Zellsortierung (*magnetic cell separation*, MACS) isoliert. Mit dieser Methode können Zellen anhand ihrer zellspezifisch exprimierten Oberflächenmoleküle magnetisch markiert und angereichert werden. Die Markierung erfolgte entweder anhand spezifischer Fluorochrom-gekoppelter Antikörper, welche anschließend an paramagnetische Partikel (MicroBeads) gekoppelt wurden oder durch eine direkte Bindung der MicroBeads an die spezifischen Oberflächenmoleküle. Für die Antikörper-Inkubation wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^8 /ml in PBS/BSA aufgenommen und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit den MicroBeads erfolgte in einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml für 15 Minuten bei 4°C. Nach der Inkubation mit den MicroBeads wurde die Zellsuspension auf eine in einem Magnetfeld befindliche ferromagnetische Säule gegeben. Die zuvor magnetisch markierten Zellen wurden auf der Säule zurück gehalten, während die unmarkierten Zellen durch dreimaliges Spülen mit PBS/BSA ausgewaschen wurden. Nach der Entfernung des

Magnetfeldes konnte die markierte Zellpopulation von der Säule eluiert werden.

Je nach Versuchsplanung wurde eine positive Selektion oder eine Depletion durchgeführt. Bei der positiven Selektion wurden Oberflächenmoleküle der zu isolierenden Zellen magnetisch markiert, während bei der Depletion die Zellen markiert wurden, die aus der zu isolierenden Zellpopulation entfernt werden sollten.

War eine zweite magnetische Zellsortierung mit einer zuvor markierten Zellenpopulation geplant, wurden die MicroBeads mittels Multisort-Release-Reagent von den Zellen entfernt. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von $2,5 \times 10^7$ /ml aufgenommen und mit 35 µg/ml Multisort-Release-Reagent inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 4°C und für 20 min bei Raumtemperatur. Um die abgetrennten MicroBeads aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde diese in einem Magnetfeld auf eine ferromagnetische Säule gegeben. Während die magnetischen MicroBeads auf der Säule zurückgehalten wurden, konnten die unmarkierten Zellen aufgefangen und anschließend erneut mit MicroBeads markiert werden (Miltenyi et al., 1990).

2.7.2 Ex vivo Isolation von LSEC

Zur Isolierung der LSEC wurde die Gallenblase entfernt, die Leber über die *Vena portae* mit 2-3 ml VM gespült und anschließend entnommen. Die Lebern wurden mit Schere und Pinzette zerkleinert und für 15 min bei 37°C und 200 rpm (*rounds per minute*) auf einem Schüttler in VM inkubiert. Zur Vereinzelnung der Zellsuspension wurde das Zellgemisch in WM aufgenommen, durch ein Metallsieb gepresst und anschließend über ein Zellsieb (Porendurchmesser 100 µm) gegeben. Um Gewebekomponenten von der Einzelzellsuspension zu trennen, wurden die Proben mit WM aufgefüllt und zweimal für 5 min bei 22°C und 300 rpm zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für 8 min bei 22°C und 1700 rpm zentrifugiert und anschließend 5 min mit Erythrozyten-Lyse-Puffer auf Eis inkubiert. Die Lyse-Reaktion wurde durch die Zugabe von WM gestoppt und die lysierten Erythrozyten durch Zentrifugation (8 min, 22°C, 1700 rpm) entfernt.

Nicht-parenchymale Zellen (NPC) wurden mittels Nycodenz-Gradienten von den Hepatozyten getrennt. Pro Leber wurde 1 ml Pelletvolumen in 6,5 ml einer 30 %igen Nycodenzlösung aufgenommen, woraus eine 26 %ige Nycodenzlösung (Dichte: 1,136 g/l) resultierte. Es wurden 2 ml Waschmedium pro Gradient vorgelegt und mit 7,5 ml der erhaltenen Zell-Nycodenz-Suspension unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgte ohne Bremse für 20 min bei 22°C und 2500 rpm. Anschließend wurden die NPC aus der

entstandenen Interphase geerntet und das Nycodenz mit PBS/BSA ausgewaschen.

Die weitere Isolierung der LSEC erfolgte mithilfe der magnetisch-aktivierten Zellsortierung. Um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an Fc-Rezeptoren der Zellen zu vermeiden, wurden die NPC mit 20 µg/ml anti-Fcγ-Rezeptor II/III Antikörper (anti-Maus CD16/CD32) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem LSEC-spezifischen anti-CD146-FITC Antikörper (Schrage et al., 2008) markiert, gewaschen und danach erfolgte die Kopplung des verwendeten Antikörpers an anti-FITC-MicroBeads. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen MicroBeads wurden die CD146⁺ LSEC mittels MACS isoliert.

Die Reinheit der Zellen wurde am Durchflusszytometer überprüft und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Zum Zählen wurden die Zellen in Trypanblau aufgenommen. Dieses Vorgehen ermöglichte eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, da Trypanblau nicht von lebenden Zellen aufgenommen wird, so dass diese unter dem Mikroskop auf dunklem Hintergrund hell erscheinen, während die toten Zellen dunkel angefärbt werden. Die Reinheit der LSEC lag bei maximal 97 % (Abb. 3). Aus einer Leber konnten etwa 5×10^6 LSEC isoliert werden.

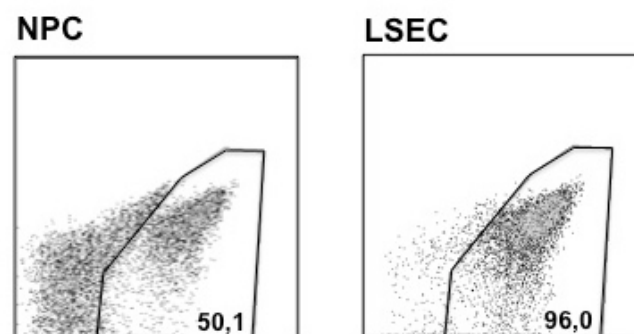


Abb. 3. Reinheit der isolierten LSEC. LSEC wurden mit einem anti-CD146 Antikörper markiert und mittels MACS aus NPC isoliert. Dargestellt ist der am Durchflusszytometer analysierte prozentuale Anteil der CD146⁺ LSEC vor und nach der MACS-Isolierung. Die *Dot Plots* sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente.

Die isolierten LSEC wurden in cDMEM aufgenommen und über Nacht auf einer gelatinebeschichteten 24-Well-Platte kultiviert. Es wurden 1×10^6 LSEC/ml DMEM ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Inkubator. Am folgenden Tag hatten die adhären Zellen einen Monolayer gebildet und die nicht adhären Zellen wurden abgewaschen. Die Reinheit der LSEC betrug nach der Inkubation über Nacht über 99 % (Neumann et al., 2012).

2.7.3 Ex vivo Isolation von LAPC

Zur Isolierung der LAPC wurden Lebern aus C57BL/6-Mäusen freigelegt und nach der Entfernung der Gallenblase ungespült entnommen. Daraufhin wurden die Lebern in VM überführt, mit Schere und Pinzette zerkleinert und für 25 min bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde in WM aufgenommen, durch ein Metallsieb gepresst und über ein Zellsieb (Porendurchmesser 100 µm) gegeben. Anschließend wurden die vereinzelt Zellen zweimal für 5 min bei 22°C und 300 rpm zentrifugiert, um überflüssige Gewebsbestandteile von der Zellsuspension zu trennen. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde für 8 min bei 22°C und 1700 rpm zentrifugiert und das Pellet in 10 ml PBS/BSA pro Leber aufgenommen.

Zur Isolierung der mononukleären Zellen (MNC) wurde ein Percoll-Gradient vorbereitet. Hierzu wurden 10 ml einer 35 %igen Percoll-Lösung in ein 50 ml Falcon-Tube vorgegeben und mit 10 ml der zuvor hergestellten Zell-PBS/BSA-Suspension überschichtet. Die Gradienten-Zentrifugation erfolgte ohne Bremse für 30 min bei 22°C und 2500 rpm. Anschließend wurden die im Pellet enthaltenen MNC zweimal mit PBS/BSA gewaschen und für 8 min bei 4°C und 1700 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden 5 min auf Eis mit Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert und die Lyse-Reaktion wurde durch Zugabe von PBS/BSA gestoppt. Die lysierten Erythrozyten wurden mittels Zentrifugation (8 min, 4°C, 1300 rpm) ausgewaschen.

Zur weiteren Isolation von LAPC wurden die spezifischen Oberflächenmoleküle CD45 und MHC-II mit Antikörpern und MicroBeads markiert. CD45 ist ein Marker für Zellen des hämatopoetischen Systems, mit Ausnahme von Erythrozyten. MHC-II wird von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Die Zellen wurden zunächst mit 20 µg/ml anti-Fcγ-Rezeptor II/III Antikörper inkubiert und daraufhin erfolgte die Färbung mit anti-CD45-APC und anti-MHC-II-FITC Antikörpern. Die nicht gebundenen Antikörper wurden ausgewaschen und die Zellen mit anti-APC-*Multisort*-MicroBeads inkubiert. Nachdem die nicht gebundenen MicroBeads ausgewaschen wurden, erfolgte die Isolation der CD45^{high} Zellen mittels MACS. Die Reinheit der CD45^{high} Zellen lag bei maximal 99 % (Abb.4).

Im nächsten Schritt wurden die CD45^{high} Zellen zur Abtrennung der MicroBeads mit *Multisort-Release-Reagent* inkubiert und anschließend die abgetrennten MicroBeads per MACS aus der Zellsuspension entfernt. Anschließend wurden die MHC-II⁺ CD45^{high} Zellen mit anti-FITC-MicroBeads markiert. Die nicht gebundenen MicroBeads wurden

ausgewaschen und die MHC-II⁺ CD45^{high} LAPC per MACS isoliert. Die Zellen wurden meistens über eine zweite Säule gegeben, da die Reinheit nach der Trennung durch die erste Säule nicht ausreichend war. Die Zellen wurden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und die Reinheit am Durchflusszytometer überprüft. Es wurde eine Reinheit von maximal 97 % erreicht (Abb.4). Aus einer Leber wurden etwa 3×10^5 LAPC isoliert.

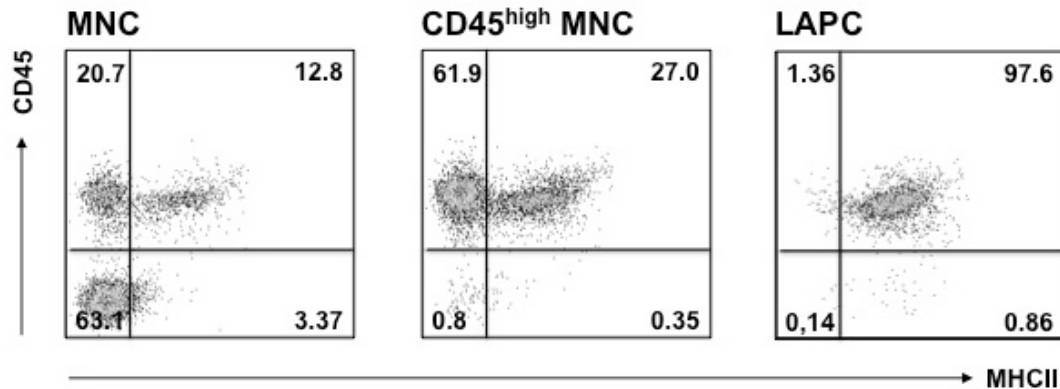


Abb. 4. Reinheit der isolierten LAPC. LAPC wurden aus zuvor mit anti-CD45 und anti-MHC-II markierten MNC per MACS isoliert. (A) Am Durchflusszytometer wurde der prozentuale Anteil der CD45^{high} MHC-II⁺ Zellen vor und nach jeder Isolation analysiert. Angegeben sind repräsentative *Dot Plots* für mindestens vier unabhängige Experimente.

Um die Zusammensetzung der LAPC zu ermitteln, wurden dendritische Zellen (anti-CD11c Antikörper), Makrophagen (anti-F4/80 Antikörper) und B-Zellen (anti-CD19 Antikörper) gefärbt und der prozentuale Anteil am Durchflusszytometer ermittelt (siehe 3.1.2).

2.7.4 *Ex vivo* Isolation von professionellen Milz-APC (*spleen-derived antigen presenting cells, SAPC*)

Zur Isolierung von Milz-APC wurden Milz und Lymphknoten aus OT2xB6/PL-Mäusen verwendet. Zunächst wurden die zervikalen, mandibulären, axillären und inguinalen Lymphknoten freigelegt und entnommen. Anschließend wurde das Peritoneum geöffnet und die mesenterialen, iliakalen und hepatischen Lymphknoten so wie die Milz entnommen. Die entnommenen Organe wurden in PBS/BSA aufgenommen und zur Vereinzelung durch ein Metallsieb gepresst. Daraufhin wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb (Porendurchmesser 100 μ m) gegeben und bei 1300 rpm und 4°C für 8 min zentrifugiert. In einem weiteren Schritt wurden die Zellen 5 min auf Eis mit Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Die Erythrozyten-Lyse-Reaktion wurde durch Zugabe von PBS/BSA gestoppt und die Zellen erneut zentrifugiert.

Des Weiteren wurden die Zellen mit 20 µg/ml anti-Fcγ-Rezeptor II/III Antikörper sowie mit anti-CD4-APC Antikörper inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden ausgewaschen und es erfolgte die Inkubation mit anti-Micro-Beads. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen MicroBeads wurden die CD4⁺T-Zellen mittels MACS depletiert. Anschließend erfolgte die Depletion der CD90.2⁺ T-Zellen mittels anti-CD90.2-MicroBeads. CD4⁻ CD90.2⁻ Zellen wurden als SAPC definiert. Es wurde eine Reinheit von maximal 95% erreicht. Aus einem Tier konnten etwa 5 x 10⁷ Zellen isoliert werden.

2.7.5 Ex vivo Isolation von naiven CD4⁺ T-Zellen mit Neuetablierung der Depletion von antigenpräsentierenden Kontaminanten

Zur Isolierung der naiven CD4⁺ T-Zellen wurden Milz und Lymphknoten aus OT2xB6/PL-Mäusen verwendet. Die Organe wurden in PBS/BSA aufgenommen, durch ein Metallsieb gepresst und anschließend über ein Zellsieb (Porendurchmesser 100 µm) gegeben. Daraufhin wurde die erhaltene Einzelzellsuspension bei 1300 rpm und 4°C für 8 min zentrifugiert und 5 min mit Erythrozyten-Lyse-Puffer auf Eis inkubiert. Die Erythrozyten-Lyse-Reaktion wurde durch Verdünnung mit PBS/BSA gestoppt und die lysierten Erythrozyten durch eine weitere Zentrifugation ausgewaschen.

Daraufhin erfolgte die Isolation mittels MACS. Die Zellen wurden mit 20 µg/ml anti-Fcγ-Rezeptor II/III und anti-CD4-APC Antikörper inkubiert. Nach der Färbung wurden die nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen und es erfolgte die Inkubation mit anti-APC-*Multisort*-MicroBeads. Die nicht gebundenen MicroBeads wurden ebenfalls ausgewaschen und die CD4⁺ T-Zellen konnten mittels MACS isoliert werden. Die Reinheit der CD4⁺ Sortierung lag bei maximal 99 % (Abb. 5).

Um eine weitere Zellsortierung anschließen zu können, folgte der *Release* und die abgetrennten MicroBeads wurden durch MACS aus der Zellsuspension entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die neu etablierte Depletion der antigenpräsentierenden Zellen (siehe 3.1.3). Hierzu wurden mittels einer PE-Färbung sämtliche Oberflächenmoleküle von möglichen Kontaminanten markiert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit den Antikörpern anti-MHC-II-PE, anti-CD8-PE, anti-NK1.1-PE, anti-CD11b-PE, anti-CD11c-PE, anti-CD19-PE und anti-F4/80-PE gefärbt. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen und die gefärbten Zellen mit anti-PE-MicroBeads markiert. Nachdem auch die nicht gebundenen MicroBeads ausgewaschen wurden, konnten die

Kontaminanten per MACS depletiert werden. Die Depletion erfolgte mit einer verbleibenden Kontamination von unter 1 % (Abb. 5).

In dem letzten Sortierungsschritt wurden aus den CD4⁺ T-Zellen die naiven Zellen isoliert. Da naive CD4⁺ T-Zellen, im Gegensatz zu Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen, viel CD62L exprimieren, wurde die CD4⁺ Zellpopulation anhand des Oberflächenmoleküls CD62L auf naive T-Zellen sortiert. Hierzu wurden die Zellen mit CD62L-MicroBeads inkubiert und anschließend gewaschen. Die Isolation der naiven CD4⁺ CD62L^{high} Zellen erfolgte wiederholt durch MACS. Die Isolierung der naiven CD62L⁺ T-Zellen lag bei maximal 98 % (Abb. 5). Aus einer Maus wurden etwa 6 x 10⁶ naive CD4⁺ Zellen isoliert.

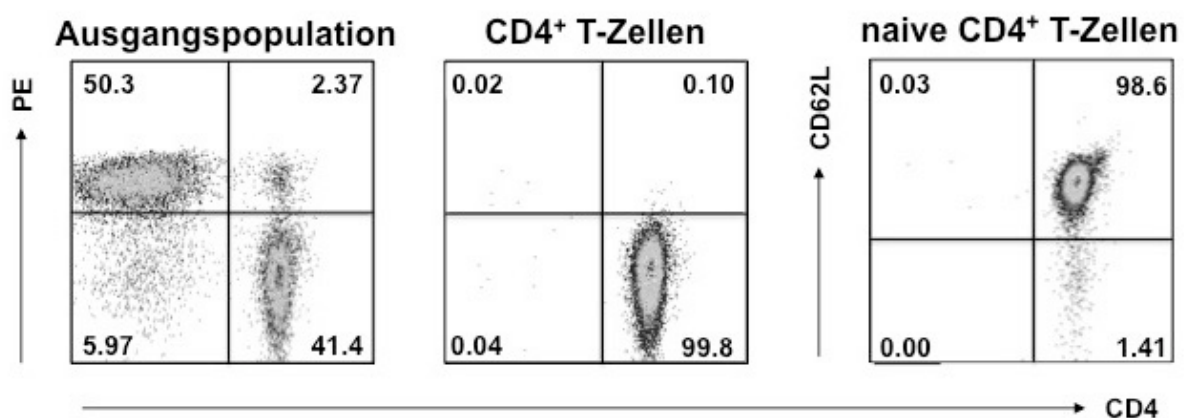


Abb. 5. Reinheit der isolierten naiven CD4⁺ T-Zellen. Aus Milz und Lymphknoten wurden naive CD4⁺ T-Zellen mittels MACS isoliert. Aus der Ausgangspopulation wurden die mit PE gefärbten Kontaminanten mittels MHC-II-, CD8-, NK1.1-, CD11b-, CD11c-, CD19- und F4/80-Antikörpern depletiert. Die Isolation der naiven CD4⁺ T-Zellen erfolgte mit Hilfe von CD62L-Antikörpern. Die *Dot Plots* sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente

Nach der Isolation wurden die naiven CD4⁺ T-Zellen mit CFSE markiert. Da der Farbstoff bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt wird, ermöglicht diese Markierung eine Messung der Proliferationsrate am Durchflusszytometer. Demnach spricht ein niedriger CFSE Gehalt für eine hohe Proliferationsrate. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 1x10⁷ Zellen/ml PBS für 2 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit CFSE inkubiert. Die Reaktion wurde durch PBS/BSA gestoppt und die Zellen nach Zentrifugation in cRPMI aufgenommen.

2.7.6 Immunhistochemische Färbung von Makrophagen und B-Zellen in der LAPC *in situ* Ausgangspopulation

Zur Differenzierung der *in situ* Ausgangspopulation von LAPC wurden dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen in Lebern aus C57BL/6-Mäusen histologisch gefärbt. Makrophagen und B-Zellen wurden mit anti-F4/80 bzw. anti-B222 an Schnitten (1-2 µm) von Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe gefärbt. Das Gewebe wurde mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 0%) gewässert. Mit den Schnitten für die Makrophagen-Färbung wurde eine Protein-induzierte Antigendemaskierung durchgeführt. Für die B-Zell Färbung wurden die Schnitte ohne Antigendemaskierung immunhistochemisch behandelt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte gespült und mit Tris-gepufferter Lösung (pH 7.4) mit biotinyliertem Primärantikörper Ratte anti-Maus F4/80-Antikörper (Macrophagen) bzw. Ratte anti-Maus B220-Antikörper (B-Zellen) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper biotinyliertem Kaninchen anti-Ratte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Detektion wurde das DAKO REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED verwendet, wobei die Alkalische Phosphatase mit Fast Red als Chromogen für 30 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt wurde. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt und die Objektträger mit Gelatine eingedeckt. Die Negativkontrollen wurden ohne Inkubation mit den Primärantikörpern durchgeführt.

Die Bilder wurden mittels eines AxioImager Z1-Mikroskops aufgenommen, ausgestattet mit einer AxioCam MRc.

Die positiven Zellen wurden pro Gesichtsfeld (*high power field, HPF*) ausgezählt (1 HPF = 0.237 mm²).

2.7.7 Immunfluoreszenz Färbung von dendritischen Zellen in der LAPC *in situ* Ausgangspopulation

Die dendritischen Zellen wurden mit anti-CD11c Antikörpern an histologischen Schnitten (3-5 µm) aus kryofixiertem Gewebe gefärbt (Schnittdicke 3-5 µm). Die Schnitte wurden von Gefriermaterial angefertigt, über Nacht getrocknet und mit Tris-gepufferter Lösung (pH 7.4) gespült. Anschließend wurden die Schnitte mit armenischem Hamster anti-Maus CD11c-Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte für einige Minuten bei Raumtemperatur die Inkubation mit Alexa Fluor 555-markiertem

Ziege anti-aramenischer Hamster-Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden für 3 Minuten bei Raumtemperatur mittels DAPI gefärbt und die Objektträger mit Fluoromount G eingedeckt. Negativkontrollen wurden ohne Inkubation mit Primärantikörpern durchgeführt.

Die Bilder wurden mittels eines AxioImager Z1-Mikroskops aufgenommen, welches mit einer AxioCam MRm ausgestattet ist. Die positiven Zellen wurden pro high power field (1 hpf = 0.237 mm²) ausgezählt.

2.7.8 *In vitro*-Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen durch verschiedene antigenpräsentierende Zellpopulationen der Leber

Um den Phänotyp von in der Leber aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden 5x10⁵ naive CD4⁺ T-Zellen mit einer definierten Anzahl an LSEC, LAPC oder beiden Zellpopulationen kultiviert. Zur Generierung von T_{LSEC} wurden 1x10⁶ LSEC verwendet. T_{LAPC} wurden durch 1x10⁵ LAPC aktiviert. Durch LSEC und LAPC gemeinsam aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurden gleichzeitig mit 1x10⁶ LSEC und 1x10⁵ LAPC kultiviert. Diese Kokulturen wurden in Anwesenheit des Antigen Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (5 µg/ml) durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC wurden Kokulturen von CD4⁺ T-Zellen mit LAPC und LSEC aus WT-Mäusen mit Kokulturen von CD4⁺ T-Zellen mit LAPC aus WT-Mäusen und LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen verglichen. Ein direkter Vergleich von T_{LSEC} aus WT-Mäusen und T_{LSEC} aus MHC-II^{-/-}-Mäusen war nicht möglich, da LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen kein Antigen präsentieren können. Auch bei diesen Kokulturen wurde Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (5 µg/ml) als Antigen hinzugegeben.

