

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Aktivierung von T-Zellen durch professionelle und
nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen
der Leber im Mausmodell der Autoimmunhepatitis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Anja Müller
aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2017

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. Grundlegendes zur Autoimmunhepatitis	1
1.2. Was zur Pathogenese der Autoimmunhepatitis bekannt ist	2
1.2.1. Alter, Geschlecht und Genetik haben Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung	2
1.2.2. Können Medikamente oder hepatotrope Virusinfektionen die Autoimmunhepatitis auslösen?	3
1.2.3. Die Histologie der Leber bei der Autoimmunhepatitis	3
1.3. Die Leber hat anatomische und physiologische Besonderheiten	4
1.4. Immunologische Eigenschaften der verschiedenen Leberzellen	5
1.4.1. Hepatozyten bilden das Parenchym	5
1.4.2. Fenestrations als Merkmal der sinusoidalen Leberendothelzellen	6
1.4.3. Kupfferzellen phagozytieren apoptotische Zellen	7
1.4.4. Dendritische Zellen – die Spezialisten der Antigenpräsentation	9
1.4.5. Sonstige Zellen der Leber	10
1.5. Die Antigenerkennung durch das Immunsystem	10
1.5.1. Das angeborene Immunsystem reagiert schnell aber unspezifisch	10
1.5.2. Das erworbene Immunsystem wirkt verzögert aber hochspezifisch	11
1.5.3. Prozessierung und Präsentation von Antigenen	11
1.5.4. Kreuzpräsentation und professionelle Antigen-präsentierende Zellen	12
1.5.5. Aktivierung von T-Zellen	14
1.5.6. Effektorfunktionen der CD8 ⁺ T-Zellen	14
1.5.7. Effektorfunktionen der CD4 ⁺ T-Zellen	15
1.5.8. Immunregulation, Anergie und Toleranzentstehung durch die Leber	15
1.6. Fragestellung	17

2.	METHODIK	19
2.1.	Material	19
2.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2.	Reagenzien, Chemikalien und Enzyme	20
2.1.3.	Medien und Puffer	21
2.1.4.	Synthetische Oligonukleotide	21
2.1.5.	Antikörper	22
2.1.6.	Mikrobeads	22
2.1.7.	Versuchstiere	23
2.2.	Methoden	23
2.2.1.	Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Mausstämme	23
2.2.1.1.	Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion	23
2.2.1.2.	Gelelektrophorese	24
2.2.1.3.	Phänotypanalyse in peripheren Blutproben	24
2.2.2.	Zellisolationsmethoden	24
2.2.2.1.	Isolation von nicht-parenchymalen Zellen aus der Leber	24
2.2.2.2.	Isolation von nicht-parenchymalen Zellen aus der Milz	26
2.2.2.3.	Isolation von OVA-spezifischen CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen	26
2.2.2.4.	Magnetische Zellseparation	27
2.2.2.5.	Bestimmung der Zellzahl	28
2.2.3.	Durchflusszytometrie und Zellfärbungen	28
2.2.3.1.	Durchflusszytometrie	28
2.2.3.2.	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	29
2.2.3.3.	Oberflächenfärbungen	29
2.2.3.4.	Intrazelluläre Färbung: Carboxyfluoreszein-(diacetat-) Succinimidyl Ester	30
2.2.3.5.	Reinheitskontrollen	30
2.2.4.	Zellkulturen	31
2.2.4.1.	Allgemeine Bedingungen	31
2.2.4.2.	Kulturschema	31
2.2.4.3.	Inkubation Tag -1	31
2.2.4.4.	Inkubation Tag 0	31
2.2.4.5.	Ernte Tag 3	32
2.2.5.	Enzym-gekoppelter Immun-Sorptions-Essay	32
2.2.6.	Graphische Darstellung und Statistik	33
2.2.6.1.	Computer-Software	33
2.2.6.2.	Statistische Auswertung	33

3.	ERGEBNISSE	34
3.1.	OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen werden <i>in vitro</i> unterschiedlich schnell aktiviert	34
3.2.	Isolation und Reinheit der Antigen-präsentierenden Zellen	35
3.2.1.	Aufreinigung von sinusoidalen Leberendothelzellen mit MACS und FACS	35
3.2.2.	Aufreinigung von Kupferzellen aus der CD146 ⁻ Zellfraktion	38
3.2.3.	Aufreinigung von Dendritischen Zellen der Leber aus der CD146 ⁻ Zellfraktion	38
3.2.4.	Aufreinigung von Dendritischen Zellen der Milz als Vergleichspopulation	39
3.3.	Ausschluss unspezifischer Aktivierungen der T-Zellen	39
3.4.	Antigenpräsentation durch sinusoidale Leberendothelzellen aus TF-OVA-Mäusen	43
3.5.	Antigenpräsentation durch Kupferzellen aus TF-OVA-Mäusen	46
3.6.	Antigenpräsentation durch Dendritische Zellen	48
3.6.1.	Dendritische Zellen der Leber	48
3.6.2.	Der Einfluss von reifen Dendritischen Zellen der Leber	50
3.6.3.	Dendritische Zellen der Milz aus TF-OVA-Mäusen	51
3.7.	Unterschiedliche Aktivierungen der T-Zellen durch die verschiedenen Leberzelltypen	54
3.7.1.	Antigen-präsentierende Zellen der Leber aktivieren OT-I CD8 ⁺ T-Zellen	54
3.7.2.	Effektorfunktion der OT-I CD8 ⁺ T-Zellen	55
4.	DISKUSSION	57
4.1.	Hochspezifische Isolation von hepatischen Antigen-präsentierenden Zellen	57
4.2.	Zellkulturen und transgene Proteine als probate Verfahren zur Untersuchung von Immunreaktionen	58
4.3.	Die Immunreaktionen von Vα2⁺ T-Zellen nach Kokultur mit Antigen-präsentierenden Zellen aus TF-OVA-Mäusen	60
4.3.1.	LSEC, KC und DC der Leber aktivieren <i>in vitro</i> antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellen durch Präsentation eines endogenen Antigens	60
4.3.2.	Antigenspezifische CD4 ⁺ T-Zellen werden <i>in vitro</i> nicht durch endogenes Antigen der Leber aktiviert	63
4.3.3.	Nur professionelle Antigen-präsentierende Zellen der Leber führen zu einer effektiven Aktivierung von OT-I CD8 ⁺ T-Zellen	63
4.3.4.	Dendritische Zellen der Leber induzieren geringere T-Zellaktivierungen als Dendritische Zellen der Milz	71
4.4.	Schlussfolgerung und Ausblick	73

5.	VERZEICHNISSE	76
5.1.	Literaturverzeichnis	76
5.2.	Abbildungsverzeichnis	83
5.3.	Tabellenverzeichnis	84
5.4.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	85
	Eidesstattliche Versicherung	89
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	91
	Lebenslauf	93
	Publikationsliste	95

ZUSAMMENFASSUNG

Die Autoimmunhepatitis (AIH) ist eine chronisch-entzündliche Lebererkrankung, bei der die Hepatozyten durch das eigene Immunsystems geschädigt werden. Die Ätiologie der AIH ist ungeklärt. Da T-Zellen mit Hilfe ihrer T-Zellrezeptoren die Körperzellen kontrollieren, stehen sie im Mittelpunkt der Forschung bei der AIH. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, durch welche zellulären Interaktionen die pathologische Immunreaktion gegen Hepatozyten initiiert wird. Die Hepatozyten des murinen TF-OVA-Stammes exprimieren transgen Ovalbuminprotein. Mit Hilfe dieses Modells kann untersucht werden, ob CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen effektiv durch ein in Hepatozyten vorhandenes Antigen aktiviert werden, wenn dieses Antigen durch nicht-parenchymale Leberzellen präsentiert wird. Um mehrere nicht-parenchymale Zellen (NPZ) der Leber zu untersuchen, etablierten wir ein neues Zellisolationsverfahren, das die magnetische und die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung kombiniert. Dadurch konnten wir Kupferzellen (KC) und Dendritische Zellen (DC) als professionelle sowie sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) als nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) der Leber zeitgleich und spezifisch aufreinigen. Wir untersuchten die einzelnen Populationen *in vitro* hinsichtlich ihrer Fähigkeit, endogenes hepatozytäres Antigen gegenüber T-Zellen zu präsentieren. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellen nach dreitägiger Kokultur zeigte sich, dass durch alle drei untersuchten Zelltypen aus TF-OVA-Tieren naive antigenspezifische OT-I CD8⁺ T-Zellen aktiviert wurden. Das transgene Ovalbumin musste also zuvor von den NPZ phagozytiert und prozessiert worden und das Antigen dann im Komplex mit MHC-I durch Kreuzpräsentation präsentiert worden sein. Zur Differenzierung der Effektorfunktion der aktivierten CD8⁺ T-Zellen wurden die Überstände der Zellkulturen mittels ELISA auf das Vorhandensein von IFN- γ untersucht. Es zeigte sich für das endogene Antigen, dass unter nicht inflammatorischen Bedingungen nur KC und DC als professionelle APZ in der Lage sind, in OT-I CD8⁺ T-Zellen eine Effektorfunktion zu induzieren.

Naive antigenspezifische OT-II CD4⁺ T-Zellen wiesen nach Kokultur mit LSEC, KC und DC aus TF-OVA-Tieren keine Proliferation und Aktivierung auf. Dies änderte sich jedoch, wenn die NPZ zuvor mit exogenem Ovalbuminprotein inkubiert wurden. Es kam sowohl zu einer Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen als auch zu einer Verstärkung der Effektorfunktion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Im Vergleich mit der durch DC der Milz induzierten Effektorfunktion war die von KC und DC der Leber induzierte Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen, gemessen an der Produktion von IFN- γ , deutlich geringer. Das ist gut mit der physiologischerweise tolerogenen Eigenschaft der Leber vereinbar. Gleichwohl zeigen die Ergebnisse, dass professionelle APZ der Leber befähigt sind, CD8⁺ T-Zellen, nicht aber CD4⁺ T-Zellen, effektiv zu aktivieren und eine Immunreaktion gegen Antigene hepatozellulären Ursprungs auszulösen. Dieses Resultat legt nahe, dass CD8⁺ T-Zellen an den initialen Prozessen der Autoimmunität der Leber beteiligt sein könnten.

SUMMARY

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory liver disease leading to progressive destruction of hepatocytes due to an autoaggressive process. The reasons for the breakdown of self-tolerance are unknown. T-cells interact with cells of the body via T-cell receptors to control their integrity. In AIH, T-cells possibly recognize one or more antigens on hepatocytes and may initiate an immunological reaction. However, it is unknown, which T-cell subpopulation reacts against endogenous hepatocellular antigens and which of the non-parenchymal liver cells are capable of serving as antigen presenting cells (APC) and of activating antigen specific T-cells. To investigate this topic, we used the TF-OVA mice which express the transgenic protein ovalbumin in hepatocytes. We established a new process that allows isolation of different non-parenchymal liver cell lines at the same time. This isolation process included magnetic and fluorescence-activated cell sorting. We tested Kupffer cells (KC) and dendritic cells (DC), which are professional APC, as well as liver sinusoidal endothelial cell (LSEC), which are non-professional APC, for their capacity to present the endogenous antigen *in vitro*. We measured the degree of T-cell proliferation after three days of coculture by flow cytometry. LSEC, KC and DC from TF-OVA mice induced proliferation and activation in naive antigen specific OT-I CD8⁺ T-cells. The results are an indirect proof that the transgenic antigen from hepatocytes of TF-OVA mice was phagocytosed and processed by all three cell types and loaded antigen onto MHC-I. To analyze the effector function of activated CD8⁺ T-cells, we also measured IFN- γ in supernatants from cell cultures. Only the professional APC, namely KC and DC, were able to induce effector function in antigen specific CD8⁺ T-cells in a non-inflammatory context by presenting an antigen of hepatocellular origin.

Naive antigen specific OT-II CD4⁺ T-cells were not activated after coculture with LSEC, KC, or DC from TF-OVA mice. However, after pre-incubation of APC with exogenous ovalbumin protein, activation of OT-II CD4⁺ T-cells was observed, and the effector function of CD8⁺ T-cells was increased. Moreover, the effector function induced by spleen DC was stronger than that induced by KC and liver DC. This finding is in line with the tolerogenic function of the liver. Nevertheless, our results confirm that professional APC from the liver are capable of inducing effector function in CD8⁺ T-cells by presenting antigen of hepatocellular origin. Our findings suggest that CD8⁺ T-cells may be involved in the initial steps leading to autoimmunity in the liver.

1. EINLEITUNG

1.1. Grundlegendes zur Autoimmunhepatitis

Die Autoimmunhepatitis (AIH) gehört zu den Erkrankungen aus dem autoimmunen Formenkreis, die unbehandelt letal verlaufen kann. Selbst unter medikamentöser Therapie können eine Zirrhose und ein Leberversagen auftreten [1,2]. Die chronische Entzündung der Leber geht mit pathologischen Veränderungen des Immunsystems einher, bei denen die Hepatozyten zum Ziel der eigenen Immunabwehr werden. Die Ätiologie konnte bisher nicht geklärt werden.