Alle Kulturen in dieser Arbeit wurden für 6 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Am 3. Tag wurden die Zellen gesplittet oder pro Ansatz 200 µl cRPMI hinzugegeben. Am 6. Tag wurden die T-Zellen durch wiederholtes Spülen mit PBS/BSA von den adhärenen LSEC getrennt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden von professionellen APC durch die Oberflächenmoleküle CD4 und CD90.1 am Durchflusszytometer unterschieden. Anti-CD90.1 Antikörper ist ein Marker für alle T-Zellen und durch die anti-CD4 Antikörperfärbung wurden die CD4⁺ T-Zellen detektiert.

2.7.9 *In vitro*-Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit des Retinolsäure-Rezeptor Inhibitor LE 540

Um zu analysieren, ob die durch LSEC zur Verfügung gestellte Retinolsäure (Neumann et al., 2012) den Phänotyp von in der Leber aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinflusst, und ob auch LAPC Retinolsäure bereitstellen können, wurden Kokulturen durchgeführt, bei denen der Retinolsäure-Rezeptor auf den T-Zellen durch LE 540 (1 µM) blockiert wurde. T_{LSEC}, T_{LAPC} und durch LSEC und LAPC gemeinsam aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurden unter Zugabe von LE 540 generiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über sechs Tage und als Antigen wurde mit Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (5 µg/ml) gearbeitet.

Um zu untersuchen, ob auch LAPC Retinolsäure zur Verfügung stellen können, wurden die isolierten LAPC über Nacht vorkultiviert und am nächsten Tag die gegebenenfalls freigesetzte Retinolsäure ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen sechs Tage mit CD4⁺ T-Zellen kultiviert.

2.7.10 *In vitro*-Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlicher Aktivierungsstärke und zusätzlicher Kostimulation

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob die Stärke der Aktivierung den Phänotyp von Leber-aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinflusst. Hierzu wurden 5x10⁵ naive CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von 1x10⁶ SAPC durch verschiedene Konzentrationen anti-CD3 Antikörper (10 ng/ml - 10 µg/ml) unterschiedlich stark aktiviert. Auch wurde durch die Zugabe von 1 µg/ml anti-CD28 Antikörper ein kostimulatorisches Signal induziert. Um auch den Einfluss der Aktivierung auf den Retinolsäure-induzierten Phänotyp zu untersuchen, wurden diese Kokulturen zusätzlich in Anwesenheit von Retinolsäure (0,1 nM) oder Retinolsäure in Kombination mit LE 540 durchgeführt.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Kostimulation analysiert. Hierzu wurden Kokulturen in An- und Abwesenheit von 1 µg/ml anti-CD28 Antikörper miteinander verglichen. Dieser Versuchsansatz wurde mit T_{LSEC} sowie mit naiven CD4⁺ T-Zellen die durch 1x10⁶ SAPC aktiviert wurden (T_{SAPC}), durchgeführt. Die Aktivierung der Zellen erfolgte über sechs Tage durch die Zugabe von 5 µg/ml Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid.

2.7.11 Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting, FACS*) am

Durchflusszytometer FACSCanto II analysiert. Die Färbung mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern ermöglicht den quantitativen Nachweis von spezifischen Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Zytokinen und damit die Phänotypisierung der Zellen.

Das FACSCanto II besitzt drei Laser zur Fluorochrom-Anregung, (rot: 633 nm, blau: 488 nm, violett: 405 nm) und ermöglicht eine simultane Detektion von sechs Fluoreszenzen sowie die Ermittlung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes. Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC), welches die Lichtbeugung misst, ermöglicht eine Aussage über die relative Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter*, SSC) misst die Lichtbrechung und die Reflexion, wodurch Rückschlüsse auf die Granularität der Zellen gezogen werden können.

Die Zellsuspension wird eingelesen und von einer Trägerflüssigkeit umgeben, die sich nicht mit der Zellsuspension vermischt. Die Trägerflüssigkeit erzeugt eine laminare Strömung und es erfolgt eine Vereinzelung der Zellsuspension. Die Einzelzellen gelangen durch einen Laser und senden daraufhin charakteristische Lichtsignale aus. Diese Fluoreszenzsignale können über optische Filter nachgewiesen werden. Der Nachweis verschiedener Fluoreszenzsignale ermöglicht es, dass Zellen mit mehreren Fluorochromen gleichzeitig markiert und detektiert werden können.

Die Signale der unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluorochrome können sich überlappen. Diese Überlappungen wurden durch das Verwenden von Kompensationskontrollen ausgeschlossen. Hierzu wurden ungefärbte Zellen und Einzelfärbungen zu jeder verwendeten Fluoreszenz eingemessen. Die Proben wurden so kompensiert, dass die Färbung spezifisch war und in kein anderes Emissionsspektrum hinein strahlte. Anschließend wurden die ermittelten Einstellungen für die Hauptmessung übernommen.

Die am Durchflusszytometer erhobenen Daten wurden mit dem Programm *FlowJo* ausgewertet (Tree Star Inc., Ashland OR, USA). Um eine korrekte Setzung des *Gates* zu ermöglichen wurden Proben aufgenommen, die das zu ermittelnde Fluorochrom nicht enthielten. So konnte das *Gate* für die mit dem weggelassenen Fluorochrom markierten Zellen, unter Berücksichtigung des spektralen Hintergrundes der anderen Fluoreszenzen, gesetzt werden. Die Fluoreszenzintensität wurde als geometrischer Mittelwert (Geom.Mean) oder als % positiver Zellen angegeben.

2.7.12 Nachweis von zellspezifisch exprimierten Oberflächenmolekülen zur Phänotypanalyse der *in vitro* aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Zur Phänotypisierung der Oberflächenmoleküle nach der Zellkultur wurden Antikörper-Färbe-Lösungen hergestellt, die spezifische Fluorochrom-gekoppelte Antikörper enthielten. Die Konzentrationen der eingesetzten Antikörper wurden zuvor austitriert (siehe Tab. 6). Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, enthielt die Färbelösung zusätzlich 20 µg/ml anti-Fcγ-Rezeptor II/III. Für die Markierung von P-Lig, einem *Homing*-Molekül für Haut und entzündliches Gewebe (Austrup et al., 1997; Tietz et al., 1998; Campbell and Butcher, 2002), wurde eine Maus P-Selektin/Mensch-IgG Fc-Chimäre eingesetzt, für deren Bindung Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen erforderlich sind. Aus diesem Grund wurde mit einem calcium- und magnesiumhaltigen P-Lig Färbe-Puffer gearbeitet. Die Bindung von P-Lig wurde durch Fluorochrom-gekoppelte anti-Mensch IgG detektiert.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit PBS/BSA oder P-Lig Färbe-Puffer gewaschen und bei 1500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die zehnmünütige Inkubation mit der Antikörper-Färbe-Lösung bei 4°C. Daraufhin wurden die nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen und die gefärbten Zellen für die Analyse am FACSCanto II in 300 µl PBS/BSA oder P-Lig Färbe-Puffer aufgenommen. Um zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen am FACS mit PI gefärbt. PI dringt durch die zerstörte Zellmembran in die Zelle ein und bindet an die doppelsträngige DNA. Hierdurch können tote und apoptotische Zellen erkannt und von lebenden Zellen unterschieden werden.

Um in der Auswertung die CD4⁺ T-Zellen von den APC unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit CD90.1-V450 und CD4-V500 gefärbt. Zur weiteren Analyse der Zellen wurden folgende Oberflächenmoleküle gefärbt: CD25-PE-Cy7, CD62L-APC, CCR9-Alexa Fluor 647, α4β7-Integrin-PE und P-Lig-PE.

Die Auswertung der am Durchflusszytometer generierten Daten erfolgte mit der Software *FlowJo*. Die Zellen wurden in einer Gegenüberstellung des FSC (Größe) und SSC (Granularität) betrachtet und ein *Gate* um die lebenden Zellen gelegt. Mit Hilfe der PI-Färbung wurden die lebenden Zellen weiter eingegrenzt. Weiterhin konnte anhand der CD4- und CD90.1-Färbung ein *Gate* um CD4⁺ T-Zellen gelegt werden und die CFSE-Markierung ermöglichte eine weitere Eingrenzung auf die proliferierten Zellen.

Die Expression spezifischer Moleküle wurde an dieser Zielpopulation analysiert.

2.7.13 Nachweis von zellspezifisch exprimierten intrazellulären Zytokinen zur Phänotypanalyse der *in vitro* aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Die aus der Kultur geernteten CD4⁺ T-Zellen wurden durch Restimulation zur Zytokinproduktion stimuliert. Zur Restimulation wurden die Zellen in WM aufgenommen und mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (IM) vier Stunden bei 37°C inkubiert. PMA aktiviert den Signaltransduktionsweg des T-Zell-Rezeptors und IM fördert die Calciumfreisetzung. Nach einer Stunde wurde Brefeldin A (10 µg/ml) hinzugegeben, um die Freisetzung der Zytokine in das Kulturmedium zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit CD90.1-V450 und CD4-V500 gefärbt, um in der Auswertung die CD4⁺ T-Zellen von den APC unterscheiden zu können.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 2 %iger PFA-Lösung fixiert. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur.

Am Folgetag wurden die Zellen zur Permeabilisierung der Membran in 0,5 %igem Saponin resuspendiert und für 5 min inkubiert. Die Permeabilisierung der Membran ermöglicht die intrazelluläre Färbung der Zellen. Die Färbung (ebenfalls mit Saponin) erfolgte mit zuvor austitrierten Antikörpern für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Es wurden die proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α , als auch auf die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 gefärbt (Mosmann and Coffman, 1989; Dinarello, 2000; Saraiva and O'Garra, 2010). Außer den zu detektierenden Antikörpern enthielt die Färbung 20 µg/ml anti-Fc γ -Rezeptor II/III und 10 µg/ml Ratte IgG. Nach der Färbung folgte wiederholt eine fünfminütige Inkubation in Saponin.

Bei der Auswertung wurden die Zellen zunächst in der Gegenüberstellung des FSC und SSC betrachtet, um mit einem *Gate* die Lymphozyten einzugrenzen. Anschließend wurde mittels CD4- und CD90.1-Markierung ein *Gate* um die CD4⁺ T-Zellen gelegt und im Weiteren wurden nur die proliferierten Zellen betrachtet. Die Fluoreszenzintensitäten der Färbungen wurde an den proliferierten CD4⁺ T-Zellen gemessen.

2.7.14 Statistische Datenanalyse

Die Darstellung und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen GaphPad Prism 5. Für die statistische Auswertung wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test mit ns = nicht signifikant, *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Phänotyps von CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung durch LAPC

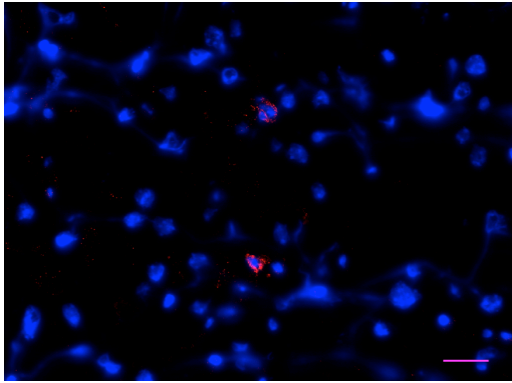
LSEC sind als eine Population nicht-professioneller APC der Leber beschrieben, die durch MHC-II-vermittelte Antigenpräsentation naive CD4⁺ T-Zellen aktivieren und einen antiinflammatorischen Phänotyp induzieren. Welchen Einfluss LAPC, eine in dieser Arbeit definierte Mischung der professionellen hepatischen APC-Populationen, auf den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen haben, war nicht bekannt und wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht. Es wurde erstmalig mit einer Mischung von dendritischen Zellen, Kupffer-Zellen und B-Zellen gearbeitet, anstatt mit den einzelnen Zellpopulationen der professionellen APC. Um zu analysieren welche APC-Population bei der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen einen dominanten Effekt zeigt, wurde auch der Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen untersucht, die durch LSEC und LAPC gemeinsam aktiviert wurden.

3.1.1 *In situ* Nachweis der LAPC

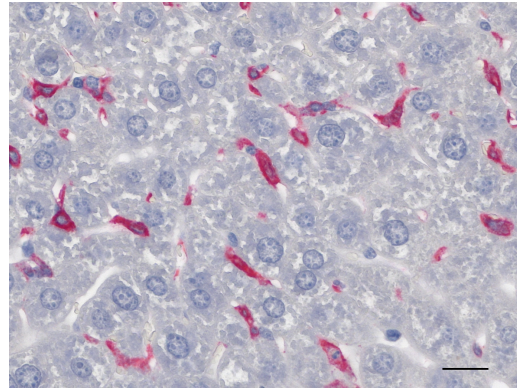
Zu den professionellen APC, die durch eine hohe Expression von MHC-II, MHC-I und kostimulatorischen Moleküle charakterisiert sind, gehören dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Nach den Angaben in der Literatur sind etwa 20% der nicht-parenchymalen Leberzellen Makrophagen, <1% dendritische Zellen und 6% B-Zellen (Woo et al., 1994; Racanelli and Rehermann, 2006).

Um diese Daten zu überprüfen, wurde die Zusammensetzung der verschiedenen hepatischen APC-Populationen histologisch bestimmt. Hierzu wurden Lebern von C57BL/6-Mäusen entnommen, Gefrier- oder Paraffinschnitte angefertigt und diese mit einem anti-CD11c, anti-F4/80 oder anti-B220 Antikörper zur Markierung von dendritischen Zellen, Makrophagen beziehungsweise B-Zellen gefärbt (Abb. 6). In der histologischen Auszählung ergab sich ein Verhältnis von dendritischen Zellen zu Makrophagen zu B-Zellen von 1:10:2. Dieses Zellverhältnis bestätigte die Daten aus der Literatur.

A) Dendritische Zellen



B) Makrophagen



C) B-Zellen

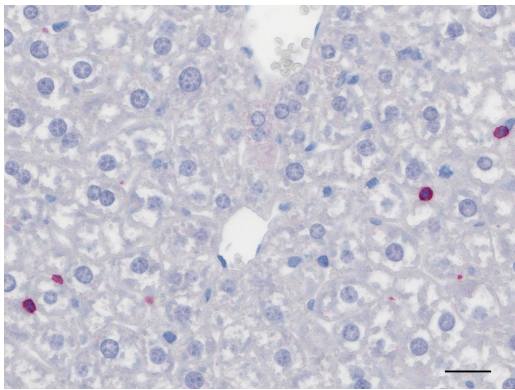


Abb. 6. *In situ* Nachweis hepatischer APC-Populationen. (A) Gefrierschnitte der Leber wurden mit einem anti-CD11c Antikörper rot gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. (B) Parafinschnitte der Leber wurden mit einem anti-F4/80 Antikörper (rot) oder (C) anti-B220 Antikörper (rot) markiert. Die Kerne wurden mit Hämatoxylin blau gefärbt. Der Standard entspricht 20 μm .

3.1.2 Prozentuale Zusammensetzung der isolierten LAPC

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Isolation von LAPC etabliert werden, um diese für die Aktivierung naiver CD4^+ T-Zellen verwenden zu können. Das experimentelle Vorgehen ist detailliert im Abschnitt 2.7.3 beschrieben. Um den prozentualen Anteil der verschiedenen APC innerhalb der LAPC-Population zu ermitteln, wurden dendritische Zellen mit einem anti-CD11c Antikörper, Makrophagen mit einem anti-F4/80 Antikörper und B-Zellen mit einem anti-CD19 Antikörper markiert und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert (Abb. 7). Alle Zellen der LAPC-Population exprimierten den Leukozytenmarker CD45. Es ergab sich eine Verteilung von $2,8 \pm 2,7 \%$ dendritischen Zellen, $3,7 \pm 3,0 \%$ Makrophagen und $74,4 \pm 7,0 \%$ B-Zellen.

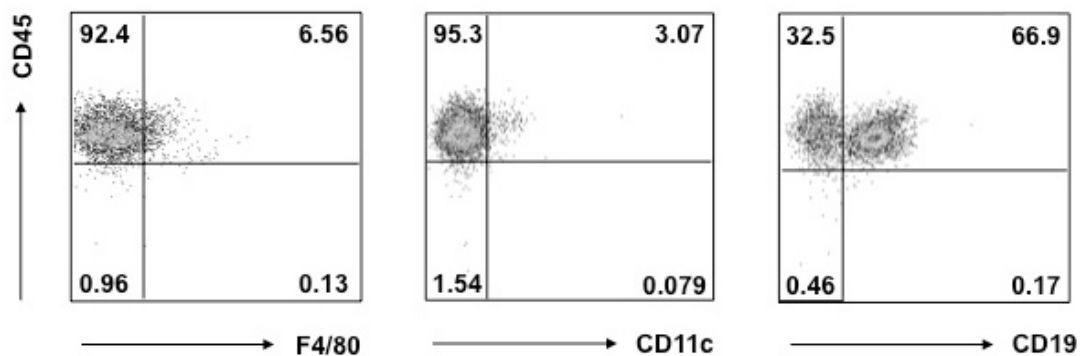


Abb. 7. Prozentuale Zusammensetzung der LAPC-Population. *Ex vivo* isolierte LAPC wurden mit einem anti-F4/80, anti-CD11c oder anti-CD19 Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Hier sind repräsentative *Dot Plots* für mindestens vier unabhängige Experimente gezeigt.

Die prozentuale Verteilung der verschiedenen APC-Populationen innerhalb der LAPC stimmte nicht mit den *in situ* Daten überein (siehe Abb. 6 und 7). Durch die Isolierungsstrategie wurden B-Zellen stark angereichert, während Makrophagen verloren gingen. Um sich dem *in situ* Verhältnis anzunähern, wurde versucht, die LAPC Populationen einzeln zu isolieren oder B-Zellen aus der LAPC-Population zu depletieren. Auf Grund der geringen Zellzahlen, waren diese Isolierungsstrategien im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich. Daher wurde die LAPC-Population in der hier gezeigten prozentualen Verteilung der APC für die vorliegenden Versuche verwendet.

3.1.3 Etablierung einer Methode zur Isolation von APC-freien naiven CD4⁺ T-Zellen

Es sollte der Einfluss spezifischer hepatischer APC-Populationen auf den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Dazu musste sichergestellt werden, dass die verwendete CD4⁺ T-Zell-Population keine kontaminierenden APC enthielt.

Da alle APC-Populationen MHC-II exprimieren, wurden zunächst die APC mit einem anti-MHC-II Antikörper markiert und mittels MACS aus den naiven CD4⁺ T-Zellen depletiert. Um zu testen, ob die Depletion vollständig erfolgte, wurden die MHC-II⁻ naiven CD4⁺ T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor das Antigen OVA erkennt, mit CFSE markiert und mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid für 6 Tage kultiviert. Die Analyse am Durchflusszytometer zeigte, dass die CD4⁺ T-Zellen proliferierten (Abb. 8A). Somit mussten sich innerhalb der MHC-II-depletierten naiven CD4⁺ T-Zellen noch APC

befinden, welche die CD4⁺ T-Zellen antigenspezifisch aktivierten. Aufbauend auf diesen Daten wurden in den folgenden Versuchen nicht nur MHC-II, sondern auch weitere spezifische Oberflächenmoleküle von APC-Populationen mit Antikörpern markiert. Die Zellsuspension wurde mit den Antikörpern anti-MHC-II-PE, anti-CD8-PE, anti-NK1.1-PE, anti-CD11b-PE, anti-CD11c-PE, anti-CD19-PE und anti-F4/80-PE markiert. Im nächsten Schritt wurden die antikörpermarkierten Zellen mit anti-PE-MicroBeads beladen und per MACS depletiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem anti-CD4 Antikörper und anti-CD62L Microbeads markiert und naive CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen mittels MACS isoliert. Die OVA-spezifischen, naiven CD4⁺ T-Zellen wurden daraufhin mit CFSE markiert und für 6 Tage in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kultiviert. Die Analyse am Durchflusszytometer zeigte, dass die durch diese Isolationsstrategie gewonnenen naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von OVA nicht proliferierten (Abb. 8B). Somit wurde gezeigt, dass keine APC in den isolierten naiven CD4⁺ T-Zellen verblieben waren. In dieser Arbeit wurden die bei allen Experimenten verwendeten naiven CD4⁺ T-Zellen ausschließlich mit der neu etablierten Methode isoliert.

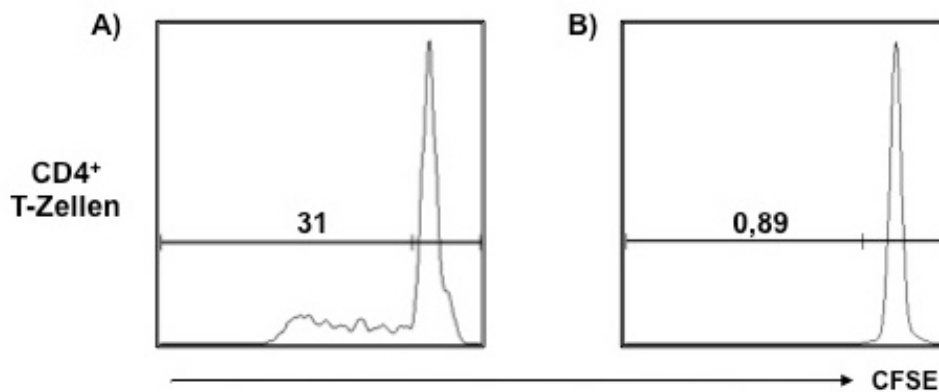


Abb. 8. Proliferation OVA-spezifischer naiver CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von OVA. Die isolierten OVA-spezifischen, naiven CD4⁺ T-Zellen wurden mit CFSE markiert und sechs Tage in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kultiviert. Dargestellt ist die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nach (A) Depletion von MHC-II-exprimierenden Zellen und (B) Depletion von MHC-II-, CD8-, NK1.1-, CD11b-, CD11c-, CD19 oder F4/80-exprimierenden Zellen. Der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen ist angegeben. Es sind repräsentative Histogramme für mindestens vier unabhängige Experimente gezeigt.

3.1.4 Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung durch hepatische APC-Populationen

Durch die Expression spezifischer Zytokine können CD4⁺ T-Zellen abhängig von ihrer funktionellen Subpopulation die Immunantwort in Richtung Inflammation oder Toleranz

beeinflussen (Shevach, 2009; Schmitt and Ueno, 2015). Durch die Expression von spezifischen *Homing*-Rezeptoren ist es diesen pro- oder antiinflammatorischen T-Zellen möglich in bestimmte Gewebe oder an den Ort einer Entzündung zu migrieren und dort die Immunreaktion zu modulieren. In dieser Arbeit wurde das Zytokinprofil und die Expression von *Homing*-Rezeptoren von CD4⁺ T-Zellen untersucht, die durch LSEC, LAPC oder LSEC und LAPC aktiviert wurden.