Zwar sind 62% aller Betroffenen zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr, aber der Erkrankungsbeginn liegt meist im Kindesalter und die Patienten haben oft ihr gesamtes Leben lang wiederkehrend oder stetig Beschwerden (siehe Tabelle 1.1) [3,4]. Insgesamt stellt die AIH mit einer Prävalenz von 5–20/100.000 Einwohner ein vergleichsweise seltenes Krankheitsbild dar [5,6]. Sie tritt in jeder Bevölkerungsschicht und bei Frauen etwa drei bis vier mal häufiger auf als bei Männern [1,5,6]. Das Spektrum der Symptome reicht von diskreter Leistungsminderung oder Schmerzen im rechten Oberbauch bis zum akuten Leberversagen. Bei einem Drittel der Patienten sind erhöhte Transaminasen im Serum ein Zufallsbefund bei einer ärztlichen Routineuntersuchung [3,7]. Bei einigen Patienten ist eine Hypergammaglobulinämie Hinweis gebend und bei etwa 75% aller Patienten lassen sich Autoantikörper im Serum nachweisen [1,6,8]. Anhand der verschiedenen Spezifitäten der Autoantikörper kann eine Zuordnung zu Typ 1 oder Typ 2 der aktuellen Klassifizierung der Erkrankung erfolgen (Tabelle 1.1). Aber ein positiver Serologiebefund erlaubt für sich genommen noch keine eindeutige Diagnose einer AIH, weil ein erhöhter Titer von Autoantikörpern auch unspezifisch bei anderen Erkrankungen und auch beim gesunden Individuum vorliegen kann [8,9,10]. Darüber hinaus sind Überlappungssyndrome mit anderen autoimmunen Lebererkrankungen beschrieben. Bis zu einem Drittel der Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) zeigt auch Symptome und histologische oder biochemische Veränderungen, die für eine AIH sprechen [5,11]. Die Patienten mit AIH sind oft zusätzlich von extrahepatischen Autoimmunerkrankungen wie der Thyreoiditis, rheumatoiden Arthritis oder von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und perniziöser Anämie betroffen [5,6,7].

Wie bei vielen Autoimmunstörungen ist der konkrete Auslöser der Erkrankung noch nicht bekannt. Eine spezifische Therapie gibt es daher nicht. Als therapeutischer Standard bleibt im Fall der AIH die Anwendung von unspezifisch wirkenden Immunsuppressiva. Hier sind Prednisolon oder Budenosid zu nennen, die meist lebenslang und in Kombination mit Azathioprin verordnet werden [12]. Zur Entwicklung einer spezifischen Therapie oder Prävention der Erkrankung ist die Klärung der Pathogenese grundlegend. Daher fokussiert sich das Kapitel 1.2. auf die aktuellen Ansätze.

Tabelle 1.1: Merkmale und Diagnosekriterien von Typ 1 und Typ 2 der AIH. ANA (Anti-Nukleäre Antikörper), SMA (Antikörper gegen Filamente der glatten Muskulatur), SLA/LP (Lösliches Leberantigen/Leber-Pankreas), LKM-1 (Leber-Nieren-Mikrosomale Antikörper), ALC/LC (Antikörper gegen zytosolische Leberantigene), LM (Antikörper gegen Lebermembranbestandteile), HLA (humanes Leukozyten-Antigen) [1,4,11]

Merkmal	AIH Typ 1	AIH Typ 2
Vorrangiges Auftreten	<ul style="list-style-type: none"> · häufiger als Typ 2 · Häufung 10.–20. und 45.–70. Lebensjahr · meist milderer Verlauf und günstigere Prognose 	<ul style="list-style-type: none"> · Krankheitsbeginn meist akuter · Beginn 2.–14. Lebensjahr · Leberzirrhose oft schon bei Diagnose · raschere Progredienz
Serologie	<ul style="list-style-type: none"> · ANA · SMA · SLA/LP 	<ul style="list-style-type: none"> · LKM-1 · ALC/LC1 · LM
Genetik	<ul style="list-style-type: none"> · Träger des HLA-DR3: häufiger stärkere Symptome und Therapieresistenzen als · Träger von HLA-DR4: häufiger extra-hepatische Manifestationen 	<ul style="list-style-type: none"> · HLA-DR7 · HLA-DQB

1.2. Was zur Pathogenese der Autoimmunhepatitis bekannt ist

1.2.1. Alter, Geschlecht und Genetik haben Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung

Epidemiologisch stellt sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer AIH und dem weiblichen Geschlecht dar, ohne dass ein konkreter, ursächlicher geschlechtsspezifischer Mechanismus identifiziert werden konnte [13,14]. Bei ca. 40% der Patienten wird eine positive Familienanalyse für Autoimmunerkrankungen gefunden, daher sind genetische Analysen naheliegend [15]. Es lassen sich starke Assoziationen zu den „human leukocyte antigens“ (HLA) nachweisen, mit deren Vorliegen bzw. bei Homozygotie das Risiko für eine AIH und deren Schwere steigt [16]. Hier sind die Allele HLA-DRB1*0301 und HLA-DRB1*0401 zu nennen. Eine eindeutige Korrelation zum Auftreten der Erkrankung liegt wiederum nicht vor [8,17,18]. Die HLA beim Menschen stellen den „major histocompatibility complex“ (MHC) dar und sind an der Antigenpräsentation (AGP) gegenüber T-Zellen beteiligt. Die Hepatozyten werden bei der AIH zum Ziel der eigenen Immunabwehr und es liegen bestimmte HLA-Assoziationen vor. Daher scheinen die HLA zusammen mit T-Zellen, also Komponenten des erworbenen Immunsystems, an einer fehlerhaften Erkennung von Autoantigenen beteiligt zu sein. Dafür spricht auch das gehäufte Auftreten von Autoantikörpern bei den Patienten. Näheres siehe Kapitel 1.2.3. Histologie der Leber bei der AIH sowie Kapitel 1.5.8. Immunregulation, Anergie und Toleranzentstehung durch die Leber.

1.2.2. Können Medikamente oder hepatotrope Virusinfektionen die Autoimmunhepatitis auslösen?

Die Antibiotika Nitrofurantoin und Minocycline wurden im Zusammenhang mit dem Auftreten sowohl von Symptomen als auch im Zusammenhang mit Autoantikörpern und histologischen Zeichen identifiziert, die für eine AIH typisch sind [19,20,21]. Auffällig ist in diesen Fällen, dass nach dem Absetzen des jeweiligen Medikaments die Symptome verschwinden.

Als weiterer prädisponierender Umweltfaktor wurden hepatotrope Virusinfektionen betrachtet. Bei Patienten mit einer Infektion durch das Hepatitis-C-Virus (HCV) finden sich in ca. 10–30% der Fälle LKM-1 Autoantikörper im Serum [22,23,24]. Bereits 1990 vermuteten Lenzi et al., dass eine Infektion mit dem HCV zu einer veränderten Expression des körpereigenen Proteins führt, gegen das der Autoantikörper LKM-1 gerichtet ist [25]. LKM-1 ist für die AIH Typ 2 charakteristisch und erkennt ein Epitop des zytosolischen Enzyms CYP4502D6 der Hepatozyten. Die Aminosäuresequenz des Epitops weist Homologien zu Proteinsequenzen des HCV auf [22,26]. Ein Epitop ist der konkrete Bereich eines Moleküls, an den die lymphozytären Rezeptoren oder die Antikörper koppeln. Es wird für Autoimmunerkrankungen angenommen, dass die Strukturähnlichkeiten zwischen einem viralen Fremdprotein und einem autologen Protein zu einer pathologischen Immunreaktion gegen das körpereigene Protein und damit gegen eigene Organe oder Gewebe führt. Dieser Mechanismus wird „molecular mimicry“ genannt [27]. Für die AIH Typ 2 wurde in einem transgenen Mausmodell der direkte Zusammenhang zwischen einer Virusinfektion und der Antikörperbildung mit chronischer Leberschädigung nachgewiesen [18,26]. Die Immunpathologien, die zum Bruch der Selbsttoleranz führen könnten, werden in Kapitel 1.5.8. beschrieben.

1.2.3. Die Histologie der Leber bei der Autoimmunhepatitis

Die klassischen, histologischen Merkmale sind die „interface-hepatitis“ als lymphozytäre und plasmazelluläre Infiltration der Portalfelder und die Mottenfrass-Nekrosen. Nach neueren Studien sind sie als Prädiktor für die Diagnose und Schwere einer AIH nicht so geeignet wie die hepatozellulären Rosetten oder die Emperipolesis (intrazelluläre Aufnahme ganzer Zellen durch andere Zelltypen) [28,29]. Aber die „interface-hepatitis“ gab frühzeitig Hinweise auf die an der Pathogenese möglicherweise beteiligten Immunzellen. Darüber hinaus stellen die entzündlich aufgequollenen und geschädigten Hepatozyten das morphologische Korrelat der im Serum erhöhten Leberenzyme dar. In den Leberbiopsien von Patienten mit AIH konnten die zellulären Infiltrate anhand der Oberflächenmarker differenziert werden. Es fanden sich deutlich mehr T-Zellen als B-Zellen. Wobei die CD4⁺ T-Zellen v. a. im Bereich der Portalfelder und die zahlenmäßig geringeren CD8⁺ T-Zellen eher in den Zonen der Mottenfrass-Nekrosen zu finden waren [30,31].

Wegen der fehlenden Basalmembran können in den Sinusoiden der Leber Lymphozyten in direkten Kontakt mit parenchymatösen Zellen treten (Kapitel 1.3.). Da bei der AIH Hepatozyten zum Ziel der Immunabwehr werden, müssen zuvor autologe hepatozelluläre Proteine

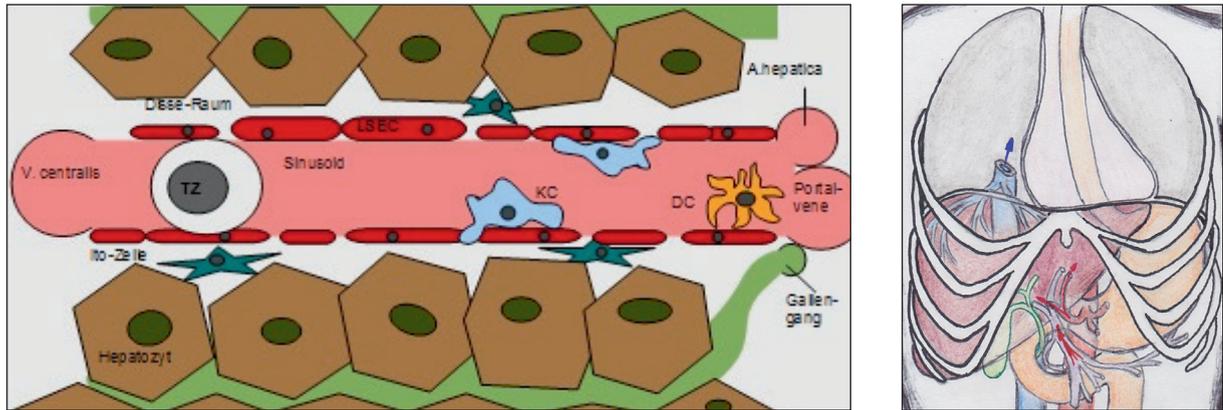
von Immunzellen als Antigene erkannt worden sein. Fraglich ist, ob die zur Immunreaktion führende Präsentation der hepatozellulären Antigene durch die Hepatozyten selbst oder über andere Leberzellen erfolgt. Diese könnten Hepatozytenfragmente aufgenommen haben, z. B. im Rahmen der physiologischen Zellerneuerung. Die möglichen Antigenpräsentationen über MHC-I- oder MHC-II-Moleküle mit Erkennung durch CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen werden in den Kapitel 1.5.3.–1.5.5. beschrieben.

1.3. Die Leber hat anatomische und physiologische Besonderheiten

Die pathologischen Veränderungen des Immunsystems, die zu einer AIH führen, müssen unter Berücksichtigung der anatomischen und physiologischen Besonderheiten der Leber betrachtet werden. Die Leber erhält als einziges Organ des Körpers neben der arteriellen Versorgung zusätzlich nährstoffreiches, venöses Blut über die Pfortader (V. portae). Auf diesem Wege erreichen viele exogene Substanzen die Leber, etwa Bestandteile der Nahrung sowie Bestandteile von Bakterien und Toxinen, die in direkten Kontakt mit den Leberzellen treten [32,33]. Innerhalb der Leber vereinigen sich die arteriellen und portalvenösen Äste und bilden als histologische Struktur die Sinusoide (schematische Darstellung in Abbildung 1.1 (A)). Sie haben einen relativ großen Querschnitt von 6–15 µm (normale Kapillaren 5–10 µm) [34,35]. Daraus resultiert ein hoher Gesamtquerschnitt, welcher eine geringe Strömungsgeschwindigkeit in den Sinusoiden bedingt [36,37].

Das begünstigt den Kontakt von aus dem Darmtrakt und aus dem Stoffwechsel stammenden Nähr- und Giftstoffen mit den Leberzellen. Die anatomische Lage und Gefäßversorgung der Leber sind in Abbildung 1.1 (B) dargestellt.