Es ist bekannt, dass T_{LSEC} sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine auf geringem Niveau exprimieren. Die Darm-*Homing*-Moleküle $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 sowie der Lymphknoten-*Homing*-Rezeptor CD62L werden durch T_{LSEC} stark exprimiert und P-Lig, ein *Homing*-Molekül für Haut und entzündetes Gewebe auf niedrigem bis intermediären Level (Kruse et al., 2009; Neumann et al., 2012). Während LSEC nicht-professionelle APC sind, sind LAPC eine Population professioneller APC der Leber. Der Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen, die durch die hier verwendete Mischung der professionellen LAPC aktiviert wurden (T_{LAPC}), wurde im Rahmen dieser Arbeit neu definiert.

Es wurde untersucht, ob der Phänotyp der T_{LAPC} pro- oder antiinflammatorisch ist und ob die Aktivierung durch LAPC die Expression von spezifischen *Homing*-Molekülen induziert. Um mögliche Unterschiede aufzuzeigen, wurde der Phänotyp der T_{LAPC} mit dem Phänotyp der T_{LSEC} verglichen. Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss LSEC auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen haben, die gleichzeitig durch professionelle LAPC aktiviert wurden. CD4⁺ T-Zellen, die parallel durch LSEC und LAPC aktiviert wurden, werden im Folgenden als T_{LSEC/LAPC} bezeichnet. Um den Einfluss der LSEC zu analysieren, wurde der Phänotyp der T_{LSEC/LAPC} mit dem Phänotyp der T_{LAPC} verglichen.

CFSE-markierte, OVA-spezifische naive CD4⁺ T-Zellen wurden mit LSEC, LAPC oder LSEC und LAPC in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid für 6 Tage kokultiviert. Die Expressionsanalyse der untersuchten Marker erfolgte am Durchflusszytometer. Zunächst wurde die Aktivierung und Proliferation der CD4⁺ T-Zellen untersucht. Um eine Aussage über die Aktivierung der Zellen treffen zu können, wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T_{LSEC}, T_{LAPC} und T_{LSEC/LAPC} mittels eines anti-CD25 Antikörpers untersucht (Caruso et al., 1997). Die Proliferation wurde mithilfe des CFSE Geom.Mean gemessen (Lyons, 1999). T_{LAPC} zeigten eine signifikant stärkere CD25-Expression als T_{LSEC}. T_{LSEC/LAPC} waren dagegen signifikant weniger aktiviert als T_{LAPC} (Abb. 9A). Bezüglich der Proliferation wurde gezeigt, dass T_{LAPC} signifikant stärker

proliferierten als T_{LSEC} . Im Vergleich der Proliferation zwischen T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ wurde kein Unterschied festgestellt (Abb. 9B).

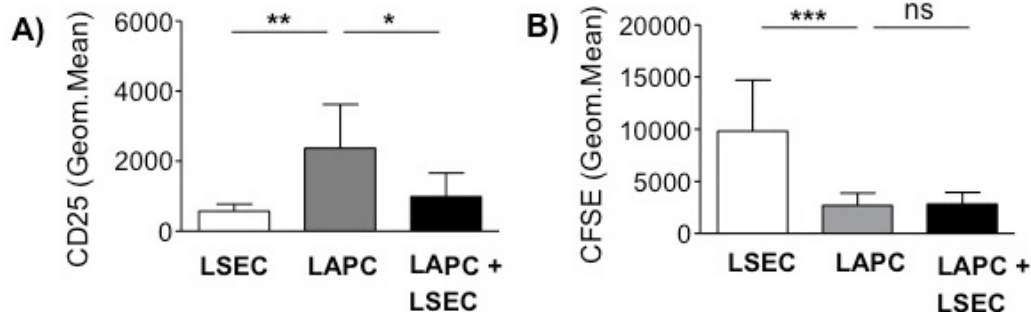


Abb. 9. Aktivierung und Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen, die durch verschiedene hepatische APC-Populationen antigenspezifisch stimuliert wurden. OVA-spezifische, naive $CD4^+$ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen wurden mit CFSE markiert und sechs Tage in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid mit LSEC, LAPC oder LSEC und LAPC aus C57BL/6-Mäusen kokultiviert. Die $CD4^+$ T-Zellen wurden (A) mit anti-CD25 Antikörper markiert und (B) es wurde der CFSE Geom.Mean ermittelt. Die Analyse der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Dargestellt sind MW \pm SD aus (A) sechs und (B) sieben unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney-Test mit *p (probability-value) < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001, ns = nicht signifikant.

Um Rückschlüsse auf die organspezifische Migration und damit den Wirkort von in der Leber aktivierten $CD4^+$ T-Zellen ziehen zu können, wurde die Induktion von *Homing*-Rezeptoren untersucht. T_{LSEC} , T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ wurden zur Expressionsanalyse der Darm-*Homing*-Rezeptoren mit den Antikörpern anti- $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und anti-CCR9 markiert (Hamann et al., 1994; Zabel et al., 1999). Auch wurde die Expression des Lymphknoten-*Homing*-Rezeptors CD62L (Gallatin et al., 1983) und die Expression von P-Lig, einem *Homing*-Molekül für Haut und entzündliches Gewebe (Astrup et al., 1997; Tietz et al., 1998; Campbell and Butcher, 2002), untersucht. Zur Detektion der P-Lig-Expression wurden die Zellen mit einem anti-Maus P-Selektin/Mensch-IgG Fc-Chimärprotein und einem anti-Mensch IgG Fc markiert.

Die Analyse der Darm-*Homing*-Moleküle $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 ergab eine signifikant niedrigere Expression auf den T_{LAPC} im Vergleich zu den T_{LSEC} . Die $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression auf den $CD4^+$ T-Zellen wurde signifikant erhöht, wenn neben den LAPC auch LSEC in den Kokulturen vorhanden waren. Für die Expression von CCR9 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den T_{LAPC} und den $T_{LSEC/LAPC}$ festgestellt werden (Abb. 10A, B).

Für die Untersuchung der CD62L-Expression wurde die Expressionsstärke mit dem

Geom.Mean der CD62L-Fluoreszenz angegeben. Dies war erforderlich, da alle Zellen CD62L exprimierten, sich aber in der Stärke der Expression unterschieden. Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Expressionsstärke auf den T_{LAPC} im Vergleich zu den T_{LSEC} . T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ exprimierten gleich stark CD62L (Abb. 10C).

In Bezug auf die P-Lig-Expression wurde bei allen drei Zellpopulationen eine ähnlich starke Expression detektiert (Abb. 10D).

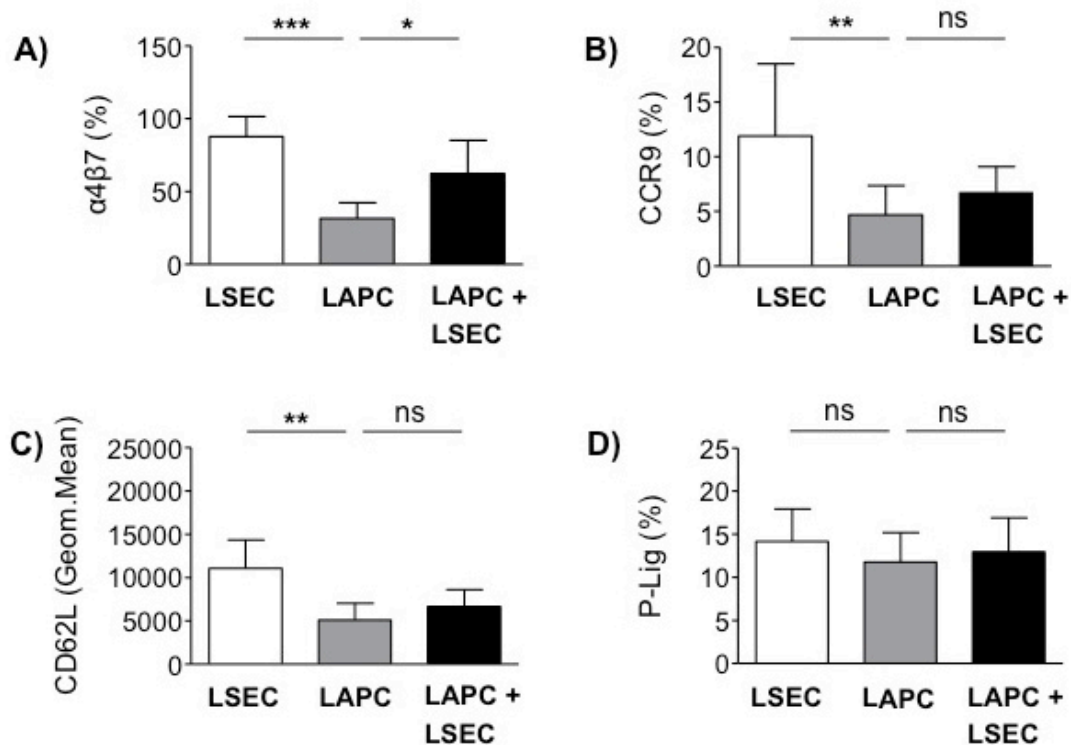


Abb. 10. Induktion von *Homing*-Molekülen auf $CD4^+$ T-Zellen durch verschiedene APC-Populationen der Leber. In Anwesenheit des Antigen Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid wurden OVA-spezifische, naive $CD4^+$ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen sechs Tage mit LSEC, LAPC oder LSEC und LAPC aus C57BL/6-Mäusen kokultiviert. T_{LSEC} , T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ wurden mit einem (A) anti- $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, (B) anti-CCR9 und (C) anti-CD62L Antikörper markiert. Zur Untersuchung der (D) P-Lig-Expression wurden die Zellen mit einem anti-Maus P-Selektin/Mensch-IgG Fc-Chimärprotein und einem anti-Mensch IgG Fc gefärbt. Die Analysen erfolgten am Durchflusszytometer. Es wurde der Mann-Whitney-Test mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und ns = nicht signifikant angewandt und MW \pm SD aus sieben unabhängigen Experimenten angegeben.

Nachdem gezeigt wurde, dass Leber-aktivierte $CD4^+$ T-Zellen spezifische *Homing-Rezeptoren* exprimieren, wurde das Zytokinprofil dieser T-Zellen untersucht, um mögliche Rückschlüsse auf deren lokale Wirkung zu ziehen. Die $CD4^+$ T-Zellen wurden nach der Kokultur durch Inkubation mit Phorbol-Myristat-Acetat und Ionomycin zur Zytokinproduktion stimuliert und die Zugabe von Brefeldin A verhinderte die Freisetzung

der Zytokine. Die Markierung der untersuchten Zytokine erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

Es wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α analysiert (Mosmann and Coffman, 1989; Dinarello, 2000; Schmitt and Ueno, 2015). Hier wurde für alle drei untersuchten Zytokine eine signifikant stärkere Expression durch T_{LAPC} als durch T_{LSEC} gezeigt. T_{LSEC/LAPC} exprimierten dagegen signifikant weniger IFN γ als T_{LAPC}. Hinsichtlich der Expression von IL-2 und TNF α wurde kein signifikanter Unterschied zwischen T_{LAPC} und T_{LSEC/LAPC} festgestellt (Abb. 11A-C).

Des Weiteren wurde die Expression der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 (Mosmann and Coffman, 1989; Saraiva and O'Garra, 2010; Schmitt and Ueno, 2015) bestimmt. Keine der CD4⁺ T-Zellpopulationen exprimierte IL-4 oder IL-10 (Abb. 11D, E).

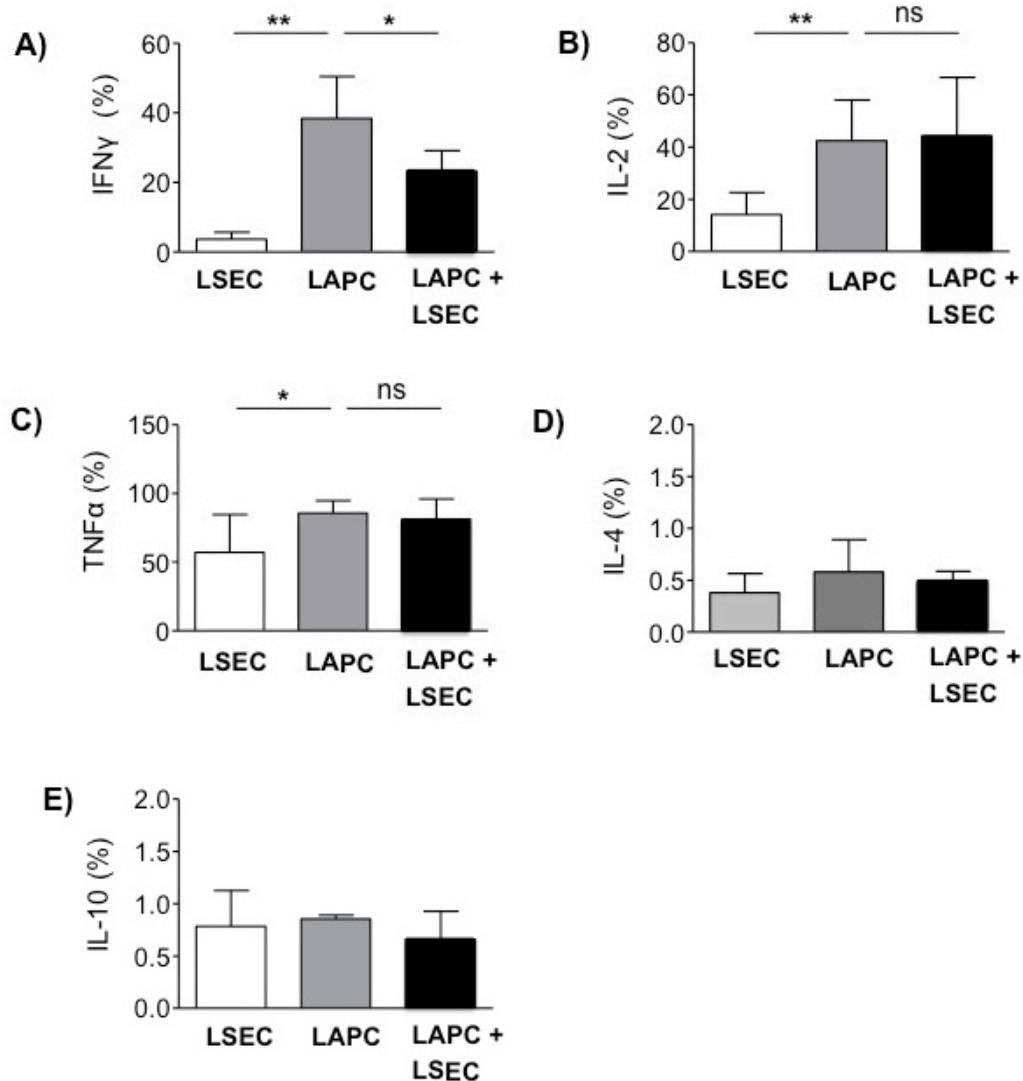


Abb. 11. Zytokinprofil von CD4⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Ppopulationen der Leber aktiviert wurden. OVA-spezifische, naive CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen wurden sechs Tage in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid mit LSEC, LAPC oder LSEC und LAPC aus C57BL/6-Mäusen kokultiviert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden nach Markierung mit spezifischen Antikörpern hinsichtlich ihrer Expression von (A) IFN γ , (B) IL-2, (C) TNF α , (D) IL-4, und (E) IL-10 am Durchflusszytometer analysiert. Es wurden MW \pm SD aus (A) sechs, (B-C) sieben und (D-E) zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Mann-Whitney-Test mit *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001, ns = nicht signifikant.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass T_{LAPC} im Vergleich zu T_{LSEC} stärker proliferieren, stärker aktiviert sind und mehr proinflammatorische Zytokine, jedoch weniger Darm- und Lymphknoten-*Homing*-Rezeptoren exprimieren. Die Anwesenheit von LSEC in der Kokultur von CD4⁺ T-Zellen und LAPC bewirkte eine geringere Aktivierung, eine stärkere Expression von α 4 β 7-Integrin und eine niedrigere IFN γ -Expression.

3.2 Mechanismen der Induktion des Phänotyps von CD4⁺ T-Zellen, die durch APC der Leber aktiviert wurden

Der Phänotyp von in der Leber-aktivierten T-Zellen kann durch die Interaktion mit lokalen APC beeinflusst werden, aber auch das einzigartige Mikromilieu der Leber kann dazu beitragen (Knolle and Gerken, 2000). Welche speziellen Mechanismen dabei eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt. Daher lag es im Fokus dieser Arbeit, die zugrundeliegenden Mechanismen der Induktion von T_{LSEC}, T_{LAPC} oder T_{LSEC/LAPC} zu untersuchen.

3.2.1 Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC

LSEC sind eine Population nicht-professioneller APC, die konstitutiv MHC-II exprimieren (Lohse et al., 1996). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich die im Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Unterschiede im Phänotyp von T_{LAPC} und T_{LSEC/LAPC} auf die Antigenpräsentation durch LSEC zurückführen lassen. Dazu wurden naive CD4⁺ T-Zellen mit MHC-II⁺ LAPC und LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen oder WT-Mäusen (MHC-II^{+/+}) in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid für 6 Tage kultiviert und der induzierte Phänotyp am Durchflusszytometer analysiert.

Abb. 12 zeigt, dass LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen keine Proliferation von CD4⁺ T-Zellen induzieren.

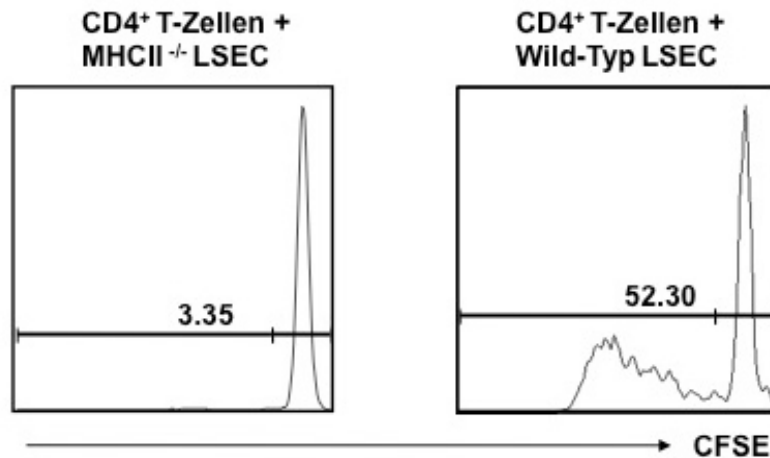


Abb. 12. Proliferation von CD4⁺ T-Zellen, die durch LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen oder WT-Mäusen aktiviert wurden. OVA-spezifische, naive CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen wurden CFSE markiert und mit LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen oder WT-Mäusen sechs Tage in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kultiviert. Der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen ist angegeben und das Histogramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

Der Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC auf den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen wurde bezüglich der Aktivierung (CD25), Proliferation (CFSE), Expression von *Homing*-Molekülen (α 4 β 7-Integrin, CCR9, CD62L, P-Lig) und Zytokin-Expression (IFN γ , IL-2, TNF α , IL-4, IL-10) untersucht. Die Daten zeigten, dass sich der Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen, die durch LAPC und MHC-II^{-/-} LSEC aktiviert wurden, nicht signifikant von dem Phänotyp der durch LAPC- und MHC-II^{+/+} LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen unterschied. (Abb. 13) Die MHC-II-vermittelte Antigenpräsentation durch LSEC zeigte somit in Anwesenheit von LAPC keinen Einfluss auf den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen.

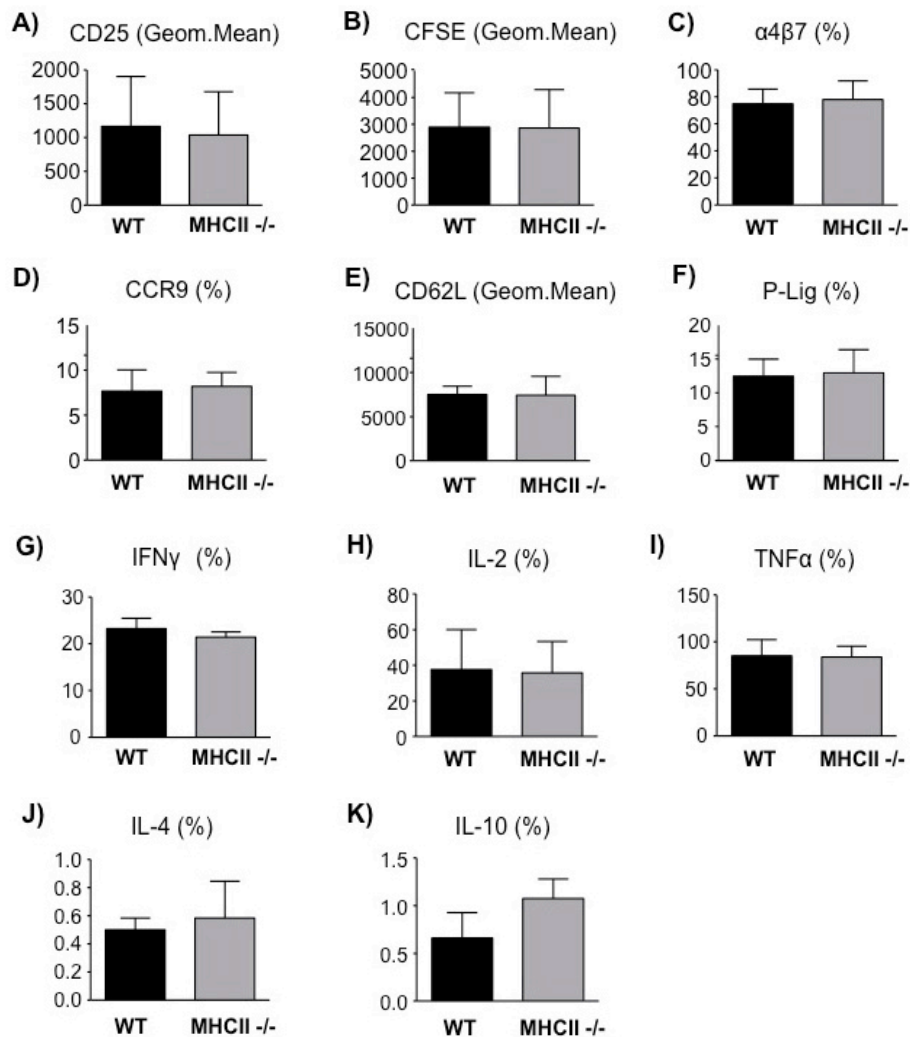


Abb. 13. Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC auf den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen. CFSE markierte, OVA-spezifische, naive CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen wurden mit LAPC aus C57BL/6-Mäusen und LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen oder WT-Mäusen für sechs Tage in Anwesenheit von OVA kokultiviert. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern markiert und hinsichtlich ihrer (A) Aktivierung, (B) Proliferation, (C-F) Expression von *Homing*-Rezeptoren und (G-K) Zytokinexpression am Durchflusszytometer analysiert. MW \pm SD aus (A, G) drei, (B-F, H-I) vier und (J-K) zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Einfluss der durch LSEC zur Verfügung gestellten Retinolsäure

LSEC exprimieren spezifische Enzyme, mit denen sie in der Leber gespeichertes Vitamin A zu Retinolsäure metabolisieren können. Diese durch LSEC zur Verfügung gestellte Retinolsäure induziert die hohe α 4 β 7-Integrin- und CCR9-Expression und supprimiert die P-Lig-Expression auf T_{LSEC} (Neumann et al., 2012). Im Folgenden wurde untersucht, ob auch der Phänotyp der T_{LAPC} und T_{LSEC/LAPC} durch Retinolsäure beeinflusst wird und ob die Retinolsäure die Zytokinproduktion durch T_{LSEC} beeinflusst. Hierzu sind bisher keine Daten bekannt. Um den Einfluss der Retinolsäure zu analysieren, wurde der Retinolsäure-Rezeptor auf den T-Zellen mit Hilfe des

Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors LE 540 blockiert. Die Zellen wurden durch das Antigen Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid aktiviert. OVA-spezifische, naive CD4⁺ T-Zellen wurden in Anwesenheit von LE 540 mit LSEC oder LAPC beziehungsweise LSEC und LAPC kokultiviert. Anschließend wurde der Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen, die ohne LE 540 kultiviert wurden mit dem Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen verglichen, die mit LE 540 kultiviert wurden.

Zunächst wurde die Aktivierungs- und Proliferationsstärke der CD4⁺ T-Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass sowohl die CD25-Expression als auch die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen unabhängig von der verwendeten APC-Population durch Blockierung des Retinolsäure-Signaling nicht signifikant beeinflusst wird (Abb. 14A, B).

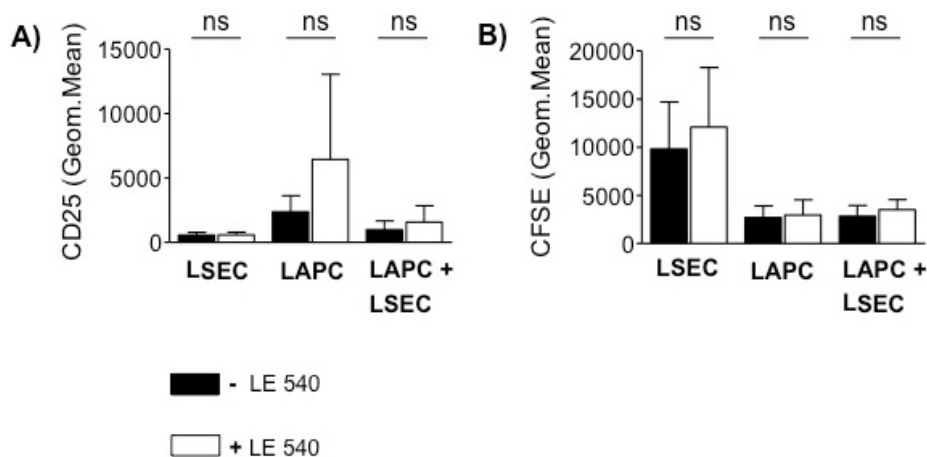


Abb. 14. Einfluss von Retinolsäure auf die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Populationen der Leber aktiviert wurden. OVA-spezifische, naive, CFSE markierte CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen wurden mit und ohne den Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitor LE 540 durch LSEC oder LAPC bzw. LSEC und LAPC aus C57BL/6-Mäusen aktiviert. Die sechs Tage andauernde Kultur wurde in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid durchgeführt und die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. Die CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen wurden mit einem anti-CD25 Antikörper markiert und bezüglich ihrer (A) Aktivierung und (B) Proliferation untersucht. Angegeben sind MW ± SD aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney-Test; ns = nicht signifikant.

Auch der Einfluss der Retinolsäure auf die Expression von organspezifischen *Homing*-Rezeptoren wurde untersucht. Bezüglich des Darm-*Homing*-Rezeptors α4β7-Integrin konnte gezeigt werden, dass die Expression unabhängig von der verwendeten APC-Population signifikant sinkt, wenn die CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von LE 540 kultiviert werden (Abb. 15A). Für die Expression des Darm-*Homing*-Rezeptors CCR9 wurde hingegen nur auf den T_{LSEC} eine signifikante Reduktion der Expression durch die Zugabe des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors gezeigt (Abb. 15B). Die Analyse des

Lymphknoten-*Homing*-Rezeptors CD62L ergab nur auf den T_{LAPC} eine signifikant verminderte Expression nach Zugabe von LE 540 (Abb. 15C). Hinsichtlich der Expression des Haut-*Homing*-Rezeptors P-Lig wurde in allen drei CD4⁺ T-Zellpopulationen nachgewiesen, dass die Expression von P-Lig in Anwesenheit des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors signifikant steigt (Abb. 15D).

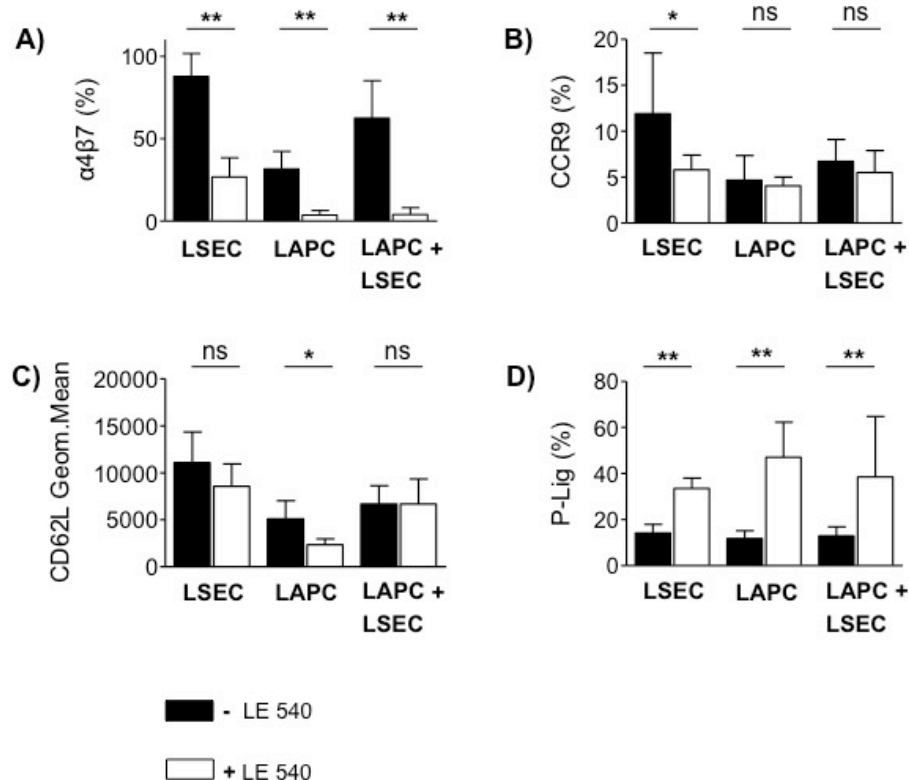


Abb. 15. Einfluss von Retinolsäure auf die Expression von *Homing*-Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Populationen der Leber aktiviert wurden. OVA-spezifische, naive CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen wurden mit LSEC oder LAPC bzw. LSEC und LAPC aus C57BL/6-Mäusen für sechs Tage kokultiviert. Die Kultur erfolgte in An- oder Abwesenheit des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors LE 540 und als Antigen wurde Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid hinzugegeben. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern markiert und hinsichtlich ihrer Expression von (A) $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, (B) CCR9, (C) CD62L und (D) P-Lig untersucht. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. Dargestellt sind MW \pm SD aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney-Test mit * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, ns = nicht signifikant.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Retinolsäure auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen untersucht. Die Untersuchung von IFN γ und IL-2 zeigte, dass deren Expression nach Blockierung des Retinolsäure-*Signaling* in T_{LSEC} und T_{LAPC} signifikant erhöht war. Für CD4⁺ T-Zellpopulationen, die durch LSEC und LAPC gemeinsam aktiviert wurden, zeigte sich nur bezüglich der IFN γ -Expression ein signifikanter Unterschied (Abb. 16A, B). Die Expression von TNF α wurde durch die

Zugabe des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors nicht beeinflusst (Abb. 16C). Es ist hervorzuheben, dass die Expression der proinflammatorischen Zytokine durch LSEC, nach der Zugabe des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors zwar steigt, jedoch weiterhin sehr niedrig bleibt.

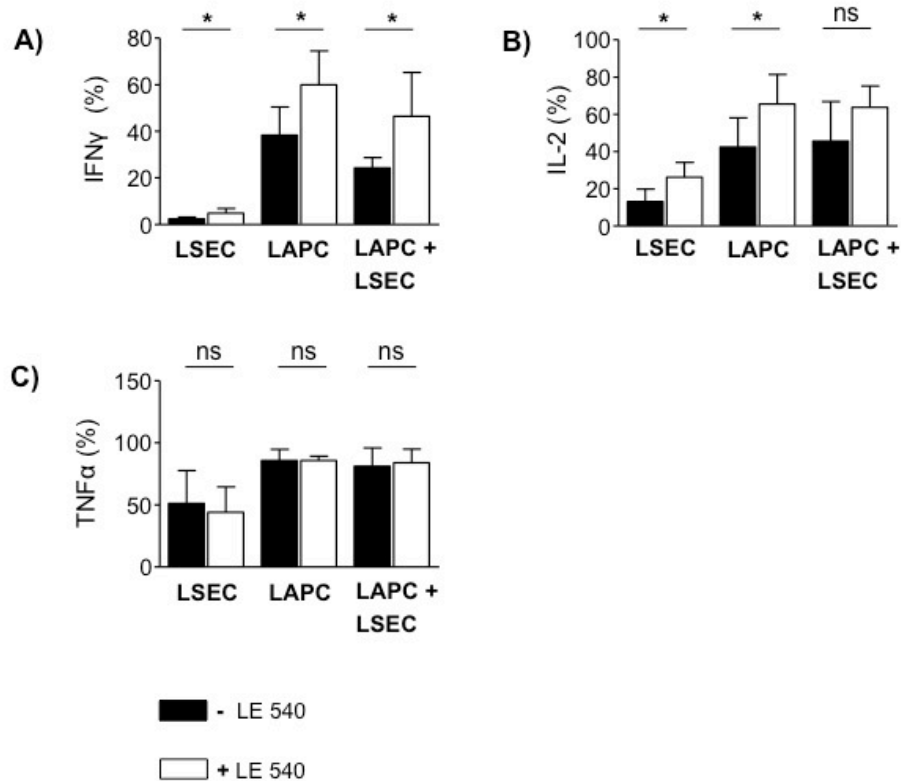


Abb. 16. Einfluss von Retinolsäure auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in CD4⁺ T-Zellen, die durch verschiedene APC-Populationen der Leber aktiviert wurden. Mit und ohne Zugabe des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors LE 540 wurden OVA-spezifische, naive CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen mit LSEC oder LAPC bzw. LSEC und LAPC aus C57BL/6-Mäusen für sechs Tage kokultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern markiert und bezüglich ihrer Expression von (A) IFN γ , (B) IL-2 und (C) TNF α am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind MW \pm SD aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney-Test mit * = p < 0,05, ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Blockade des Retinolsäure-Signaling in aktivierten CD4⁺ T-Zellen, unabhängig von der verwendeten APC-Population der Leber, zu einer verringerten Expression des Darm-Homing-Rezeptors α 4 β 7-Integrin führt. Bezüglich des Darm-Homing-Moleküls CCR9 zeigte sich nur bei den T_{LSEC} eine Reduktion der Expression. Im Gegensatz dazu wurde die Expression des proinflammatorischen Zytokines IFN γ und die P-Lig-Expression durch die Blockade des Retinolsäure-Signaling in allen CD4⁺ T-Zellpopulationen erhöht.

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass eine Blockade des Retinolsäure-*Signaling* den Phänotyp der T_{LAPC} ähnlich beeinflusst wie den Phänotyp der T_{LSEC} . Da bekannt ist, dass LSEC Retinolsäure zur Verfügung stellen und diese den Phänotyp beeinflusst (Neumann et al., 2012), wurde vermutet, dass in den LAPC-Kulturen ebenfalls Retinolsäure enthalten sein könnte. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob LAPC Retinolsäure aus der Leber in die Kultur transportieren. Hierzu wurden LAPC über Nacht vorkultiviert und am nächsten Tag gewaschen, um die gegebenenfalls in das Kulturmedium abgegebene Retinolsäure zu entfernen. Daraufhin wurden die gewaschenen LAPC mit naiven $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kultiviert. Als Vergleichsgruppe dienten $CD4^+$ T-Zellen, die mit frisch isolierten LAPC kultiviert wurden.

Die Zellen wurden hinsichtlich Aktivierung (CD25), Proliferation (CFSE), Expression von *Homing*-Molekülen ($\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CCR9, P-Lig, CD62L) und Zytokin-Expression (IFN γ , IL-2, TNF α , IL-4, IL-10) analysiert. Die Analyse der untersuchten Marker zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen T_{LAPC} , die durch über Nacht vorkultivierte und gewaschene LAPC aktiviert wurden und T_{LAPC} , die durch frisch isolierte LAPC aktiviert wurden (Abb. 17).

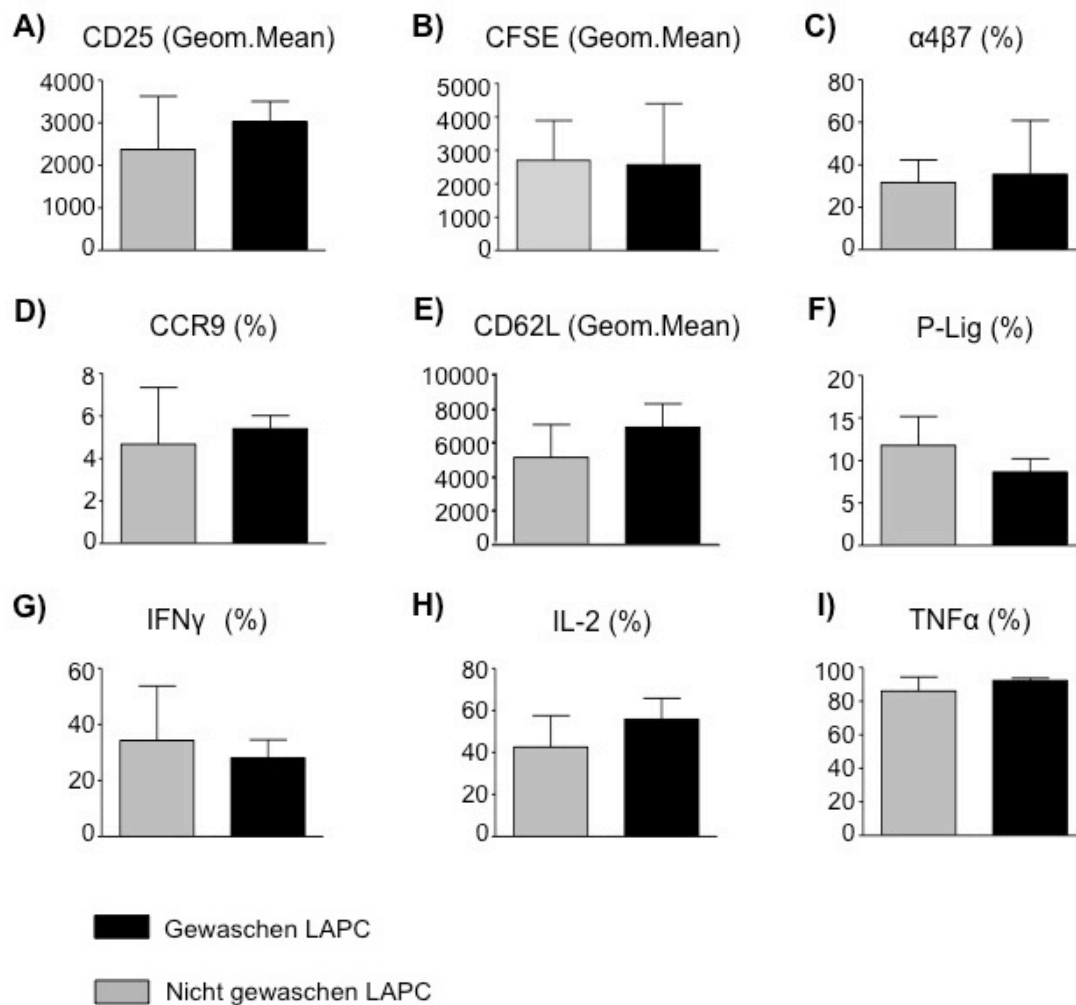


Abb. 17. Vergleich des Phänotyps von CD4⁺ T-Zellen, die durch über Nacht vorkultivierte und gewaschene LAPC oder durch frisch isolierte LAPC aktiviert wurden. Frisch isolierte oder über Nacht kultivierte und gewaschene LAPC aus C57BL/6-Mäusen wurden mit OVA-spezifischen, naiven, CFSE markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen für sechs Tage in Anwesenheit von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern markiert und bezüglich ihrer (A) Aktivierung, (B) Proliferation sowie der Expression von (C-F) *Homing*-Rezeptoren und (G-H) Zytokinen untersucht. Alle Analysen wurden am Durchflusszytometer durchgeführt. Dargestellt sind MW ± SD aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.3 Einfluss der Aktivierungsstärke

Es ist bekannt, dass der Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen durch Antigenendosierung und Stärke der Stimulation des TCR beeinflusst wird (Constant et al., 1995). Als nicht-professionelle APC-Population exprimieren LSEC wenig MHC-II (Knolle and Gerken, 2000) und aktivieren naive CD4⁺ T-Zellen schwächer als professionelle APC. Für CD8⁺ T-Zellen wurde gezeigt, dass eine höhere Antigenendosierung und damit eine stärkere Aktivierung die Expression der Darm-*Homing*-Moleküle senkt (Svensson et al., 2008). Für CD4⁺ T-Zellen wurde ein solcher Einfluss bisher nicht gezeigt. Um Rückschlüsse

auf die Mechanismen der phänotypischen Unterschiede zwischen T_{LSEC} und T_{LAPC} ziehen zu können wurde im Folgenden untersucht, ob die Aktivierungsstärke die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CCR9, CD62L und P-Lig beeinflusst. Auch wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert, ob die Expression von proinflammatorischen Zytokinen durch die Aktivierungsstärke beeinflusst wird.

Naive $CD4^+$ T-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen eines anti-CD3 Antikörpers aktiviert. Anti-CD3 Antikörper führen über den TCR zu einer direkten, antigenunabhängigen Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen. Außerdem wurde durch die Zugabe eines anti-CD28 Antikörper ein immer gleich starkes APC-unabhängiges, kostimulatorisches Signal ausgelöst. Durch Stimulation des CD28-Rezeptors der T-Zelle wird das TCR-Signal verstärkt (Chambers and Allison, 1999). Um die beiden Antikörper den Zellen zu präsentieren, wurden zusätzlich SAPC ($CD4^- CD90.2^+$) in die Kultur gegeben. Um den Einfluss der Aktivierungsstärke auf den Retinolsäure-induzierten Phänotyp zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit Retinolsäure (0,1nM) in An- oder Abwesenheit von LE 540 kultiviert.

Zunächst wurde gezeigt, dass das verwendete Aktivierungssystem funktioniert. Hierzu wurden Aktivierung und Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen in den unterschiedlichen Kulturbedingungen untersucht. Es wurde verifiziert, dass eine abnehmende anti-CD3 Antikörperkonzentration zu einer verringerten Aktivierung und Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen führt. Auch in diesem Kultursystem hatte das Retinolsäure-*Signaling* keinen Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 18A, B)

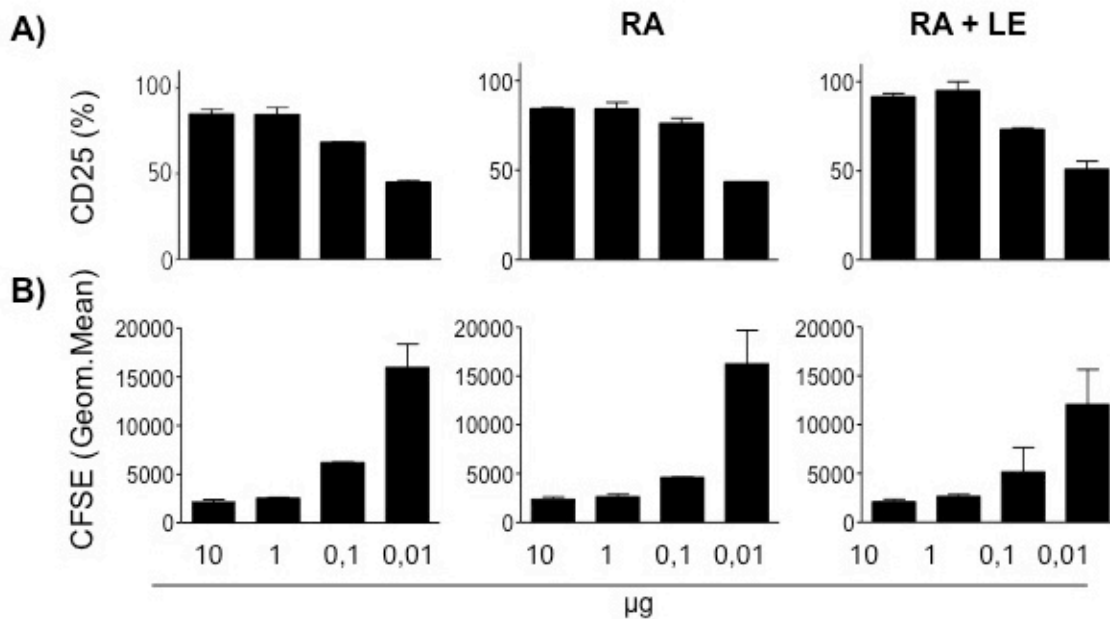


Abb. 18. Einfluss der Aktivierungsstärke auf die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ T-Zellen. Naive, CFSE markierte CD4⁺ T-Zellen und SAPC wurden für sechs Tage mit verschiedenen Konzentrationen eines anti-CD3 Antikörpers und jeweils 1 µg eines anti-CD28 Antikörpers kokultiviert. Die Kokultur erfolgte ohne oder mit Retinolsäure und mit Retinolsäure plus LE 540. Die CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen wurden mit einem anti-CD25 Antikörper markiert und bezüglich ihrer (A) Aktivierung und (B) Proliferation untersucht. Dargestellt sind MW ± SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Es wurde analysiert, welchen Einfluss die Stärke der Aktivierung auf die Expression der *Homing*-Rezeptoren $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CCR9, P-Lig und CD62L hat. Bezüglich der Darm-*Homing*-Moleküle $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 wurde gezeigt, dass sich deren Expression auf CD4⁺ T-Zellen mit abnehmender Aktivierungsstärke Retinolsäure-unabhängig erhöhte. Die Zugabe von Retinolsäure führte zu einer stark erhöhten Expression der Darm-*Homing*-Rezeptoren. Auch hier verstärkte eine abnehmende Aktivierungsstärke die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 zusätzlich. Die Blockierung des Retinolsäure-Signaling durch LE 540 führte in Abhängigkeit von der Aktivierungsstärke zu einer Reduktion der Expression beider Darm-*Homing*-Moleküle (Abb. 19A, B). Die Untersuchung der CD62L-Expression ergab, dass die Expression auf den CD4⁺ T-Zellen mit abnehmender Aktivierung ebenfalls anstieg. Die zusätzliche Anwesenheit von Retinolsäure oder die Inhibition des Retinolsäure-Signaling beeinflussten den Phänotyp nicht (Abb. 19C).