Die 0,5 bis 1 mm langen Sinusoide besitzen ein diskontinuierliches, fenestriertes Endothel ohne Basalmembran. Das ist eine weitere Besonderheit der Leber und findet sich in keinem anderen Organ [35,38]. Intrahepatisch entstehen dadurch direkte Kontakte zwischen intravasalen Lymphozyten und Leberendothelzellen (LSEC), Kupfferzellen (KC) und Dendritischen Zellen (DC). Die Fenestrations der LSEC und die fehlende Basalmembran ermöglichen auch direkte Zellkontakte zwischen den Immunzellen und den Sternzellen im Disse-Raum sowie den Hepatozyten [38,39]. In anderen Organen ist für eine Transmigration von Leukozyten durch ein Endothel mit durchgängiger Basalmembran eine Aktivierung der Endothelzellen mit Expression von Selektinen und Integrinen Voraussetzung [40]. Diese notwendige Aktivierung gewährleistet, dass ausschließlich im entzündlichen Kontext lokal Blut- und speziell Immunzellen in das Gewebe einwandern. Im Gegensatz dazu treffen in der Leber auch unter nicht inflammatorischen Bedingungen in einem sehr antigenreichen Milieu die mobilen Zellen des Immunsystems direkt auf die residenten Zellen der Leber [38,41]. Die Zusammensetzung der T-Zellpopulation ist im Vergleich zu anderen Organen ebenfalls eine



(A)

(B)

Abbildung 1.1: Schema eines Sinusoids (A), Überblick über die Anatomie der Leber (B). Der Stoffaustausch mit den Hepatozyten erfolgt über den 0,5–3 µm weiten Disse-Raum, dort sind die hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen) lokalisiert. Kupferzellen (KC) und Dendritische Zellen (DC) liegen intrasinusoidal. Passierende T-Zellen unterhalten Kontakte zu KC, DC sowie zu sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und Hepatozyten. Dies ist möglich durch den langsamen Blutstrom sowie durch interzelluläre (0,2–0,6 µm) und intrazelluläre Öffnungen (0,1 µm) der LSEC. Ein Ast von A. hepatica propria, V. portae und einem Gallengang werden als Glisson-Trias zusammengefasst, sie bilden ein Portalfeld. Die beiden Blutgefäße speisen das Sinusoid. Der Abfluss von Stoffwechselmetaboliten erfolgt über die V. centralis [35,38,83]. (A) modifiziert nach [39], (B) modifiziert nach Taschenatlas der Anatomie, Thieme.

Besonderheit. Das Verhältnis der intrahepatischen CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen ist umgekehrt im Vergleich zu dem anderer Organe: in der Leber 1:3,5 im Gegensatz dazu bei der Milz 1,8:1 und im Blut 2:1 [39,42,43].

1.4. Immunologische Eigenschaften der verschiedenen Leberzellen

1.4.1. Hepatozyten bilden das Parenchym

Die Hepatozyten sind große, polygonale Epithelzellen, die das Parenchym der Leber bilden. Sie formen innerhalb eines Leberläppchens ein- bis zweilagige Zellbalken. Ihre Hauptfunktion besteht in vielfältigen Prozessen des Intermediärstoffwechsels. Sie sezernieren auf der apikalen Seite die biliäre Flüssigkeit in die Gallenkanalikuli und auf der zum Disse-Raum gewandten, basolateralen Seite ist die Zelloberfläche durch Mikrovilli vergrößert. Einerseits wird über die Mikrovilli die Phagozytose der aus dem Blut der Sinusoide stammenden Substrate erhöht [44]. Andererseits entstehen durch diese zytoplasmatischen Ausläufer direkte Kontakte zwischen den Hepatozyten und den intrasinusoidalen Zellen. Aufgrund der fehlenden Basalmembran können Hepatozytenfragmente auch in das Sinusoidallumen gelangen (fenestriertes Endothel Kapitel 1.3.) [38,41].

Initial wurden Untersuchungen vorgelegt, die zeigten, dass humane Hepatozyten unter nicht inflammatorischen Bedingungen keine MHC-II-Moleküle sowie keine oder nur wenige

MHC-I-Moleküle exprimieren [45,46]. Neuere Studien ließen jedoch erkennen, dass die Parenchymzellen vergleichbar hohe Level von MHC-I aufweisen wie Milzzellen [47]. Bei den Analysen von Bertolino et al. induzierten die Hepatozyten als APZ *in vitro* eine Aktivierung von T-Zellen. Aber es folgte auf die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen deren Apoptose, der programmierte Zelltod als AICD. Dieser Ablauf scheint u. a. für die Toleranzinduktion der Leber (siehe Kapitel 1.5.8.) verantwortlich zu sein [48]. Auch bei der AGP gegenüber CD4⁺ T-Zellen wurde *in vitro* eine immunsupprimierende Wirkung nachgewiesen [49]. Aber es gibt auch anderslautende Untersuchungen: Wuensch et al. konnten eine effektive Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in der Leber nachweisen, weil die getesteten T-Zellen inflammatorisch wirkendes Interferon gamma (IFN- γ) sezernierten. Sie verwendeten jedoch ein Protein als Antigen, welches durch einen Adenovirus eingeführt und von Hepatozyten präsentiert wurde [50]. Hier kann die Mitwirkung des angeborenen Immunsystems als Reaktion auf den viralen Erreger nicht ausgeschlossen werden und daher ist bis jetzt noch nicht abschließend geklärt, ob Hepatozyten im nicht inflammatorischen Kontext antigenspezifische T-Zellen effektiv aktivieren können.

1.4.2. Fenestrations als Merkmal der sinusoidalen Leberendothelzellen

Unter den nicht-parenchymalen Zellen (NPZ) stellen die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) mit bis zu 50 % den größten Anteil dar. Diese flachen Endothelzellen kleiden als einschichtige Lage die Sinusoide aus (Abbildung 1.1 (A) und 1.2) [39]. Ihre große Zelloberfläche und ihre Position direkt am langsam vorbeiströmenden, nährstoffreichen Blut (siehe Kapitel 1.3.) begünstigen die Aufnahme von Molekülen aus dem Pfortaderblut (durch Rezeptor-vermittelte Endo- und Phagozytose) [51]. Sie tragen zur Entfernung von oralen Antigenen und oxidiertem „low-density lipoprotein“ (LDL) sowie durch Bindung von Immunkomplexen über ihren Fc-Rezeptor zur Entfernung der Moleküle aus dem Blutkreislauf bei. Dabei scheinen die Endothelzellen vor allem lösliche Makromoleküle und Kolloide unter 200 nm aufzunehmen [52,53,54]. Durch ihre interzellulären (0,2–0,6 μ m) und intrazellulären Öffnungen (0,1 μ m) ermöglichen LSEC Kontakte zwischen den intrasinusoidalen Zellen und den Zellen im Disse-Raum sowie zu Hepatozyten [38,55].

LSEC können über MHC-I-Moleküle sowohl endogene Antigene als auch im Modus der Kreuzpräsentation exogene Antigene (Kapitel 1.5.4.) gegenüber CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Dieser Präsentationsmodus wurde z. B. für i. v. oder p. o. appliziertes Ovalbumin (Hühnereiweiß) nachgewiesen. Darüber hinaus resultierte aber nach der Präsentation und Aktivierung der T-Zellen keine Effektorfunktion. Dies soll zur Antigentoleranz beitragen [51,56,57]. Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass spezifische CD4⁺ T-Zellen nach Prägung durch LSEC z. B. die Proliferation von naiven CD4⁺ T-Zellen unterdrücken [58]. Ob und mit welcher Quantität LSEC unter physiologischen Bedingungen MHC-II- und kostimulatorische Moleküle an ihrer Oberfläche aufweisen, ist nicht geklärt: Katz et al. sahen keine Expression [55]. Wohingegen von der Arbeitsgruppe um Limmer und Knolle Ergebnisse veröffentlicht wurden, die eine Expression

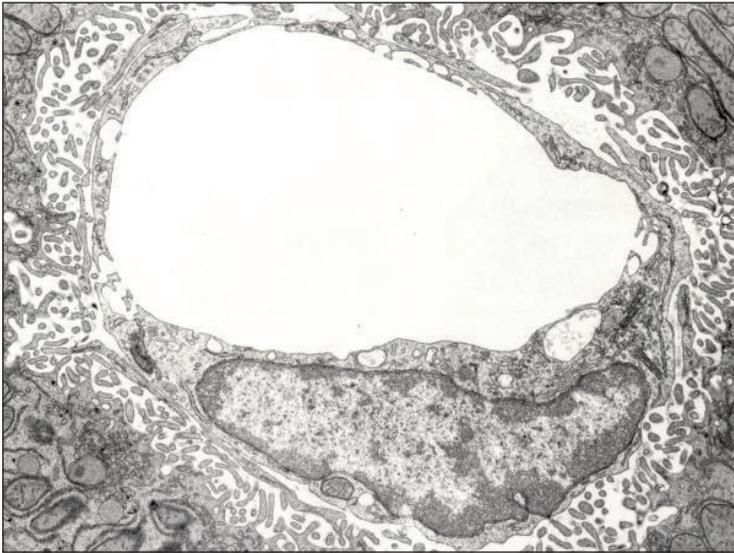


Abbildung 1.2: Morphologie von LSEC.

Erkennbar sind das Sinusoidallumen, die intrazellulären Lücken einer LSEC und der Endothelzellkern sowie Anschnitte von Hepatozyten mit Mikrovilli (linker und rechter Bildrand). Elektronenmikroskopische Aufnahme © Institut für Anatomie, Universität Bern

von MHC-II sowie von CD80 und CD86 auf LSEC zeigen [56,59]. Weitere Oberflächenmarker der LSEC sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

Die tolerogenen Eigenschaften beschränken sich nicht nur auf die direkten Interaktionen bei der Antigenpräsentation [51,56,57,58]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass LSEC nicht inflammatorisch auf bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS), reagieren. Die Anwesenheit von im portalvenösen Blut enthaltenen LPS bewirkt über eine verringerte Expression von CD54 eine verringerte Adhäsion von Leukozyten [60] und eine reduzierte Aktivierung von T-Zellen nach der Präsentation exogener Antigene durch LSEC [61]. Nach den Ergebnissen von Carambia et al. von 2013 scheinen LSEC sogar aktiv die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und IL-17 durch aktivierte Th1 und Th17 hemmen zu können [62].

1.4.3. Kupfferzellen phagozytieren apoptotische Zellen

Ursprüngliche Erkenntnisse deuteten darauf hin, dass myeloide Vorläuferzellen von Kupfferzellen (KC) zu Monozyten differenzieren und mit dem Blutstrom in verschiedene Gewebe und Organe einwandern [63]. Sie werden dort Makrophagen genannt und stellen eine der wichtigsten Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems dar (Kapitel 1.5.1). Die in der Leber residenten Makrophagen werden als KC bezeichnet. Sie entsprechen ca. 30% der NPZ der Leber und repräsentieren die größte Makrophagenpopulation des Körpers. KC befinden sich intrasinusoidal, vor allem periportal und liegen den LSEC meist eng an (Abbildung 1.1 (A) und 1.3) [41,64,65]. Innerhalb der Sinusoide und durch das fenestrierte Endothel hindurch können sie sich aktiv in den Disse-Raum bewegen (2 μ m/Min.) [36,66].

In den letzten 10 Jahren etablierte sich aufgrund neuer Forschungsergebnisse eine Subtypisierung der Population. Klassifiziert werden sie anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD80 und durch ihre Abstammung von Knochenmark-abhängigen Vorläuferzellen. Ein Teil der Leber-residenten KC scheint hepatische, sessile Vorläuferzellen zu haben [67]. In Abhängigkeit der Vorläuferzellen wurden konträre Effekte bei der Induktion von Immunre-

aktionen aufgezeigt: die CD80⁺⁺ KC bzw. KC des Subtyp M1 sollen über die Sekretion von TNF- α , IL-6 und IL-12 proinflammatorisch wirken. Demgegenüber werden KC mit geringerer Expression von CD80 bzw. Zellen des Subtyp M2 antiinflammatorische Effekte zugeschrieben [67,68].