Für P-Lig wurde gezeigt, dass die Expression auf den CD4⁺ T-Zellen über einen großen Konzentrationsbereich des anti-CD3 Antikörpers unverändert blieb und erst bei der niedrigsten Konzentration (0,001 µg) sich verringerte. Die Zugabe von Retinolsäure bewirkte keine Änderung der P-Lig-Expression. Nach Inhibition des Retinolsäure-

Signaling zeigte sich jedoch eine deutlich verstärkte Expression von P-Lig (Abb. 19D).

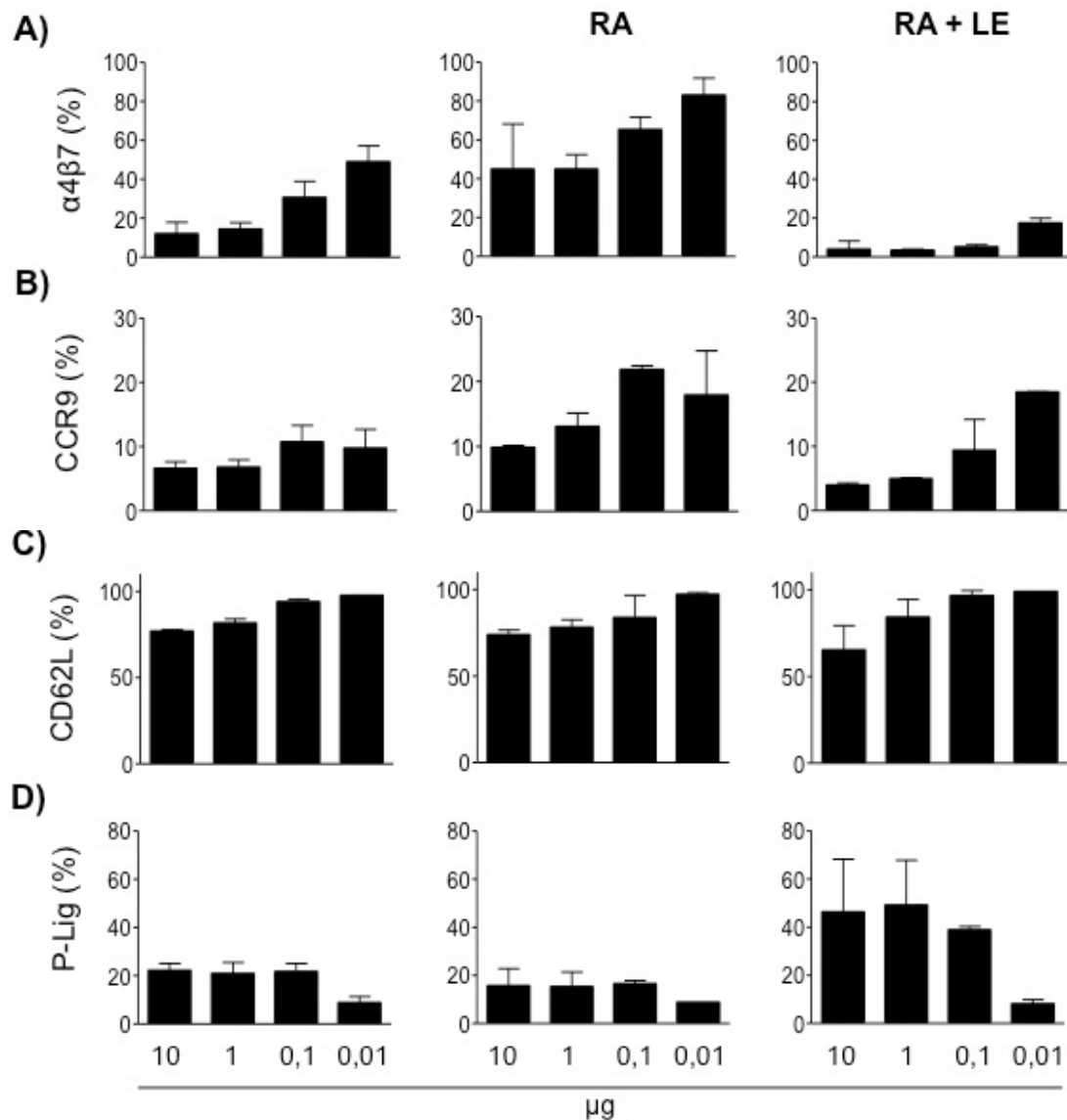


Abb. 19. Einfluss der Aktivierungsstärke auf die Expression von *Homing*-Rezeptoren auf CD4^+ T-Zellen. In An- oder Abwesenheit von Retinolsäure und mit Zusatz von LE 540 wurden naive CD4^+ T-Zellen und SAPC für sechs Tage kokultiviert. Die Aktivierung erfolgte durch ansteigende Konzentrationen eines anti-CD3 Antikörpers und es wurde zusätzlich ein anti-CD28 Antikörper (1 μg) in die Kultur gegeben. Die CD4^+ T-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern markiert und bezüglich ihrer Expression von (A) $\alpha 4\beta 7$, (B) CCR9, (C) CD62L und (D) P-Lig am Durchflusszytometer untersucht. Angegeben sind MW \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde analysiert, ob die Stärke der Aktivierung die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α beeinflusst. Hier wurde gezeigt, dass sich die Expression aller drei Zytokine mit abnehmender Aktivierung der CD4^+ T-Zellen verringert. Weder die Zugabe von Retinolsäure noch die Inhibition des Retinolsäure-Signaling durch LE 540 beeinflussten die Expression von

IFN γ , IL-2 oder TNF α (Abb. 20A-C).

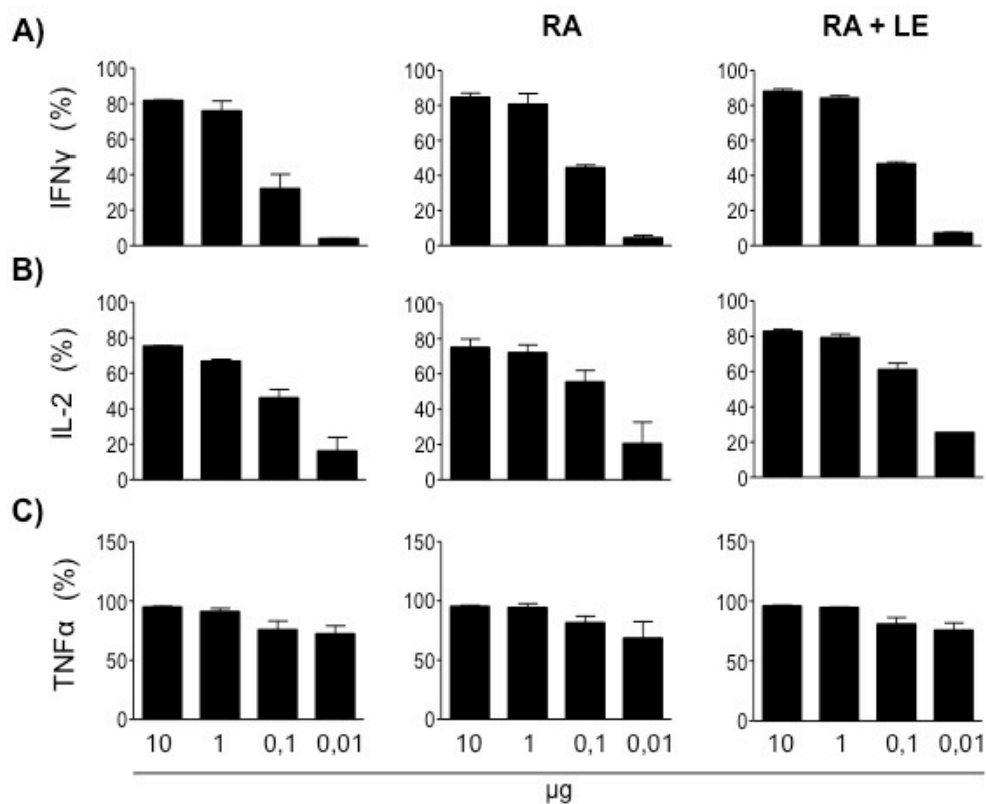


Abb. 20. Einfluss der Aktivierungsstärke auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in CD4⁺ T-Zellen. Naive CD4⁺ T-Zellen und SAPC wurden für sechs Tage mit Retinolsäure, ohne Retinolsäure und mit Retinolsäure und mit Retinolsäure und LE 540 kokultiviert und durch verschiedene Konzentrationen eines anti-CD3 Antikörpers aktiviert. Zur Kostimulation erfolgte eine zusätzliche Gabe eines anti-CD28 Antikörpers (1 μ g). Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern markiert und die Expression der Zytokine (A) IFN γ , (B) IL-2 und (C) TNF α am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind MW \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass in den Kulturansätzen ohne Zugabe von Retinolsäure, mit Retinolsäure und mit Retinolsäure und LE 540, die Expression von α 4 β 7-Integrin, CCR9 und CD62L mit abnehmender Aktivierung steigt. Die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α nahm hingegen mit abnehmender Aktivierung ab. Bezüglich P-Lig wurde bei einer Aktivierung durch 0,1 μ g oder mehr anti-CD3-Antikörper ein konstantes Expressionsniveau detektiert.

Auch wurde durch die Daten verifiziert, dass Retinolsäure zu einer höheren Expression der Darm-Homing-Moleküle führt. Der Einfluss der Retinolsäure konnte durch die Blockade des Retinolsäure-Signaling aufgehoben werden. Außerdem bewirkte die Zugabe des Retinolsäure Rezeptor Inhibitors LE 540 eine Steigerung der P-Lig-

Expression. Auf die Aktivierung, die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IFN γ , IL-2, TNF α) und die Expression von CD62L hatte Retinolsäure in der verwendeten Konzentration von 1 nM zusätzlich zum CD3-Stimulus keinen Einfluss.

3.2.4 Einfluss der Kostimulation

In der Literatur ist beschrieben, dass die Stärke der Kostimulation den Phänotyp von T-Zellen beeinflusst (Constant and Bottomly, 1997; Tao et al., 1997) und dass LSEC nur geringe Mengen der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimieren (Knolle and Gerken, 2000). Diese Datenlage führte zu der Hypothese, dass die geringe Kostimulation durch LSEC für den phänotypischen Unterschied zwischen T_{LSEC} und CD4⁺ T-Zellen, die durch professionelle APC aktiviert wurden, verantwortlich sein könnte. Im Folgenden wurde deshalb erstmalig untersucht, ob ein starkes kostimulatorisches Signal den durch LSEC induzierten Phänotyp in CD4⁺ T-Zellen verändert.

Zur Untersuchung des Einflusses der Kostimulation auf den Phänotyp der T_{LSEC} wurden CFSE-markierte, naive CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von LSEC durch Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid aktiviert und mit oder ohne Zugabe eines anti-CD28 Antikörpers kultiviert. Der Phänotyp der T_{LSEC}, die ohne anti-CD28 Antikörper aktiviert wurden, wurde mit dem Phänotyp von T_{LSEC} verglichen, die durch die Zugabe des anti-CD28 Antikörpers ein zusätzliches kostimulatorisches Signal erhielten. Um LSEC außerdem mit professionellen APC vergleichen zu können, wurden CFSE-markierte, naive CD4⁺ T-Zellen mit SAPC in An- und Abwesenheit eines anti-CD28 Antikörpers aktiviert (T_{SAPC}). Zunächst wurde die Stärke der Aktivierung über die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 untersucht. Es wurde gezeigt, dass ein zusätzliches kostimulatorisches Signal zu einer signifikant erhöhten Expression von CD25 sowohl auf den T_{LSEC} als auch auf den T_{SAPC} führt. Der Vergleich der T_{LSEC} und T_{SAPC} zeigte, dass die CD25-Expression auf den T_{SAPC} generell höher ist, als auf den T_{LSEC}. Auch bei zusätzlicher starker Kostimulation blieb das Aktivierungsniveau der T_{LSEC} signifikant unter dem der T_{SAPC} (Abb. 21A).

In einem nächsten Schritt wurde die Proliferationsrate untersucht. Während ein verstärktes kostimulatorisches Signal zu einer signifikant erhöhten Proliferation der T_{LSEC} führte, hatte es keinen Einfluss auf die Proliferation der T_{SAPC}. Im Vergleich der T_{LSEC} und T_{SAPC} zeigt sich, dass T_{SAPC} insgesamt stärker proliferierten. Auch als die

Proliferation der T_{LSEC} durch die Zugabe eines anti-CD28 Antikörper anstieg, blieb sie signifikant unter der Proliferationsrate der T_{SAPC} (Abb. 21B).

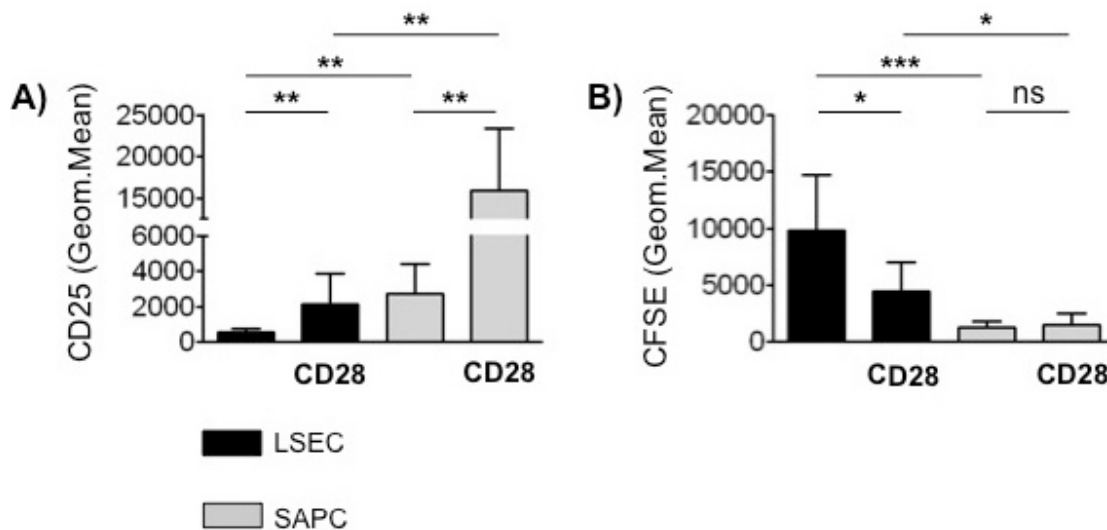


Abb. 21. Einfluss der Kostimulation auf die Aktivierungs- und Proliferationsstärke von antigenspezifisch aktivierten T_{LSEC} und T_{SAPC} . Für sechs Tage wurden OVA-spezifische, CFSE markierte, naive $CD4^+$ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen mit SAPC aus OT2xB6/PL-Mäusen oder LSEC aus C57BL/6-Mäusen kokultiviert. Die Aktivierung erfolgte durch Zugabe von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid und die Kokulturen wurden mit und ohne Zugabe von 1 μ g anti-CD28 Antikörper durchgeführt. Die $CD4^+$ T-Zellen wurden mit einem anti-CD25 Antikörper markiert und hinsichtlich ihrer (A) Aktivierung und (B) Proliferation am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind MW \pm SD aus mindestens vier unabhängigen Experimenten; Mann-Whitney-Test; * = p < 0,05; ** = p < 0,01, ns = nicht signifikant.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Kostimulation auf die Expression des Darm-*Homing*-Moleküls $\alpha 4\beta 7$ -Integrin analysiert. Für T_{LSEC} wurde gezeigt, dass ein stärkeres kostimulatorisches Signal die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin signifikant senkt. Die $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression der T_{SAPC} war hingegen nach Zugabe des anti-CD28 Antikörpers unverändert. Insgesamt war die Expression der Darm-*Homing*-Moleküle auf den T_{LSEC} deutlich höher als auf den T_{SAPC} . Auch bei zusätzlicher Kostimulation und damit Senkung der $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression auf den T_{LSEC} blieb die Expression signifikant stärker als auf den T_{SAPC} (Abb. 22A).

Auch wurde das Darm-*Homing*-Molekül CCR9 untersucht. Hier wurde weder auf den T_{LSEC} noch auf den T_{SAPC} eine signifikante Auswirkung durch die zusätzliche Kostimulation mit anti-CD28 Antikörper gemessen. Vergleicht man die CCR9-Expression der T_{LSEC} und T_{SAPC} ist insgesamt eine stärkere Expression auf den T_{LSEC} zu erkennen. Eine signifikant höhere Expression wurde jedoch nur bei den Zellen gemessen, die ohne zusätzliche Kostimulation aktiviert wurden (Abb. 22B).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Kostimulation auf die CD62L-Expression analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die CD62L-Expression auf den T_{LSEC}

signifikant verringerte, wenn anti-CD28 Antikörper in die Kultur gegeben wurde. Die Untersuchung der T_{SAPC} ergab keine signifikante Änderung der Expression durch Zugabe des anti-CD28 Antikörpers. Im Vergleich der T_{LSEC} und T_{SAPC} wurde gezeigt, dass ohne zusätzliche Kostimulation die CD62L-Expression auf den T_{LSEC} signifikant stärker ist. Bei einer zusätzlichen Kostimulation zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen T_{LSEC} und T_{SAPC} (Abb. 22C).

Anschließend folgte die Messung der P-Lig-Expression. Bezüglich der T_{LSEC} konnte gezeigt werden, dass die P-Lig-Expression signifikant steigt, wenn durch die Anwesenheit von anti-CD28 Antikörper ein zusätzliches kostimulatorisches Signal erteilt wird. Auf den T_{SAPC} wurde dieser Anstieg ebenfalls detektiert. Im Vergleich der T_{LSEC} und T_{SAPC} zeigte sich eine etwa gleich starke P-Lig-Expression. Auch bei zusätzlicher Kostimulation unterschied sich das Level der P-Lig-Expression auf den T_{LSEC} nicht signifikant von der Expressionsstärke auf den T_{SAPC} (Abb. 22D).

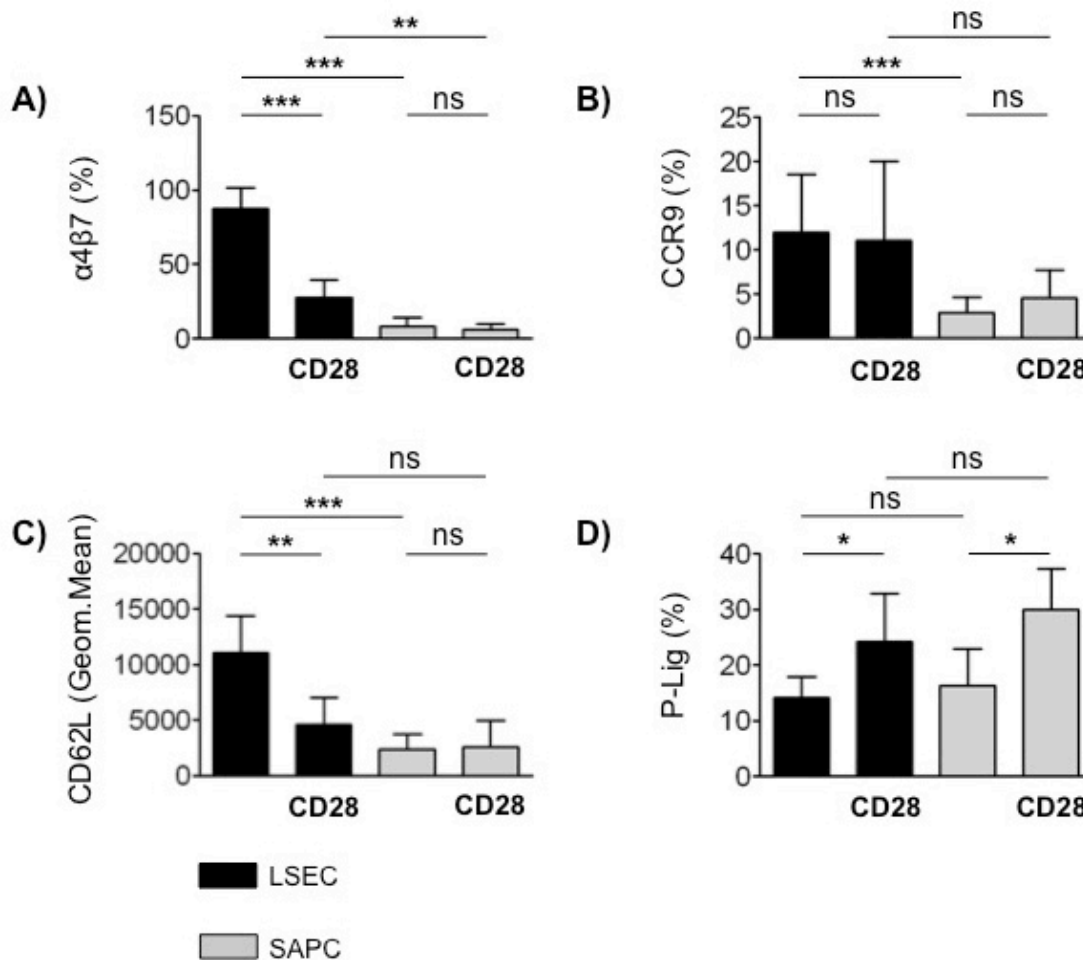


Abb. 22. Einfluss der Kostimulation auf die Expression von *Homing*-Rezeptoren auf antigenspezifisch aktivierten T_{LSEC} und T_{SAPC} . Unter Zugabe von Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid wurden OVA-spezifische naive CD4⁺ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen mit SAPC aus OT2xB6/PL-Mäusen oder LSEC aus C57BL/6-Mäusen sechs Tage kokultiviert. Die Zellen erhielten durch 1 μ g anti-CD28 Antikörper ein kostimulatorisches Signal oder wurden ohne anti-CD28 Antikörper kultiviert. Mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Homing-Rezeptoren (A) $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, (B) CCR9 und (C) CD62L gefärbt. Die P-Lig-Expression wurde durch Färbung mit einem anti-Maus P-Selektin/Mensch-IgG Fc-Chimärprotein und einem anti-Mensch IgG Fc Antikörper ermittelt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte am Durchflusszytometer. Hier angegeben sind MW \pm SD aus mindestens vier unabhängigen Experimenten; Mann-Whitney-Test mit * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

Auch wurde untersucht, welchen Einfluss die Kostimulation auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α hat. Bezüglich IFN γ wurde detektiert, dass die Expression der T_{LSEC} signifikant steigt, wenn anti-CD28 Antikörper in die Kulturen gegeben wurde. Die Expression der T_{SAPC} zeigte hingegen keine signifikante Änderung durch die Zugabe von anti-CD28 Antikörper. Im Vergleich der IFN γ -Expression von T_{LSEC} und T_{SAPC} zeigte sich eine deutlich höhere Expression auf den T_{SAPC} . Die Expression der T_{LSEC} blieb auch mit zusätzlicher Kostimulation signifikant niedriger als die der T_{SAPC} (Abb. 23A).

Für die IL-2-Expression wurde gezeigt, dass sich die Expression der T_{LSEC} und T_{SAPC}

durch die Zugabe des anti-CD28 Antikörpers nicht signifikant änderte. Der Vergleich der T_{LSEC} und T_{SAPC} untereinander zeigte eine höhere Expression in den Kulturen mit SAPC. Auch bei starker Kostimulation blieb die IL-2-Expression der T_{LSEC} signifikant niedriger als die der T_{SAPC} (Abb. 23B).