So wurde einerseits nachgewiesen, dass KC durch die Produktion von TNF- α zur Entstehung der Leberfibrose beitragen [69,70] und es wurde auch gezeigt, dass sich Leberschädigungen verringern, wenn KC funktionell ausgeschaltet oder mittels Clodronate-Liposomen depletiert werden (Apoptose von KC nach Phagozytose der Clodronate-Liposomen) [71,72]. Diskrepanz zu diesen Studien, in denen eine Verstärkung von Leberentzündungen durch KC resultierte, stehen andererseits die Ergebnisse Knolle et al. [73]. Sie wiesen in den 1990er Jahren nach, dass humane KC *in vitro* bei Anwesenheit von LPS zwar proinflammatorisch wirkendes IL-6 und TNF- α sezernieren, doch in den Überständen ließ sich vorrangig IL-10 nachweisen [73]. IL-10, das potenteste antiinflammatorische Zytokin bewirkt bei LSEC und DC der Leber eine verringerte Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme, eine erniedrigte Expression von MHC-II-Molekülen und eine verringerte Aktivierbarkeit von T-Zellen. Durch diese antiinflammatorischen Effekte sollen KC (und LSEC) wiederum entscheidend zum tolerogenen Milieu der Leber und dadurch zur systemischen Toleranz beitragen [33,59,74]. Auch Ellett et al. legten Ergebnisse vor, nach denen KC protektiv und durch IL-10 antiinflammatorisch wirken [75]. Die Forscher induzierten in Mäusen eine passagere Leberischämie. Die Tiere, die zuvor eine Depletion der KC erhalten hatten, wiesen eine deutlich erhöhte Mortalität, mehr Lebernekrosen und weniger IL-10 auf. KC tragen in großem Umfang zur Beseitigung von Toxinen sowie von partikulärem und zellulärem Material bei, z. B. von apoptotischen Hepatozyten, Erythrozyten und Neutrophilen [70,76,77]. Die residenten Lebermakrophagen können exogene Antigene im Sinne einer Kreuzpräsentation über MHC-I-Moleküle den CD8⁺ T-Zellen darbieten [78] und darüber hinaus Antigene über MHC-II-Moleküle den CD4⁺ T-Zellen präsentieren [33]. Die AGP durch residente KC gegenüber CD4⁺ T-Zellen kann dabei antigenspezifische Treg induzieren [79]. Die unter physiologischen Bedingungen eher geringe Dichte an MHC-

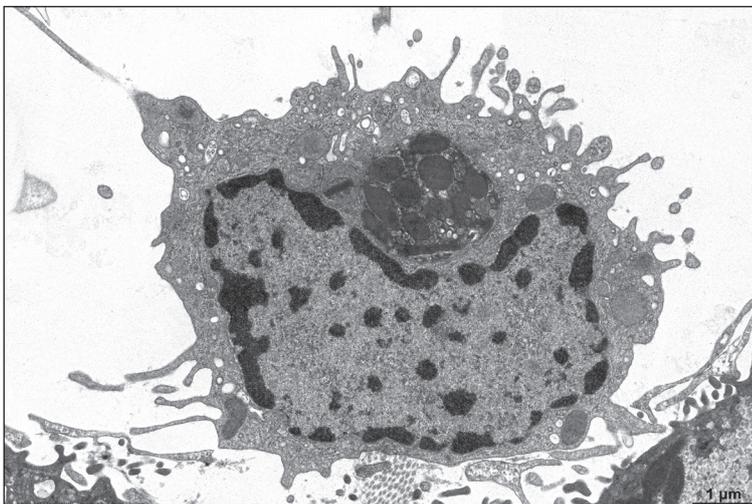


Abbildung 1.3: Morphologie von KC. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer KC (Ratte). Neben dem Zellkern ist das große Phagosom auffällig. © H. Jastrow, Universität Mainz

und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 [33] soll unter inflammatorischen Bedingungen deutlich ansteigen wie bspw. bei der chronischen Hepatitis-C [80]. Weitere Zellmarker der KC finden sich in Tabelle 3.1.

1.4.4. Dendritische Zellen – die Spezialisten der Antigenpräsentation

Dendritische Zellen (DC) kommen in allen Organen und Geweben des menschlichen Körpers vor [29]. Obwohl sie in der Leber nur ca. 1% der NPZ ausmachen [82], ist ihre Zahl damit im Vergleich zu anderen parenchymatösen Organen in der Leber am höchsten [83]. DC sind intrasinusoidal und dort v. a. in den Portalfeldern zu finden [84]. Im peripheren Gewebe kontrollieren sie mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern und Antigenrezeptoren ständig ihre Umgebung auf Antigene – das ist ihre Hauptfunktion.

Durch ihren Phänotyp (ruhend oder aktiv) und ihre Zytokinsekretion (z. B. IL-10 oder IL-4, IL-6, TNF- α und IFN- γ) während der Präsentation eines Antigens wird die immunologische Reaktion der interagierenden T-Zelle bestimmt (siehe Kapitel 1.5.3., 1.5.5. und 1.5.7.). Dabei stellen DC die potentesten APZ unseres Immunsystems dar, u. a. weil sie eine sehr hohe Phagozytoserate aufweisen, über viele verschiedene Antigenrezeptoren verfügen, eine hohe Dichte von MHC-Molekülen exprimieren und zahlreiche andere Zellen des Immunsystems aktivieren können (siehe Kapitel 1.5.1.) [85,86]. Doch in der Leber scheinen DC weniger immunogen zu sein als in anderen Organen. Im Vergleich zu DC der Milz und DC im Blut sind sie weniger aktiv in der Aufnahme von Antigenen, präsentieren Antigene weniger effektiv und aktivieren weniger T-Zellen [87,88,89]. Es wurde nachgewiesen, dass der Anteil reifer DC (MHC-II^{med./high}) in der Leber geringer ist als der Anteil in Herz, Nieren oder im Pankreas [83]. Dies könnte durch das an antiinflammatorischen Zytokinen reiche, hepatische Milieu bedingt sein. Zu diesen antiinflammatorischen Zytokinen zählen IL-10, TGF- β und Prostaglandine. DC der Leber sollen sowohl CD8⁺ T-Zellen [87] als auch CD4⁺ T-Zellen [89] aktivieren können.

Ein universeller Oberflächenmarker zur Identifizierung von DC existiert bis dato nicht. Auch die Subtypisierung von DC im humanen gegenüber dem murinen System ist nicht einheit-

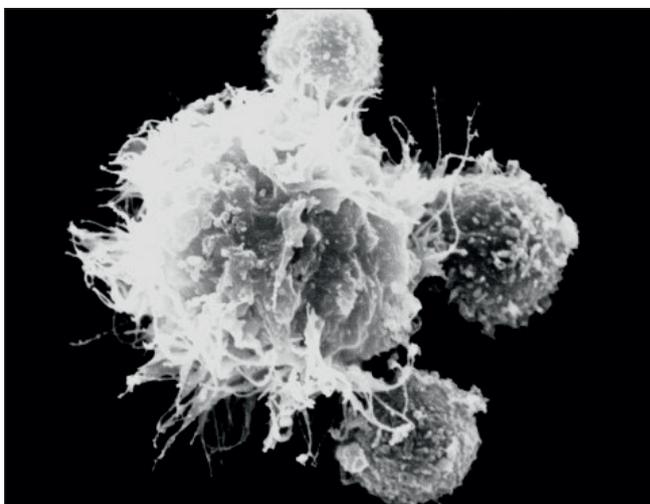


Abbildung 1.4: Morphologie von DC. Mit Hilfe ihrer zytoplasmatischen Ausläufer interagiert diese DC mit Lymphozyten. Rasterelektronenmikroskopie © Deutsches Krebsforschungszentrum

lich [90]. Unter physiologischen Bedingungen kann bei Mäusen CD11c als charakteristischer Zellmarker herangezogen werden [81]. In der murinen Leber werden DC aktuell in lymphoide und myeloide (früher konventionelle DC) sowie plasmazytoide DC (früher IFN- γ produzierende Zellen) unterteilt. Die verschiedenen Subtypen lassen sich anhand unterschiedlicher Expressionsmuster von CD8 α , B220 und CD11b differenzieren [87,91,92]. Genaueres zu den Zellmarkern in Tabelle 3.1.