Die Untersuchung der TNF α -Expression in T_{LSEC} und T_{SAPC} ergab ebenfalls keine signifikante Änderung der Expressionsstärke durch eine zusätzliche Kostimulation. Im Vergleich der TNF α -Expression in den T_{LSEC} und T_{SAPC} wurde eine höhere Expression in den T_{SAPC} gemessen. Auch hier blieb trotz zusätzlicher Kostimulation die TNF α -Expression der T_{LSEC} signifikant niedriger als die Expression der T_{SAPC} (Abb. 23C).

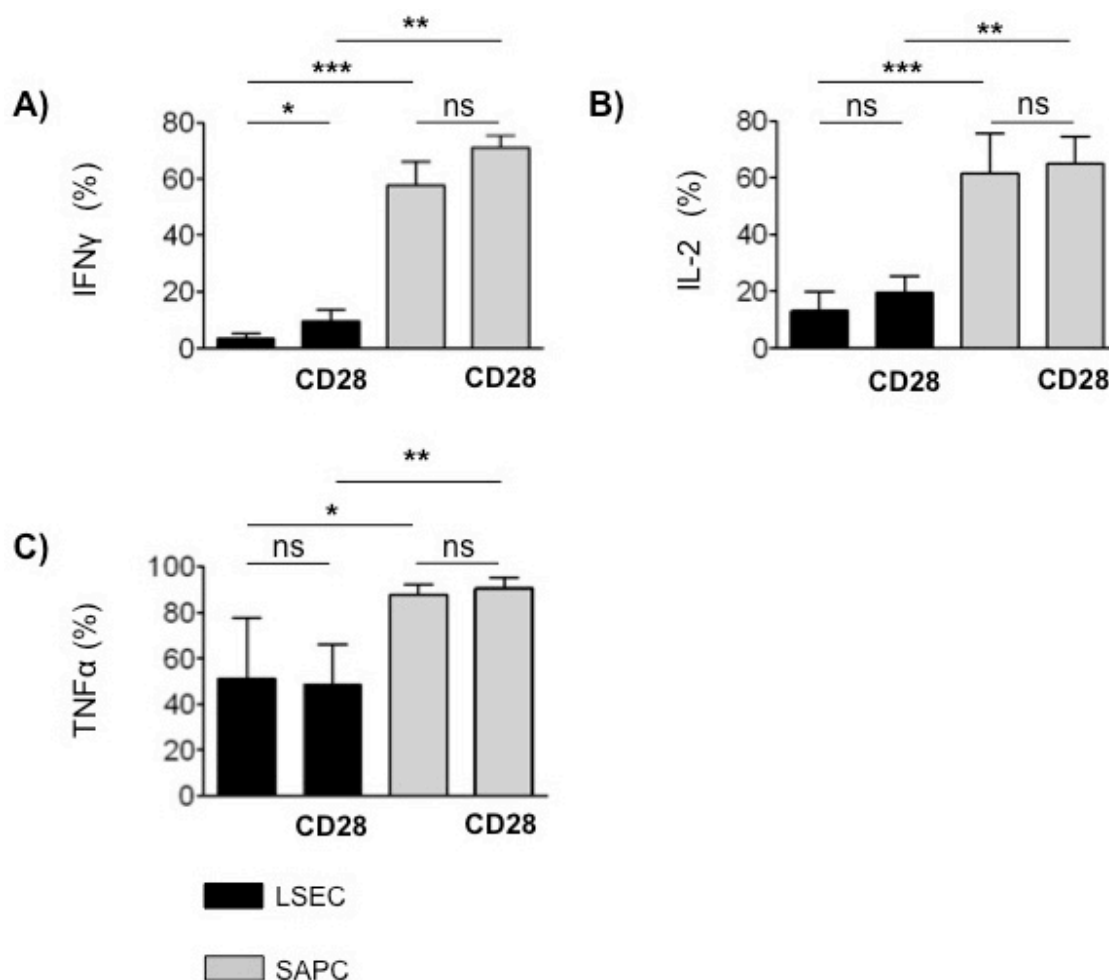


Abb. 23. Einfluss der Kostimulation auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in antigenspezifisch aktivierten T_{LSEC} und T_{SAPC} . Naive OVA-spezifische $CD4^+$ T-Zellen aus OT2xB6/PL-Mäusen wurden sechs Tage mit SAPC aus OT2xB6/PL-Mäusen oder LSEC aus C57BL/6-Mäusen in An- und Abwesenheit von 1 μ g anti-CD28 Antikörper kultiviert. Die Zellen wurden durch Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid aktiviert, mit (A) anti-IFN γ , (B) anti-IL-2 und (C) anti-TNF α gefärbt und die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer. MW \pm SD wurden aus mindestens vier unabhängigen Experimenten berechnet. Mann-Whitney-Test mit * = $p < 0,05$, ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass T_{LSEC} durch ein zusätzliches kostimulatorisches Signal stärker aktiviert werden, stärker proliferieren, weniger $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CD62L sowie mehr P-Lig- und IFN γ exprimieren. Bezüglich der T_{SAPC} führte die Zugabe von anti-CD28 Antikörper zu einer signifikanten Zunahme der Aktivierung und der Expression von P-Lig. Ohne zusätzliche Kostimulation zeigte sich im Vergleich der T_{LSEC} und T_{SAPC} , dass T_{LSEC} schwächer aktiviert sind, schwächer proliferieren, signifikant mehr Darm-*Homing*-Moleküle und CD62L exprimieren und signifikant weniger proinflammatorische Zytokine exprimieren. Auch bei zusätzlicher Kostimulation der T_{LSEC} bleibt die Aktivierung und Proliferation der Zellen niedriger, die Expression der Darm-*Homing*-Rezeptoren höher und das Expressionsniveau der proinflammatorischen Zytokine geringer als auf den T_{SAPC} .

4 Diskussion

Mit dem Blut aus der Pfortader und der Leberarterie gelangen $CD4^+$ T-Zellen in die Leber und interagieren dort mit professionellen APC der Leber und den nicht-professionellen sinusoidalen Endothelzellen (Knolle and Limmer, 2003). Während bekannt ist, dass LSEC-aktivierte $CD4^+$ T-Zellen nur wenig proinflammatorische Zytokine exprimieren und in den Darm migrieren (Kruse et al., 2009; Neumann et al., 2012), wurde bisher nicht untersucht, ob der LSEC-induzierte Phänotyp durch die zusätzliche Aktivierung durch LAPC beeinflusst wird.

Im Fokus dieser Arbeit standen zwei Aspekte der Interaktion von $CD4^+$ T-Zellen mit hepatischen APC. Zum einen wurde der LAPC-induzierte Phänotyp analysiert und untersucht, ob der durch die nicht-professionellen LSEC induzierte Phänotyp auch in Anwesenheit von professionellen LAPC stabil ist, beziehungsweise welche Änderungen durch LAPC induziert werden. Zum anderen wurden die Mechanismen analysiert, die für den Phänotyp von hepatisch aktivierten $CD4^+$ T-Zellen verantwortlich sind.

4.1 Einfluss von professionellen LAPC und nicht-professionellen LSEC auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten $CD4^+$ T-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete Zellpopulation der LAPC setzt sich aus $2,8 \pm 2,7$ % dendritischen Zellen, $3,7 \pm 3,0$ % Makrophagen und $74,4 \pm 7,0$ % B-Zellen zusammen. Dieses Zellverhältnis stimmt nicht mit dem histologischen *in situ* Nachweis überein, wo sich eine Verteilung von dendritischen Zellen zu Makrophagen zu B-Zellen von 1:10:2 ergab. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass die Hauptpopulation der professionellen LAPC aus Makrophagen besteht (Racanelli and Rehermann, 2006). Um das *in vivo* Zellverhältnis nachzustellen, wurde zunächst versucht, eine Isolierungsstrategie zur Sortierung der einzelnen LAPC-Populationen zu etablieren. Die schlechte Zellausbeute und Reinheit machte es jedoch nicht möglich, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen im Rahmen dieser medizinischen Doktorarbeit einzeln zu isolieren. Auch eine Depletion von B-Zellen war auf Grund der Zellzahlen nicht möglich.

Es ist davon auszugehen, dass durch die angewandte Isolierungsstrategie B-Zellen angereichert werden, während Makrophagen und dendritische Zellen verloren gehen. Es wurde gezeigt, dass dendritische Zellen unter entzündlichen Bedingungen die MHC-II-Expression hoch regulieren (Cella et al., 1997) und Makrophagen aus der Leber mehr

MHC-II exprimieren, wenn eine entzündliche Lebererkrankung vorliegt (Burgio et al., 1998). Da die hier verwendeten LAPC aus gesunden Mäusen isoliert wurden, könnte eine niedrige MHC-II-Expression für die geringe Anreicherung von Makrophagen und dendritischen Zellen durch den MHC-II-Sort ursächlich sein.

In dieser Arbeit wurde erstmalig mit einer Mischung von dendritischen Zellen, Kupffer-Zellen und B-Zellen, anstatt mit den einzelnen Zellpopulationen der professionellen APC gearbeitet. Während der Phänotyp von T-Zellen, die durch Kupffer-Zellen oder dendritische Zellen in der Leber aktiviert wurden, gut untersucht ist, gibt es nur wenige Studien, die sich mit der immunologischen Wirkung von hepatischen B-Zellen beschäftigt haben.

In der Literatur ist beschrieben, dass APC Populationen der Leber einen tolerogenen Phänotyp induzieren (Bertolino et al., 2002; Lau et al., 2003; Carambia and Herkel, 2010; Jenne and Kubes, 2013) und die Aktivierung von T-Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen in der Leber zur Bildung von regulatorischen T-Zellen führt (Wiegard et al., 2005; Bamboat et al., 2009; Breous et al., 2009). Für B-Zellen ist bekannt, dass sie im Rahmen einer primären biliären Cholangitis tolerogen wirken (Moritoki et al., 2009; Dhirapong et al., 2011).

Der in dieser Arbeit detektierte Phänotyp der LAPC-aktivierten $CD4^+$ T-Zellen zeigte im Gegensatz zu dem in der Literatur beschriebenen Phänotyp eine höhere Expression der proinflammatorischen Zytokine. Die Expression der proinflammatorischen Zytokine durch T_{LAPC} blieb jedoch unter dem Niveau von $CD4^+$ T-Zellen, die durch professionelle APC der Milz aktiviert wurden. Im Vergleich zu T_{LSEC} exprimierten T_{LAPC} die proinflammatorischen Zytokine $INF\gamma$, IL-2 und $TNF\alpha$ verstärkt während die *Homing*-Rezeptoren für den Darm ($\alpha4\beta7$ -Integrin, CCR9) und Lymphknoten (CD62L) schwächer exprimiert wurden. Kokulturen, wo $CD4^+$ T-Zellen durch beide APC-Populationen aktiviert wurden, zeigten zum ersten Mal eine Dominanz des LSEC-induzierten Darm-*Homing*-Phänotyps sowie eine LSEC-vermittelte Reduktion der Expression des proinflammatorischen Zytokines $INF\gamma$. Bezüglich der Expression von CD62L, IL-2 und $TNF\alpha$ überwiegte der Einfluss der LAPC.

Für die hohe Expression der proinflammatorischen Zytokine durch die hier gezeigten T_{LAPC} können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Eine Möglichkeit wäre die Aktivierung der LAPC während der Isolierungsstrategie, die daraufhin einen eher proinflammatorischen Phänotyp begünstigen.

Ebenso könnte ein zu geringes IL-10- Level während der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen dem inflammatorischen Phänotyp der T_{LAPC} zugrunde liegen. Kupffer-Zellen stellen IL-10 zur Verfügung (Erhardt et al., 2007). Da in den LAPC-Kokulturen jedoch nur 3-4% Makrophagen enthalten sind, kann vermutet werden, dass das vorhandene IL-10 nicht ausreicht, um einen tolerogenen Phänotyp aufrechtzuerhalten. Eine Messung der IL-10-Konzentration wurde in dieser Arbeit jedoch nicht vorgenommen.

Auch der hohe Anteil von B-Zellen in den generierten LAPC-Kulturen könnte die Expression der proinflammatorischen Zytokine induzieren. Es wurde gezeigt, dass hepatische B-Zellen nach LPS-Stimulation IFN γ und IL-12 produzieren (Matsumoto et al., 2006). Zhang et al. detektierte, dass hepatische B-Zellen im Vergleich zu B-Zellen aus der Milz nach LPS-Stimulation vermehrt IFN γ und nur wenig IL-10 exprimieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass dendritische Zellen aus B-Zell-defizienten Mäusen weniger proinflammatorische Zytokine und mehr IL-10 exprimieren (Zhang et al., 2013). Die Daten belegen demnach nicht nur, dass B-Zellen die Immunantwort in Richtung Inflammation beeinflussen, sondern auch den potentiell tolerogenen Phänotyp von dendritischen Zellen unterdrücken können. Eine solche Beeinflussung durch die hohe Anzahl an B-Zellen in den verwendeten LAPC wäre auch in den hier gezeigten Kokulturen denkbar.

Ein weiterer Mechanismus der den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinflusst, ist vermutlich die Breitstellung von IL-12. Da IL-12 die IFN γ -Expression durch T-Zellen induziert (Trinchieri, 1995) und LSEC kein IL-12 exprimieren (Knolle et al., 1999), kann angenommen werden, dass das Fehlen von IL-12 zur geringen IFN γ -Expression durch T_{LSEC} führt. Für Kupffer-Zellen wurde hingegen gezeigt, dass sie nach Stimulation mit zum Beispiel LPS IL-12 produzieren (Seki et al., 2000). Auch die hohe IFN γ -Expression durch T_{LAPC} zeigt, dass IL-12 durch die in dieser Arbeit isolierten LAPC zur Verfügung gestellt werden muss. Da T_{LSEC/LAPC} eine signifikant geringere IFN γ -Expression zeigen als T_{LAPC}, jedoch mehr IFN γ exprimieren als T_{LSEC}, kann vermutet werden, dass LAPC die IFN γ -Expression durch IL-12 induzieren, während die Expression durch weitere LSEC-vermittelte Mechanismen reduziert wird.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte Carambia et al., dass die Anwesenheit von zusätzlichen LSEC die IFN γ -Expression von CD4⁺ T-Zellen senkt, die durch dendritische Zellen aus der Milz aktiviert wurden. Die Suppression der IFN γ -Expression war deutlich geringer, wenn der Zellkontakt zwischen LSEC und

dendritischen Zellen verhindert wurde (Carambia et al., 2013). Auch Schildberg et al. detektierte, dass der Zellkontakt zwischen LSEC und dendritischen Zellen dazu führt, dass dendritische Zellen weniger CD80/86 und IL-12 exprimieren und damit weniger inflammatorisch wirken (Schildberg et al., 2008). Es kann demnach postuliert werden, dass auch der Zell-Zell-Kontakt zwischen LSEC und LAPC an der LSEC-induzierten Reduktion der IFN γ -Expression in T_{LSEC/LAPC} beteiligt ist.

Das koinhibitorische Molekül PD-L1 wird auf LSEC in hohem Maße exprimiert und gehört zu den LSEC-vermittelten Toleranzmechanismen (Iwai et al., 2003; Maier et al., 2007; Diehl et al., 2008; Crispe, 2011). Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen, dass auch LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen PD-1 exprimieren (Doktorarbeit Enver Tahir) und Carambia et al. zeigte, dass LSEC die IFN γ -Expression nur inhibieren, wenn die CD4⁺ T-Zellen PD-1 exprimieren (Carambia et al., 2013). Da die PD-L1-Expression in IL-10^{-/-}-Mäusen deutlich niedriger ist als in Wildtyp-Mäusen ist davon auszugehen, dass die Expression des koinhibitorischen Moleküls eng mit dem IL-10-Signalweg verknüpft ist. (Wölfle et al., 2011; Carambia et al., 2013). Diese Daten weisen darauf hin, dass auch die LSEC-induzierte IFN γ -Reduktion in T_{LSEC/LAPC} durch den IL-10-Signalweg und die Expression von PD-L1 beeinflusst wird.

Da die Mechanismen, die den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinflussen, bislang noch nicht vollständig geklärt sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Einflussmöglichkeiten untersucht: Der Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC, der Einfluss von Retinolsäure sowie der Einfluss der Aktivierungsstärke und Kostimulation. Ziel war es die Mechanismen zu identifizieren, die den unterschiedlichen Phänotyp der T_{LSEC} und T_{LAPC} erklären und der LSEC-vermittelten Dominanz des Darm-*Homing*-Phänotyps sowie der Reduktion der IFN γ -Expression zugrunde liegen.

4.2. Einfluss der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch LSEC auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Als nicht-professionelle APC exprimieren LSEC weniger MHC-II als professionelle APC und induzieren dadurch einen anderen Phänotyp in CD4⁺ T-Zellen (Knolle et al., 1998). Die niedrige MHC-II-Expression auf LSEC ist IL-10 abhängig reguliert (Moore et al., 2001; Diehl et al., 2008; Carambia et al., 2013).

Durch Kultivierung von LAPC mit LSEC aus Wild-Typ und MHCII^{-/-} Mäusen wurde in der

vorliegenden Arbeit untersucht, ob der gezeigte Unterschied im Phänotyp von T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ auf die Antigenpräsentation durch LSEC zurückzuführen ist. Es wurde gezeigt, dass die MHC-II vermittelte Antigenpräsentation durch LSEC bei gleichzeitiger Antigenpräsentation durch LAPC keinen Einfluss auf den Phänotyp der aktivierten $CD4^+$ T-Zellen hat. Die Daten schließen demnach aus, dass die niedrige MHC-II-Expression auf LSEC für den unterschiedlichen Phänotyp von T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ verantwortlich ist und zeigen, dass bei gleichzeitiger Antigenpräsentation durch professionelle und nicht-professionelle APC das Signal zur $CD4^+$ T-Zell-Aktivierung und Differenzierung eher von den professionellen APC kommt.

4.3 Einfluss der durch LSEC zur Verfügung gestellten Retinolsäure auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten $CD4^+$ T-Zellen

Für die Induktion darmspezifischer *Homing*-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen ist die Bereitstellung von Retinolsäure ein notwendiger Faktor (Iwata et al., 2004). LSEC exprimieren die entsprechenden Retinal-Dehydrogenasen (RALDH)-1 und RALDH4, um Retinolsäure aus Vitamin A zu metabolisieren und induzieren so die Expression der Darm-*Homing*-Moleküle $\alpha4\beta7$ -Integrin und CCR9 (Neumann et al., 2012). Die Retinolsäure-abhängige Expression der Darm-*Homing*-Rezeptoren auf T_{LSEC} wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Ausgehend von diesen Daten wurde erstmals untersucht, ob die Bereitstellung von Retinolsäure auch den Phänotyp von T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass auch LAPC in der Lage sind, in Abhängigkeit von Retinolsäure die Expression von $\alpha4\beta7$ -Integrin in $CD4^+$ T-Zellen zu induzieren und die Expression von P-Lig, ein für die Migration in die Haut und entzündetes Gewebe notwendiger *Homing*-Rezeptor, zu inhibieren. Im Gegensatz zur Expression von $\alpha4\beta7$ -Integrin wurde eine Retinolsäure-induzierte Expression des Darm-*Homing*-Rezeptors CCR9 nur auf den T_{LSEC} detektiert. Die Expression des Lymphknoten-*Homing*-Rezeptors CD62L auf T_{LSEC} oder T_{LAPC} wurde nicht durch Retinolsäure induziert oder verstärkt.

Diese Daten belegen, dass die von allen APC der Leber bereitgestellte Retinolsäure ausreichend ist, um die Migration in die Haut zu unterdrücken, während die Migration in den Darm verstärkt wird. Übereinstimmend mit diesen Daten zeigten auch vorangegangene Studien, dass die $\alpha4\beta7$ -Integrin- und P-Lig-Expression invers

korrelieren (Svensson et al., 2008; Neumann et al., 2012). Darüber hinaus verdeutlichen die Ergebnisse die Dominanz der LSEC bei der Induktion eines Darm-Homing-Phänotyps. Während T_{LSEC} und $T_{LSEC/LAPC}$ eine hohe $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression zeigten, die mit dem Phänotyp von $CD4^+$ T-Zellen vergleichbar ist, die durch dendritische Zellen aus dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe aktiviert wurden (Mora et al., 2003; Johansson-Lindbom et al., 2005), zeigten T_{LAPC} eine signifikant niedrigere Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin. Dies könnte damit zusammenhängen, dass LAPC die zur Umwandlung von Retinolsäure notwendigen RALDH in geringerer Menge exprimieren als LSEC und damit weniger Retinolsäure zur Verfügung stellen.

Die fehlende Retinolsäure-abhängige CCR9-Expression auf T_{LAPC} und $T_{LSEC/LAPC}$ könnte darauf hinweisen, dass für die Expression von CCR9 eine höhere Konzentration von Retinolsäure notwendig ist als für die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin. Da jedoch auch LSEC in den $T_{LSEC/LAPC}$ keine erhöhte CCR9-Expression induzieren, scheinen an der Induktion von CCR9 noch andere, bisher nicht geklärte Mechanismen, beteiligt zu sein, die bei der $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression keine Rolle spielen. Auch wäre denkbar, dass die CCR9-Expression in den $T_{LSEC/LAPC}$ -Kokulturen durch Faktoren, die in den reinen LSEC-Kokulturen fehlen, verhindert wird, wie beispielsweise IL-12.

Bezüglich der Expression von CD62L stimmen die Daten der vorliegenden Arbeit mit anderen Studien überein, die einen nur geringen Einfluss von Retinolsäure auf die Expression von CD62L nach APC-unabhängiger Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen beschreiben (Iwata et al., 2004) und verdeutlichen, dass CD62L in T-Zellen über andere Mechanismen induziert wird.

Die Analyse der Expression von inflammatorischen Zytokinen durch hepatisch aktivierte $CD4^+$ T-Zellen zeigte zum ersten Mal, dass die von den Leber-APC-Populationen bereitgestellte Retinolsäure zu einer Suppression des inflammatorischen Zytokins IFN γ führt. Auch die IL-2-Expression von LSEC- und LAPC-aktivierten $CD4^+$ T-Zellen konnte durch die Inhibition des Retinolsäure-Rezeptors gesteigert werden. Die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF α wurde hingegen nicht durch die Blockade des Retinolsäure-*Signaling* beeinflusst.

Die Retinolsäure-induzierte IFN γ - und IL-2-Reduktion zeigt einen neuen, bisher für die Leber nicht beschriebenen Toleranzmechanismus. Die Ergebnisse unterstützen bereits veröffentlichte Daten, die belegen, dass Retinolsäure die Differenzierung zu IFN γ produzierenden Th1 Zellen supprimiert (Cantorna et al., 1994, 1996; Kang et al., 2000; Iwata et al., 2003). Cantorna et al. beschreibt durch die Zugabe von Retinolsäure eine

Reduktion der IFN γ -Expression von Th1 Zellen um 50% (Cantorna et al., 1994). Iwata et al. untersuchte den Effekt der Retinolsäure unter Th1/Th2 Bedingungen und zeigte eine Suppression von Th1 Zellen und Induktion von Th2 Zellen (Iwata et al., 2003). Kang et al. zeigte, dass Retinolsäure die Interleukin-12 Produktion von Makrophagen aus der Milz inhibiert und so zu einer IFN γ -Suppression und IL-4 Induktion in CD4⁺ T-Zellen führt (Kang et al., 2000). Es ist außerdem festzuhalten, dass trotz Zugabe des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors die Expression der in dieser Arbeit untersuchten proinflammatorischen Zytokine auf T_{LSEC} deutlich unter dem Niveau der T_{LAPC} und T_{LSEC/LAPC} bleibt. Dies ist vermutlich auf das Fehlen von IL-12 in den LSEC-Kulturen zurückzuführen (Knolle et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren gezeigt, dass die Retinolsäure-induzierte Senkung der IFN γ -Expression in CD4⁺ T konzentrationsabhängig ist. Bei einer Retinolsäurekonzentration von 0,1 nM konnte kein Einfluss der Retinolsäure auf die IFN γ -Expression mehr nachgewiesen werden, während der Effekt der Retinolsäure auf die α 4 β 7-Integrin-Expression erhalten blieb. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde bereits eine Konzentrationsabhängigkeit der Retinolsäure-induzierten IFN γ -Suppression nachgewiesen. Diese Daten zeigten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss durch Retinolsäure bei einer Konzentration von 0,1 nM (Iwata et al., 2003).

Der Einfluss des Retinolsäure-Rezeptor-Inhibitors LE 540 auf den Phänotyp von T_{LAPC} hat gezeigt, dass auch in den LAPC-Kulturen Retinolsäure enthalten ist. Diese Beobachtung führte zu der These, dass LAPC Retinolsäure aus der Leber in die Kultur transportieren, ohne sie aktiv aus Vitamin A zu metabolisieren. Ein Transport von Retinolsäure durch APC wurde bereits für dendritische Zellen aus Schweinen gezeigt. Die Zellen transportierten Retinolsäure in die Kultur, wenn sie zuvor mit Retinolsäure inkubiert und anschließend gewaschen wurden (Saurer et al., 2007). Da die Leber das größte Vitamin A-Reservoir des Körpers ist und LSEC Vitamin A zu Retinolsäure metabolisieren (Neumann et al., 2012), wurde untersucht, ob die von uns verwendeten LAPC ebenfalls Retinolsäure in die Kultur transportieren. Diese These konnte jedoch nicht bestätigt werden. Wahrscheinlicher ist, dass LAPC in geringem Maße selbst die entsprechenden Enzyme exprimieren, um Vitamin A zu Retinolsäure zu metabolisieren. Diese Annahme wird durch eine Studie unterstützt, die zeigt, dass APC aus der Milz im Gegensatz zu dendritischen Zellen aus dem Darm ein niedriges Retinolsäure-*Signaling* vermitteln, das ausreichend ist, um eine niedrige α 4 β 7-Integrin-Expression, jedoch

keine CCR9-Expression zu induzieren (Svensson et al., 2008). Ob LAPC in der Lage sind, Retinolsäure aus Vitamin A zu metabolisieren, wird in weiterführenden Studien untersucht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse in allen untersuchten Kulturen eine Retinolsäure-abhängige Induktion des Darm-*Homing*-Rezeptors $\alpha 4\beta 7$ -Integrin sowie eine Suppression von P-Lig und IFN γ . Damit belegen die Ergebnisse erstmalig, dass auch der LAPC-induzierte Phänotyp von CD4⁺ T Zellen durch die Bereitstellung von Retinolsäure beeinflusst wird. Das Retinolsäure-*Signaling* ist demnach ein Mechanismus, der den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T Zellen beeinflusst. Außerdem kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die unterschiedliche Retinolsäurekonzentration, die durch LSEC und LAPC zur Verfügung gestellt wird, für den unterschiedlichen Phänotyp der T_{LSEC} und T_{LAPC} verantwortlich ist und zur LSEC-induzierten Verstärkung der $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression und Reduktion der IFN γ -Expression in T_{LSEC/LAPC} beiträgt.

4.4 Einfluss der Aktivierung auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Die Antigen dosis und die Stärke der Stimulation des TCR beeinflussen den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen (Constant et al., 1995; Rothoef et al., 2003; Keck et al., 2014). Die IL-10-reiche Umgebung der LSEC führt zu einer niedrigen MHC-II-Expression auf LSEC und damit zu einer niedrigen Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen (Knolle et al., 1998; Moore et al., 2001; Diehl et al., 2008). LAPC sind hingegen professionelle APC, die trotz des tolerogenen Milieus in der Leber stärker MHC-II exprimieren und damit eine stärkere T-Zell-Aktivierung induzieren (Knolle et al., 1998; Diehl et al., 2008). Deshalb wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die geringe Aktivierung durch die nicht-professionellen LSEC für die phänotypischen Unterschiede zwischen T_{LSEC}, T_{LAPC} und T_{LSEC/LAPC} verantwortlich ist.

Über den Zusammenhang zwischen der Aktivierungsstärke und der Expression von *Homing*-Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen ist bisher nur wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CCR9 und CD62L auf CD4⁺ T-Zellen mit steigender Aktivierung sinkt und die P-Lig-Expression bei starker Aktivierung ansteigt. Während die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CCR9 und CD62L jedoch kontinuierlich sank, wurde für die Expression von P-Lig ab einer Konzentration

von 0,1µg anti-CD3 Antikörper ein ähnlich starkes Expressionsniveau detektiert.

Die bei niedriger Aktivierung steigende Expression der Darm-*Homing*-Moleküle auf CD4⁺ T-Zellen entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten für CD8⁺ T-Zellen. Svensson et al. untersuchte den Einfluss der Antigenendosis auf die Expression von *Homing*-Rezeptoren und zeigte, dass CD8⁺ T-Zellen, die von dendritischen Zellen aus der Milz oder den mesenterialen Lymphknoten aktiviert wurden, bei geringer Antigenendosis mehr α4β7-Integrin exprimieren. Für T-Zellen, die von dendritischen Zellen aus mesenterialen Lymphknoten aktiviert wurden, konnte auch bezüglich der CCR9-Expression ein Einfluss der Antigenendosis gezeigt werden. Die erhöhte Expression der Darm-*Homing*-Rezeptoren bei niedriger Aktivierung stand dabei nicht mit einer durch die Antigenendosis induzierten Beeinflussung des Retinolsäure-*Signaling* im Zusammenhang (Svensson et al., 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von α4β7-Integrin, CCR9, CD62L und P-Lig sowohl in den Kulturen mit als auch ohne Retinolsäure von der Aktivierungsstärke abhängig ist. Die Daten belegen damit, dass sowohl die Aktivierungsstärke als auch das Retinolsäure-*Signaling* die Expression von *Homing*-Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen beeinflussen.

Bezüglich der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die IFNγ-, IL-2- und TNFα-Expression in CD4⁺ T-Zellen mit abnehmender Aktivierung sinkt. Diese Ergebnisse reihen sich in eine Anzahl von Studien ein, die belegen, dass die Antigenendosis die Zytokinexpression von verschiedenen T-Zell-Populationen beeinflusst (Carballido et al., 1992; Hosken et al., 1995; Secrist et al., 1995; Keck et al., 2014). Beispielsweise sinkt die IFNγ-Expression von CD8⁺ T-Zellen mit abnehmender Peptiddosis. Hier wurde detektiert, dass eine TCR-Stimulation von 20-50% erforderlich ist, um eine IFNγ-Expression in zytotoxischen T-Zellen zu induzieren (Valitutti et al., 1996). Auch wurde gezeigt, dass eine hohe Antigenendosis und eine steigende Aktivierung zu IFNγ- und IL-2-produzierenden Th1 Zellen führen. Eine extrem hohe (>10µM OVA_{323.3391}) oder extrem niedrige (<0,05µM OVA_{323.3391}) Antigenkonzentration führte dagegen zu IL-4 produzierenden Th2 Zellen (Hosken et al., 1995).

Der in dieser Arbeit gezeigte Effekt der Aktivierungsstärke auf die Expression von *Homing*-Rezeptoren und proinflammatorischen Zytokinen ist vermutlich nur ein Teil des Einflusses der durch den T-Zell-Rezeptor-Liganden ausgelöst wird. Die Potenz des T-Zell-Rezeptor-Agonisten oder die Dauer der Stimulation könnten weitere Faktoren sein, die den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen beeinflussen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten zum ersten Mal, dass die Expression von *Homing*-Molekülen und proinflammatorischen Zytokine auf CD4⁺ T-Zellen durch die Aktivierungsstärke reguliert wird. Die geringe LSEC-vermittelte Aktivierung ist somit ein Mechanismus, der die LSEC-induzierte starke Expression der Darm- und Lymphknoten-*Homing*-Moleküle, die geringe P-Lig-Expression sowie die geringe Expression der proinflammatorischen Zytokine erklärt. Es ist davon auszugehen, dass die Aktivierungsstärke ein weiterer Mechanismus ist, der den unterschiedlichen Phänotyp der T_{LSEC} und T_{LAPC} prägt. Da die Aktivierung durch professionelle APC zu einer starken T-Zell-Aktivierung führt, ist jedoch nicht anzunehmen, dass die geringe MHC-II-Expression durch LSEC und die damit verbundene schwache Aktivierung für den unterschiedlichen Phänotyp der T_{LAPC} und T_{LSEC/LAPC} verantwortlich ist.

4.5 Einfluss der Kostimulation auf den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass die geringe Aktivierungsstärke den Phänotyp von LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen prägt, wurde untersucht, ob auch die Kostimulation den Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinflusst. LSEC exprimieren das koinhibitorische Molekül PD-L1 in hohem Maße, während die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nur wenig exprimiert werden (Diehl et al., 2008). Als ursächlich für die geringe Expression der kostimulatorischen Moleküle und die hohe Expression des koinhibitorischen Moleküls PD-L1 wurde die IL-10-reiche Umgebung der LSEC detektiert (Knolle et al., 1998; Carambia et al., 2013). Für CD8⁺ T-Zellen wurde gezeigt, dass LSEC durch Expression von PD-L1 eine geringe IFN γ - und IL-2-Expression induzieren. Die tolerogene Wirkung der Zellen konnte jedoch durch die Zugabe eines kostimulierenden anti-CD28 Antikörpers aufgehoben werden (Maier et al., 2007; Diehl et al., 2008), was bedeutet, dass ein starkes kostimulatorisches Signal die Wirkung des koinhibitorischen Signals durch LSEC aufheben kann. Ob dies auch für LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen zutrifft, war nicht klar und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Es wurde erstmalig analysiert, welchen Einfluss die Kostimulation auf die Expression von *Homing*-Rezeptoren auf T_{LSEC} hat. Die erhobenen Daten zeigen, dass die Induktion des Darm-*Homing*-Rezeptors $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf T_{LSEC} bei starker Kostimulation sinkt, jedoch weiterhin signifikant höher exprimiert wird, als auf CD4⁺ T-Zellen, die durch Milz

APC aktiviert wurden. Die Untersuchung des Lymphknoten-*Homing*-Rezeptors CD62L ergab bei zusätzlicher Kostimulation eine signifikante Senkung der Expression auf den T_{LSEC} , so dass das Expressionsniveau einem ähnlichen Level wie auf den T_{SAPC} entsprach. Die Expression von P-Lig wurde durch die zusätzliche Kostimulation sowohl auf T_{LSEC} als auch auf T_{SAPC} gesteigert.

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass der LSEC-induzierte Darm-*Homing*-Phänotyp in $CD4^+$ T-Zellen auch bei starker Kostimulation erhalten bleibt, beziehungsweise induziert wird. Zusammen mit den Daten, die zeigen, dass LSEC zu einer erhöhten $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression in $T_{LAPC/LSEC}$ führen, weisen die Ergebnisse auf eine Dominanz des LSEC-induzierten Retinolsäure-*Signalings* bei der Induktion dieses Darm-*Homing*-Moleküls hin. Die Potenz des Retinolsäure-induzierten Phänotyps bei starker Kostimulation wurde bereits in einem anderen Zusammenhang beschrieben. Die Differenzierung zu $FoxP3^+$ T_{regs} wird bei starker Kostimulation zwar gemindert, kann jedoch durch die Zugabe von Retinolsäure aufrechterhalten werden (Benson et al., 2007). Auch zeigen die Ergebnisse, dass die hohe CD62L-Expression auf den T_{LSEC} entscheidend von der geringen Kostimulation durch LSEC abhängt und nach optimaler Kostimulation nicht aufrecht erhalten werden kann. Da für die Expression von P-Lig sowohl auf den T_{LSEC} als auch auf den T_{SAPC} eine höhere Expression bei zusätzlicher anti-CD28 Antikörper-Zugabe detektiert wurde, wird die Migration in die Haut folglich durch eine starke Kostimulation gesteigert, diese Steigerung ist jedoch nicht spezifisch für eine Aktivierung durch LSEC.

Die Untersuchung des Einflusses der Kostimulation auf den inflammatorischen Phänotyp von LSEC-aktivierten $CD4^+$ T-Zellen zeigte, dass die IFN γ -Expression in T_{LSEC} signifikant steigt, wenn die Zellen ein zusätzliches kostimulatorisches Signal erhalten, aber deutlich unter der IFN γ -Expression der entsprechenden T_{SAPC} -Population bleibt. Bezüglich der Expression von IL-2 und TNF α wurde hingegen kein signifikanter Unterschied durch Zugabe von anti-CD28 Antikörper detektiert.

Die Steigerung der IFN γ -Expression nach Zugabe von anti-CD28 Antikörper stimmt mit Daten von Carambia et al. überein (Carambia et al., 2013) und bedeutet, dass die schwache Kostimulation durch LSEC bei der Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen zur geringen Induktion des inflammatorischen Zytokins IFN γ durch T_{LSEC} beiträgt. Eine starke Kostimulation kann jedoch keine IFN γ -Expression in T_{LSEC} induzieren, die mit dem Expressionslevel in T_{SAPC} vergleichbar wäre. Dass die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und TNF α durch eine zusätzliche Kostimulation

nicht beeinflusst wird, lässt außerdem darauf schließen, dass die niedrige Expression der proinflammatorischen Zytokine auf T_{LSEC} nicht ausschließlich ein Resultat der geringen Kostimulation ist, sondern auch durch andere Mechanismen vermittelt wird. Im Abschnitt 3.2.2 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bereitstellung von Retinolsäure zur IFN γ -Suppression beiträgt. Cantorna et al. zeigte, dass Retinolsäure die IFN γ -Expression von Th1-Zellen nur inhibiert, wenn die Zellen neben der Stimulation des TCR/CD3-Komplexes über den CD28-Rezeptor kostimuliert werden. Bei ausschließlicher Aktivierung über den TCR/CD3-Komplex konnte keine Retinolsäure-induzierte IFN γ -Suppression detektiert werden. Diese Daten zeigen, dass Retinolsäure in den CD28-Signalweg eingreift (Cantorna et al., 1996). Eine solche Beeinflussung der IFN γ -Expression wäre auch durch die Retinolsäure-metabolisierenden LSEC denkbar. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zum ersten Mal, dass die schwache Kostimulation durch LSEC dazu beiträgt, dass $CD4^+$ T-Zellen vermehrt in den Darm und weniger in die Haut migrieren. Auch wurde detektiert, dass die Zugabe von kostimulierendem anti-CD28 Antikörper die IFN γ -Expression in T_{LSEC} steigert, jedoch nicht zu einer mit den T_{SAPC} vergleichbaren Expressionsstärke führt. Die vorliegenden Daten identifizieren somit die Stärke der Kostimulation als einen weiteren Mechanismus, der für den unterschiedlichen Phänotyp der T_{LSEC} und T_{LAPC} verantwortlich ist. Da die zusätzliche Anwesenheit von professionellen APC ein starkes kostimulatorisches Signal auslöst, ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die geringe Kostimulation für den Einfluss der LSEC auf den Phänotyp der $T_{LSEC/LAPC}$ verantwortlich ist.

4.6 In der Literatur beschriebener Einfluss von LSEC auf den Phänotyp von Th1-Zellen

Durch die duale Blutzufuhr der Leber treten die ansässigen APC nicht nur mit naiven $CD4^+$ T-Zellen in Kontakt, sondern können auch mit bereits differenzierten Th1-Zellen interagieren.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass LSEC in der Lage sind, die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin in Th1-Zellen zu induzieren (Neumann et al., 2012) und dass die durch Retinolsäure induzierte $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen auch unter Th1- und Th2-Bedingungen stabil ist (Iwata et al., 2004). Daher kann postuliert werden, dass in der Leber aktivierte T-Zellen auch unter entzündlichen Bedingungen in den Darm

migrieren.

Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Restimulation von Th1-Zellen auf LSEC zu einer signifikant niedrigeren IFN γ -Expression führt und die Expression von IL-10 induziert. Die LSEC-stimulierten Th1-Zellen zeigten *in vivo* kein inflammatorisches Potential (Carambia et al., 2013; Neumann et al., 2015). Als ein Mechanismus, der zur LSEC-induzierten IL-10 Expression in Th1-Zellen führt, wurde der Notch-Signalweg identifiziert. Die Blockade des IL-10 Rezeptors inhibierte den tolerogenen Effekt der LSEC (Neumann et al., 2015). Da die Notch-induzierte IL-10-Expression von IL-12 abhängig ist (Neumann et al., 2015) und LSEC im Gegensatz zu professionellen APC kein IL-12 exprimieren (Knolle et al., 1999), kann angenommen werden, dass auch die Kooperation zwischen LSEC und LAPC zu Leber-induzierten Toleranzmechanismen wie der Notch-induzierten IL-10-Expression beitragen kann.

Diese Daten zeigen, dass die LSEC-induzierte Modulation von CD4⁺ T-Zellen nicht nur eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von naiven Zellen in der Leber spielt, sondern auch bereits differenzierte T-Zellen in ihrer Immunfunktion beeinflusst werden können. Ein solcher regulativer Einfluss auf Th1-Zellen wäre auch durch die LSEC- und LAPC-vermittelten Mechanismen denkbar, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

4.7 Schlussfolgerungen und medizinische Relevanz

Während T_{LSEC} niedrig aktivierte Zellen sind, eine starke Expression der Darm-*Homing*-Rezeptoren α 4 β 7-Integrin und CCR9 aufzeigen und nur geringe Level proinflammatorischer Zytokine exprimieren, sind T_{LAPC} stark aktivierte Zellen, die weniger Darm-*Homing*-Rezeptoren, dafür aber mehr proinflammatorische Zytokine exprimieren. Die immunsuppressive Wirkung der T_{LSEC} sowie der LSEC-induzierte Darm-*Homing*-Phänotyp wurden bereits in einigen Studien dargestellt (Kruse et al., 2009; Neumann et al., 2012; Carambia et al., 2013). Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente zeigen nun, dass dieser LSEC-induzierte Phänotyp auch bei gleichzeitiger Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch LAPC und bei optimaler Kostimulation durch anti-CD28 Antikörper erhalten bleibt. Somit unterstreichen die Ergebnisse die immunmodulatorische Wirkung der LSEC.

Der Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen wird durch verschiedene Mechanismen beeinflusst. Die Daten dieser Arbeit belegen, dass die LSEC-induzierte Expression von α 4 β 7-Integrin und die geringe Expression von P-Lig und IFN γ sowohl

durch das Retinolsäure-*Signaling* als auch durch die schwache Aktivierung und Kostimulation induziert werden. Somit wurde gezeigt, dass die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen zur Induktion des Darm-*Homing*-Phänotyps beitragen, während die Migration in die Haut und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen supprimiert wird. Wichtig ist, dass trotz optimaler Kostimulation und Blockade des Retinolsäure-*Signaling* T_{LSEC} nur geringe Mengen IFN γ exprimieren. Da vermutlich das Fehlen von Th-1-induzierenden Faktoren wie IL-12 für die ausbleibende Th-1-Zell-Induktion durch LSEC verantwortlich ist, sollte in weiteren Experimenten der Phänotyp von LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen unter Zugabe von IL-12 untersucht werden.

Bei einer gleichzeitigen Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC und LAPC ist davon auszugehen, dass die geringe Expression von MHC-II und den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf LSEC durch die Anwesenheit der professionellen LAPC ausgeglichen wird. Daher kann postuliert werden, dass für die LSEC-induzierte Erhöhung der Expression des Darm-*Homing*-Rezeptors α 4 β 7-Integrin und die Reduktion des inflammatorischen Zytokines IFN γ in T_{LSEC/LAPC} in erster Linie die Bereitstellung von Retinolsäure verantwortlich ist und weniger die geringe Aktivierung und Kostimulation durch LSEC.

Kombiniert man die tolerogene Wirkung der hepatisch aktivierten T-Zellen mit der Induktion des Darm-*Homing* Phänotyps, lässt sich vermuten, dass in der Leber aktivierte T-Zellen auch im Darm immunmodulatorisch wirken. Daher wäre es von großem Interesse zu untersuchen, ob die hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen den Verlauf von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen modulieren.

Die besondere Relevanz der Immunmodulation in der Leber zeigt sich am Beispiel der guten Toleranz von Lebertransplantaten (Calne et al., 1969; Qian et al., 1991, 1994; Dahmen et al., 1994; Calne, 2000), aber auch anhand von chronischen Virusinfektionen in der Leber, wo eine starke Immunantwort wünschenswert wäre (Rehermann and Nascimbeni, 2005; Derkow et al., 2007). Beispielsweise ist die Expression von PD-1 auf T-Zellen (Watanabe et al., 2010) und die Induktion von T_{regs} (Billerbeck et al., 2007; Boonstra et al., 2008) entscheidend an der Persistenz von Hepatitis-Viren beteiligt. Die Inhibition des PD-1-Rezeptors auf T-Zellen stellt demnach einen möglichen Therapieansatz zur Behandlung von hepatischen Virusinfektionen dar (Nakamoto et al., 2009). Ebenso kann die Gabe eines IL-10-blockierenden Antikörpers zur Therapie von chronischen Virusinfektionen beitragen (Brooks et al., 2006).

Die medizinische Relevanz der Mechanismen zur Toleranzinduktion in der Leber unterstreicht die Bedeutung dieser Arbeit. Ein genaues Verständnis dieser Mechanismen kann helfen, neue Therapieansätze zu entwickeln. Weitere Untersuchungen zur immunmodulierenden Fähigkeit und dem *Homing*-Phänotyp von hepatisch aktivierten CD4⁺ T-Zellen könnten zur Entwicklung von Therapiekonzepten von chronischen Leber- und Darmerkrankungen beitragen. Es wäre beispielsweise denkbar, dass nach weiteren Analysen auch die Inhibition des Retinolsäure-*Signaling* ein Ansatz zur Bekämpfung von Virusinfektionen in der Leber sein könnte.

Literaturverzeichnis

- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. and Powrie, F. (1999) 'An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.' *The Journal of Experimental Medicine*, 190(7) pp. 995–1004.
- Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Löhning, M., Bräuer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A. and Hamann, A. (1997) 'P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues.' *Nature*, 385(6611) pp. 81–83.
- Bachmann, M. F., Sebzda, E., Kündig, T. M., Shahinian, A., Speiser, D. E., Mak, T. W. and Ohashi, P. S. (1996) 'T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds.' *European Journal of Immunology*, 26(9) pp. 2017–2022.
- Bakdash, G., Vogelpoel, L. T., van Capel, T. M., Kapsenberg, M. L. and de Jong, E. C. (2014) 'Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells.' *Mucosal Immunology*, July.
- Bamboate, Z. M., Stableford, J. A., Plitas, G., Burt, B. M., Nguyen, H. M., Welles, A. P., Gonen, M., Young, J. W. and DeMatteo, R. P. (2009) 'Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(4) pp. 1901–1911.
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (1998) 'Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements.' *Immunology and Cell Biology*, 76(1) pp. 34–40.
- Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. and Noelle, R. J. (2007) 'All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation.' *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8) pp. 1765–1774.
- Bertolino, P., McCaughan, G. W. and Bowen, D. G. (2002) 'Role of primary intrahepatic T-cell activation in the "liver tolerance effect."' *Immunology and Cell Biology*, 80(1) pp. 84–92.
- Billerbeck, E., Bottler, T. and Thimme, R. (2007) 'Regulatory T cells in viral hepatitis.' *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(36) pp. 4858–4864.
- Bissell, D. M., Wang, S. S., Jarnagin, W. R. and Roll, F. J. (1995) 'Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation.' *The Journal of Clinical Investigation*, 96(1) pp. 447–455.
- Blomhoff, R. and Wake, K. (1991) 'Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis.' *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(3) pp. 271–277.
- Blouin, A., Bolender, R. P. and Weibel, E. R. (1977) 'Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study.' *The Journal of Cell Biology*, 72(2) pp. 441–455.
- Boonstra, A., Woltman, A. M. and Janssen, H. L. A. (2008) 'Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections.' *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 22(6) pp.

1049–1061.

Böttcher, J. P., Schanz, O., Wohlleber, D., Abdullah, Z., Debey-Pascher, S., Staratschek-Jox, A., Höchst, B., Hegenbarth, S., Grell, J., Limmer, A., Atreya, I., Neurath, M. F., Busch, D. H., Schmitt, E., van Endert, P., Kolanus, W., Kurts, C., Schultze, J. L., Diehl, L. and Knolle, P. A. (2013) ‘Liver-primed memory T cells generated under noninflammatory conditions provide anti-infectious immunity.’ *Cell Reports*, 3(3) pp. 779–795.

Bradley, L. M., Watson, S. R. and Swain, S. L. (1994) ‘Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin.’ *The Journal of Experimental Medicine*, 180(6) pp. 2401–2406.

Breous, E., Somanathan, S., Vandenberghe, L. H. and Wilson, J. M. (2009) ‘Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver.’ *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(2) pp. 612–621.

Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B. and Oldstone, M. B. A. (2006) ‘Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo.’ *Nature Medicine*, 12(11) pp. 1301–1309.

Burgio, V. L., Ballardini, G., Artini, M., Caratozzolo, M., Bianchi, F. B. and Levrero, M. (1998) ‘Expression of co-stimulatory molecules by Kupffer cells in chronic hepatitis of hepatitis C virus etiology.’ *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 27(6) pp. 1600–1606.

Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. and Briskin, M. (1999) ‘Lymphocyte trafficking and regional immunity.’ *Advances in Immunology*, 72 pp. 209–253.

Callery, M. P., Kamei, T. and Flye, M. W. (1989) ‘The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding.’ *The Journal of Surgical Research*, 46(4) pp. 391–394.

Calne, R. Y. (2000) ‘Immunological tolerance--the liver effect.’ *Immunological Reviews*, 174, April, pp. 280–282.

Calne, R. Y., Sells, R. A., Pena, J. R., Davis, D. R., Millard, P. R., Herbertson, B. M., Binns, R. M. and Davies, D. A. (1969) ‘Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.’ *Nature*, 223(5205) pp. 472–476.

Campbell, D. J. and Butcher, E. C. (2002) ‘Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues.’ *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1) pp. 135–141.

Cantorna, M. T., Nashold, F. E., Chun, T. Y. and Hayes, C. E. (1996) ‘Vitamin A down-regulation of IFN-gamma synthesis in cloned mouse Th1 lymphocytes depends on the CD28 costimulatory pathway.’ *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(8) pp. 2674–2679.

Cantorna, M. T., Nashold, F. E. and Hayes, C. E. (1994) ‘In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function.’ *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 152(4) pp. 1515–1522.

- Carambia, A., Frenzel, C., Bruns, O. T., Schwinge, D., Reimer, R., Hohenberg, H., Huber, S., Tiegs, G., Schramm, C., Lohse, A. W. and Herkel, J. (2013) 'Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells.' *Journal of Hepatology*, 58(1) pp. 112–118.
- Carambia, A. and Herkel, J. (2010) 'CD4 T cells in hepatic immune tolerance.' *Journal of Autoimmunity*, 34(1) pp. 23–28.
- Carballido, J. M., Carballido-Perrig, N., Terres, G., Heusser, C. H. and Blaser, K. (1992) 'Bee venom phospholipase A2-specific T cell clones from human allergic and non-allergic individuals: cytokine patterns change in response to the antigen concentration.' *European Journal of Immunology*, 22(6) pp. 1357–1363.
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A. and Turano, A. (1997) 'Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation.' *Cytometry*, 27(1) pp. 71–76.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. and Lanzavecchia, A. (1997) 'Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.' *Nature*, 388(6644) pp. 782–787.
- Chambers, C. A. and Allison, J. P. (1999) 'Costimulatory regulation of T cell function.' *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2) pp. 203–210.
- Constant, S. L. and Bottomly, K. (1997) 'Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches.' *Annual Review of Immunology*, 15 pp. 297–322.
- Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T. and Bottomly, K. (1995) 'Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells.' *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5) pp. 1591–1596.
- De Creus, A., Abe, M., Lau, A. H., Hackstein, H., Raimondi, G. and Thomson, A. W. (2005) 'Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(4) pp. 2037–2045.
- Crispe, I. N. (2011) 'Liver antigen-presenting cells.' *Journal of Hepatology*, 54(2) pp. 357–365.
- Cunningham, C. C. and Van Horn, C. G. (2003) 'Energy availability and alcohol-related liver pathology.' *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 27(4) pp. 291–299.
- Dahmen, U., Qian, S., Rao, A. S., Demetris, A. J., Fu, F., Sun, H., Gao, L., Fung, J. J. and Starzl, T. E. (1994) 'Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice.' *Transplantation*, 58(1) pp. 1–8.
- Delisle, J.-S., Giroux, M., Boucher, G., Landry, J.-R., Hardy, M.-P., Lemieux, S., Jones, R. G., Wilhelm, B. T. and Perreault, C. (2013) 'The TGF- β -Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells.' *Genes and Immunity*, 14(2) pp. 115–126.
- Derkow, K., Loddenkemper, C., Mintern, J., Kruse, N., Klugewitz, K., Berg, T., Wiedenmann,

- B., Ploegh, H. L. and Schott, E. (2007) 'Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis.' *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(4) pp. 1155–1165.
- Dhirapong, A., Lleo, A., Yang, G.-X., Tsuneyama, K., Dunn, R., Kehry, M., Packard, T. A., Cambier, J. C., Liu, F.-T., Lindor, K., Coppel, R. L., Ansari, A. A. and Gershwin, M. E. (2011) 'B cell depletion therapy exacerbates murine primary biliary cirrhosis.' *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(2) pp. 527–535.
- 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 (Baltimore, Md.)*, 47(1) pp. 296–305.
- Dinarello, C. A. (2000) 'Proinflammatory cytokines.' *Chest*, 118(2) pp. 503–508.
- Doherty, D. G. and O'Farrelly, C. (2000) 'Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver.' *Immunological Reviews*, 174, April, pp. 5–20.
- Doherty, D. G. and O'Farrelly, C. (2001) 'Dendritic cells: regulators of hepatic immunity or tolerance?' *Journal of Hepatology*, 34(1) pp. 156–160.
- Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T. and Tiegs, G. (2007) 'IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice.' *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(2) pp. 475–485.
- Foureau, D. M., Walling, T. L., Maddukuri, V., Anderson, W., Culbreath, K., Kleiner, D. E., Ahrens, W. A., Jacobs, C., Watkins, P. B., Fontana, R. J., Chalasani, N., Talwalkar, J., Lee, W. M., Stolz, A., Serrano, J. and Bonkovsky, H. L. (2015) 'Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis.' *Clinical and Experimental Immunology*, 180(1) pp. 40–51.
- Gallatin, W. M., Weissman, I. L. and Butcher, E. C. (1983) 'A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes.' *Nature*, 304(5921) pp. 30–34.
- Gowans, J. L. (1966) 'Life-span, recirculation, and transformation of lymphocytes.' *International Review of Experimental Pathology*, 5 pp. 1–24.
- Grusby, M. J., Johnson, R. S., Papaioannou, V. E. and Glimcher, L. H. (1991) 'Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice.' *Science (New York, N.Y.)*, 253(5026) pp. 1417–1420.
- Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B. and Butcher, E. C. (1994) 'Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 152(7) pp. 3282–3293.
- Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B. (2004) 'The interface between innate and adaptive immunity.' *Nature Immunology*, 5(10) pp. 971–974.
- Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M. and O'Garra, A. (1995) 'The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model.' *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5) pp. 1579–1584.

Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R. and Crispe, I. N. (1994) 'The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo.' *Immunity*, 1(9) pp. 741–749.

Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T. and Honjo, T. (2003) 'PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver.' *The Journal of Experimental Medicine*, 198(1) pp. 39–50.

Iwata, M., Eshima, Y. and Kagechika, H. (2003) 'Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors.' *International Immunology*, 15(8) pp. 1017–1025.

Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C. and Song, S.-Y. (2004) 'Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.' *Immunity*, 21(4) pp. 527–538.

Jenne, C. N. and Kubes, P. (2013) 'Immune surveillance by the liver.' *Nature Immunology*, 14(10) pp. 996–1006.

Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Förster, R. and Agace, W. W. (2005) 'Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing.' *The Journal of Experimental Medicine*, 202(8) pp. 1063–1073.

Kang, B. Y., Chung, S. W., Kim, S. H., Kang, S. N., Choe, Y. K. and Kim, T. S. (2000) 'Retinoid-mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4(+) T cells.' *British Journal of Pharmacology*, 130(3) pp. 581–586.

Keck, S., Schmalzer, M., Ganter, S., Wyss, L., Oberle, S., Huseby, E. S., Zehn, D. and King, C. G. (2014) 'Antigen affinity and antigen dose exert distinct influences on CD4 T-cell differentiation.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(41) pp. 14852–14857.

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(11) pp. 590–594.

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

Knolle, P. A. and Limmer, A. (2003) 'Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells.' *Swiss Medical Weekly*, 133(37-38) pp. 501–506.

Knolle, P. A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G. and Lohse, A. W. (1999) 'Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells.' *Gastroenterology*, 116(6) pp. 1428–1440.

Knolle, P. A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Löser, E., Schmitt, E., Gerken, G. and Lohse, A. W. (1998) 'IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules.' *Clinical and Experimental Immunology*, 114(3) pp. 427–433.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kämpgen, E., Romani, N. and Schuler, G. (1996) 'High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10.' *The Journal of Experimental Medicine*, 184(2) pp. 741–746.

Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Köhl, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Hamann, A. and Klugewitz, K. (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 (Baltimore, Md.)*, 50(6) pp. 1904–1913.

Lalor, P. F. and Adams, D. H. (2002) 'The liver: a model of organ-specific lymphocyte recruitment.' *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(2) pp. 1–16.

Lau, A. H., de Creus, A., Lu, L. and Thomson, A. W. (2003) 'Liver tolerance mediated by antigen presenting cells: fact or fiction?' *Gut*, 52(8) pp. 1075–1078.

Lau, A. H. and Thomson, A. W. (2003) 'Dendritic cells and immune regulation in the liver.' *Gut*, 52(2) pp. 307–314.

Levy, O. (2007) 'Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates.' *Nature Reviews. Immunology*, 7(5) pp. 379–390.

Lohse, A. W., Knolle, P. A., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G. and Meyer Zum Büschenfelde, K. H. (1996) 'Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells.' *Gastroenterology*, 110(4) pp. 1175–1181.

Lyons, A. B. (1999) 'Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.' *Immunology and Cell Biology*, 77(6) pp. 509–515.

Mackay, C. R. (1991) 'T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways.' *Immunology Today*, 12(6) pp. 189–192.

MacPhee, P. J., Schmidt, E. E. and Groom, A. C. (1992) 'Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy.' *The American Journal of Physiology*, 263(1 Pt 1) pp. G17–23.

MacPhee, P. J., Schmidt, E. E. and Groom, A. C. (1995) 'Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy.' *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 1) pp. G692–698.

Maier, H., Isogawa, M., Freeman, G. J. and Chisari, F. V. (2007) 'PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(5) pp. 2714–2720.

Matsumoto, A., Kinoshita, M., Ono, S., Tsujimoto, H., Majima, T., Habu, Y., Shinomiya, N. and Seki, S. (2006) 'Cooperative IFN-gamma production of mouse liver B cells and natural killer cells stimulated with lipopolysaccharide.' *Journal of Hepatology*, 45(2) pp. 290–298.

Matta, B. M., Raimondi, G., Rosborough, B. R., Sumpter, T. L. and Thomson, A. W. (2012) 'IL-27 production and STAT3-dependent upregulation of B7-H1 mediate immune regulatory functions of liver plasmacytoid dendritic cells.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*,

188(11) pp. 5227–5237.

Medzhitov, R. and Janeway, C. (2000) ‘Innate immune recognition: mechanisms and pathways.’ *Immunological Reviews*, 173, February, pp. 89–97.

Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. and Radbruch, A. (1990) ‘High gradient magnetic cell separation with MACS.’ *Cytometry*, 11(2) pp. 231–238.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O’Garra, A. (2001) ‘Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.’ *Annual Review of Immunology*, 19 pp. 683–765.

Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Rosenthal, M. and Von Andrian, U. H. (2003) ‘Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer’s patch dendritic cells.’ *Nature*, 424(6944) pp. 88–93.

Moritoki, Y., Zhang, W., Tsuneyama, K., Yoshida, K., Wakabayashi, K., Yang, G.-X., Bowlus, C., Ridgway, W. M., Ueno, Y., Ansari, A. A., Coppel, R. L., Mackay, I. R., Flavell, R. A., Gershwin, M. E. and Lian, Z.-X. (2009) ‘B cells suppress the inflammatory response in a mouse model of primary biliary cirrhosis.’ *Gastroenterology*, 136(3) pp. 1037–1047.

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 pp. 145–173.

Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M. E., Kaminski, M., Gostick, E., Price, D. A., Freeman, G. J., Wherry, E. J. and Chang, K.-M. (2009) ‘Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade.’ *PLoS pathogens*, 5(2) p. e1000313.

Neumann, K., Kruse, N., Szilagyi, B., Erben, U., Rudolph, C., Flach, A., Zeitz, M., Hamann, A. and Klugewitz, K. (2012) ‘Connecting liver and gut: murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4⁺ T cells via retinoic acid.’ *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(6) pp. 1976–1984.

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*, April, p. n/a–n/a.

Parker, G. A. and Picut, C. A. (2005) ‘Liver immunobiology.’ *Toxicologic Pathology*, 33(1) pp. 52–62.

Prickett, T. C., McKenzie, J. L. and Hart, D. N. (1988) ‘Characterization of interstitial dendritic cells in human liver.’ *Transplantation*, 46(5) pp. 754–761.

Qian, S., Demetris, A. J., Murase, N., Rao, A. S., Fung, J. J. and Starzl, T. E. (1994) ‘Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism.’ *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 19(4) pp. 916–924.

Qian, S. G., Fung, J. J., Demetris, A. V., Ildstad, S. T. and Starzl, T. E. (1991) ‘Orthotopic liver transplantation in the mouse.’ *Transplantation*, 52(3) pp. 562–564.

- Racanelli, V. and Rehermann, B. (2006) 'The liver as an immunological organ.' *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(2 Suppl 1) pp. S54–62.
- Rasmussen, A., Davies, H. F., Jamieson, N. V., Evans, D. B. and Calne, R. Y. (1995) 'Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival.' *Transplantation*, 59(6) pp. 919–921.
- Rehermann, B. and Nascimbeni, M. (2005) 'Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection.' *Nature Reviews. Immunology*, 5(3) pp. 215–229.
- Rothoef, T., Gonschorek, A., Bartz, H., Anhenn, O. and Schauer, U. (2003) 'Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells.' *Immunology*, 110(4) pp. 430–439.
- Sallusto, F., Geginat, J. and Lanzavecchia, A. (2004) 'Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.' *Annual Review of Immunology*, 22 pp. 745–763.
- Saraiva, M. and O'Garra, A. (2010) 'The regulation of IL-10 production by immune cells.' *Nature Reviews. Immunology*, 10(3) pp. 170–181.
- Saurer, L., McCullough, K. C. and Summerfield, A. (2007) 'In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(6) pp. 3504–3514.
- Schildberg, F. A., Hegenbarth, S. I., Schumak, B., Scholz, K., Limmer, A. and Knolle, P. A. (2008) 'Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells.' *European Journal of Immunology*, 38(4) pp. 957–967.
- Schmitt, N. and Ueno, H. (2015) 'Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines.' *Current Opinion in Immunology*, 34, June, pp. 130–136.
- Schrage, A., Loddenkemper, C., Erben, U., Lauer, U., Hausdorf, G., Jungblut, P. R., Johnson, J., Knolle, P. A., Zeitz, M., Hamann, A. and Klugewitz, K. (2008) 'Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1.' *Histochemistry and Cell Biology*, 129(4) pp. 441–451.
- Secrist, H., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T. (1995) 'Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type.' *The Journal of Experimental Medicine*, 181(3) pp. 1081–1089.
- Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T. and Hiraide, H. (2000) 'The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses.' *Immunological Reviews*, 174, April, pp. 35–46.
- Shevach, E. M. (2009) 'Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression.' *Immunity*, 30(5) pp. 636–645.

Sigmundsdottir, H. and Butcher, E. C. (2008) 'Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking.' *Nature Immunology*, 9(9) pp. 981–987.

Sigmundsdottir, H., Pan, J., Debes, G. F., Alt, C., Habtezion, A., Soler, D. and Butcher, E. C. (2007) 'DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to "program" T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27.' *Nature Immunology*, 8(3) pp. 285–293.

Smedsrød, B., De Bleser, P. J., Braet, F., Loviseti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E. and Geerts, A. (1994) 'Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells.' *Gut*, 35(11) pp. 1509–1516.

Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. and Jordan, M. S. (2009) 'T cell activation.' *Annual Review of Immunology*, 27 pp. 591–619.

Sprent, J. (1973) 'Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties.' *Cellular Immunology*, 7(1) pp. 10–39.

Stenstad, H., Ericsson, A., Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Marsal, J., Mack, M., Picarella, D., Soler, D., Marquez, G., Briskin, M. and Agace, W. W. (2006) 'Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4⁺ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine.' *Blood*, 107(9) pp. 3447–3454.

Svensson, M., Johansson-Lindbom, B., Zapata, F., Jaensson, E., Austenaa, L. M., Blomhoff, R. and Agace, W. W. (2008) 'Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8⁺ T cells.' *Mucosal Immunology*, 1(1) pp. 38–48.

Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Brodén, T., Márquez, G. and Agace, W. W. (2002) 'CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 α beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa.' *The Journal of Clinical Investigation*, 110(8) pp. 1113–1121.

Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P. and Bottomly, K. (1997) 'Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4⁺ T cell differentiation.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(12) pp. 5956–5963.

Thomson, A. W. and Knolle, P. A. (2010) 'Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment.' *Nature Reviews. Immunology*, 10(11) pp. 753–766.

Thomson, A. W. and Lu, L. (1999) 'Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance?' *Immunology Today*, 20(1) pp. 27–32.

Tietz, W., Allemand, Y., Borges, E., von Laer, D., Hallmann, R., Vestweber, D. and Hamann, A. (1998) 'CD4⁺ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin.' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(2) pp. 963–970.

Trinchieri, G. (1995) 'Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.' *Annual Review of Immunology*, 13 pp. 251–276.

Trombetta, E. S. and Mellman, I. (2005) 'Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo.' *Annual Review of Immunology*, 23 pp. 975–1028.

Valitutti, S., Müller, S., Dessing, M. and Lanzavecchia, A. (1996) 'Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy.' *The*

Journal of Experimental Medicine, 183(4) pp. 1917–1921.

Watanabe, T., Bertoletti, A. and Tanoto, T. A. (2010) ‘PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection.’ *Journal of Viral Hepatitis*, 17(7) pp. 453–458.

Weiner, H. L. (1994) ‘Oral tolerance.’ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23) pp. 10762–10765.

Weller, M., Constam, D. B., Malipiero, U. and Fontana, A. (1994) ‘Transforming growth factor-beta 2 induces apoptosis of murine T cell clones without down-regulating bcl-2 mRNA expression.’ *European Journal of Immunology*, 24(6) pp. 1293–1300.

Wiegard, C., Frenzel, C., Herkel, J., Kallen, K.-J., Schmitt, E. and Lohse, A. W. (2005) ‘Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells.’ *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 42(1) pp. 193–199.

Wisse, E. (1970) ‘An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids.’ *Journal of Ultrastructure Research*, 31(1) pp. 125–150.

Wölfle, S. J., Strebovsky, J., Bartz, H., Sähr, A., Arnold, C., Kaiser, C., Dalpke, A. H. and Heeg, K. (2011) ‘PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3.’ *European Journal of Immunology*, 41(2) pp. 413–424.

Woo, J., Lu, L., Rao, A. S., Li, Y., Subbotin, V., Starzl, T. E. and Thomson, A. W. (1994) ‘Isolation, phenotype, and allostimulatory activity of mouse liver dendritic cells.’ *Transplantation*, 58(4) pp. 484–491.

You, Q., Cheng, L., Kedl, R. M. and Ju, C. (2008) ‘Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells.’ *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(3) pp. 978–990.

Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G. J., Yang, L. L., Soler, D., Butcher, E. C., Ponath, P. D., Parker, C. M. and Andrew, D. P. (1999) ‘Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis.’ *The Journal of Experimental Medicine*, 190(9) pp. 1241–1256.

Zhang, H., Stolz, D. B., Chalasani, G. and Thomson, A. W. (2013) ‘Hepatic B cells are readily activated by Toll-like receptor-4 ligation and secrete less interleukin-10 than lymphoid tissue B cells.’ *Clinical and Experimental Immunology*, 173(3) pp. 473–479.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ruth Marahiel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Modulation von CD4⁺ T-Zellen durch professionelle und nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen der Leber“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Vortrag

„Effects of different liver antigen-presenting cells on the phenotype of liver activated CD4⁺ T cells“

6th German Meeting on Immune Regulation, Akademie Berlin Schmöckwitz, 2012

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit vielfältig unterstützt haben.

Katja Klugewitz danke ich für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas und für die Betreuung während der ersten Phase meiner Laborarbeit. Alexander Scheffold gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, meine Dissertation auch nach dem Ausscheiden von Katja Klugewitz fortführen zu können sowie für die sehr gute Betreuung und die konstruktiven Anregungen im Laufe meiner Arbeit.

Katrin Neumann und Christine Rudolph danke ich herzlich für die sehr gute experimentelle Einarbeitung, die praktische Unterstützung sowie die zahlreichen wertvollen Diskussionen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Katrin, die mich auch nach Beendigung der Laborarbeit stets unterstützt hat und meine Arbeit mit geduldiger Supervision begleitete. Die ständige Hilfsbereitschaft und ihr großes Fachwissen wusste ich stets sehr zu schätzen.

Anja Kühl und Katja Grollich danke ich für die Durchführung der histologischen Färbungen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Kühl/Erben, AG Siegmund, ehemaligen AG Klugewitz und AG Scheffold für die konstruktive und freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden, die mich während der gesamten Arbeit motivierend unterstützt haben.