1.4.5. Sonstige Zellen der Leber

Die Sternzellen oder auch Ito-Zellen befinden sich im Disse-Raum, sie haben regulär lange, zytoplasmatische Ausläufer und viele zytosolische Vitamin-A-Speicher. Sie bilden ein Netzwerk um die Sinusoide und vermögen über die Gefäßweite den intrasinusoidalen Druck zu regulieren. Eine Aktivierung der Sternzellen zieht deren Transformation mit erhöhter Kollagensynthese [32,44] und erhöhter Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen nach sich [93]. Die Synthese von Kollagen verändert die extrazelluläre Matrix und trägt zur Leberzirrhose bei [94,95].

Die Cholangiozyten kleiden als Epithelzellen die kleinen und großen Gallengänge aus. Sie modifizieren die Galle durch aktive Resorptions- und Sekretionsvorgänge von Wasser und Elektrolyten [44]. Murine Cholangiozyten wiesen nach der Isolation MHC-I- und MHC-II- sowie kostimulatorische Moleküle auf, aber durch das Modellantigen Ovalbuminpeptid konnte keine T-Zellaktivierung erfolgen [96]. Unstrittig ist jedoch, dass die Gallengangszellen bei Erkrankungen wie der PSC und PBC in die Entzündungsprozesse involviert sind [97].

1.5. Die Antigenerkennung durch das Immunsystem

1.5.1. Das angeborene Immunsystem reagiert schnell aber unspezifisch

Durch die Assoziation zu bestimmten HLA bei der AIH, die nachgewiesenen Beteiligungen von T-Zellen und detektierbaren Autoantikörper (siehe Kapitel 1.1., 1.2.1. und 1.2.3.) scheint vorrangig das erworbene Immunsystem für die pathologischen Vorgänge der Erkrankung verantwortlich zu sein. Aber es gibt auch Hinweise darauf, dass Zellen, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, an der Krankheitsentstehung beteiligt sind [98,99]. Daher sollen Grundprinzipien beider Teilsysteme nachfolgend dargelegt werden.

Zum angeborenen Teil gehören das Komplementsystem und die Akute-Phase-Proteine sowie Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, Mastzellen, DC und Natürliche Killer- (NK-) Zellen. Sie reagieren auf Signale von körpereigenen geschädigten Zellen aber v. a. auf unspezifische Muster von Fremdorganismen z. B. PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“, genetisch konservierte Moleküle auf der Zellmembran von Mikroorganismen). Registrieren bspw. DC solch mikrobielle PAMPs über ihre „pattern recognition receptors“ (PRR) bewirkt

das ihre Zellreifung. Dabei kann mit Hilfe von sezernierten, unterschiedlichen Zytokinen eine Erregerabwehr erfolgen [40,86]. Derart aktivierte DC können IL-12 und IL-18 freisetzen. Diese Zytokine führen z.B. zu einer Aktivierung von NK- und T-Zellen, die wiederum IFN- γ produzieren und damit zur Eliminierung des Erregers beitragen (siehe Kapitel 1.5.6. Effektorfunktion) [40]. Körper eigene Zellen werden dann zum Ziel der eigenen Immunabwehr, wenn sie durch Viren geschädigt oder tumorös verändert sind. Charakteristisch für den angeborenen Teil des Immunsystems ist eine Erkennung von eher wenigen Signalspezifitäten (ca. 100), auf die aber mit einer relativ schnellen Abwehr reagiert wird [85].

1.5.2. Das erworbene Immunsystem wirkt verzögert aber hochspezifisch

Beim erworbenen Immunsystem erfolgt die Erkennung von Pathogenen mit einer sehr hohen Spezifität. Zugehörig sind die Antikörper (Immunglobuline, Ig) sowie B- und T-Zellen (Lymphozyten). Beim jungen Erwachsenen liegen etwa 100 Millionen verschiedene T-Zellrezeptoren (=Antigenrezeptoren) vor [100]. Sie dienen der Erkennung jeweils eines spezifischen Antigens im Komplex mit MHC-Molekülen auf einer APZ. Der Aufbau eines T-Zellrezeptors und die Zusammenhänge einer Antigenerkennung sind in Abbildung 1.5) dargestellt.

Nach Janeways etabliertem Konzept muss ein Lymphozyt drei aktivierende Signale bei der AGP erhalten, um eine effektive, abwehrende Immunreaktion gegen das Antigen zu initiieren (siehe Kapitel 1.5.5.). Erst dann erfolgen die Proliferation als klonale Expansion und die Differenzierung des Lymphozyten zu effektiven Abwehrzellen z. B. mit Sekretion von IFN- γ [85,86]. Die mehrstufige Aktivierung erscheint sinnvoll, um nicht auf körpereigene Proteine abwehrend zu reagieren. So erfolgt bspw. keine Immunreaktion gegen das Hühnereiweiß Ovalbumin in Mäusen, die dieses Protein transgen in der Leber exprimieren [101]. In diesen Mäusen entspricht das Produkt des Transgens einem „Selbstprotein“. Wohingegen in nicht Ovalbumintransgen veränderten Mäusen nach Übertragung von Ovalbumin (mit einem Adenovirus oder i. v. Applikation) das Protein als fremd erkannt wird [50,57]. Wiederum oral appliziertes Ovalbumin wird zwar ebenso vom Immunsystem erkannt, aber induziert in murinen Untersuchungen eine tolerante Reaktion der T-Zellen [51]. Genaueres zu Toleranzentstehung durch die Leber in Kapitel 1.5.8.

1.5.3. Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Nachdem ein Erreger oder auch eine geschädigte körpereigene Zelle in eine Abwehrzelle aufgenommen wurde, ist es das Ziel der Immunabwehr, die Bestandteile des Erregers oder der geschädigten Zelle intrazellulär enzymatisch unschädlich zu machen. Die Proteine des Erregers (oder der geschädigten Zelle) werden zu Peptiden prozessiert. DC erfahren dafür als APZ eine Konformationsänderung hin zur reifen Zelle, wandern vom Ort der Antigenaufnahme mit dem Lymphstrom zu einem Lymphknoten oder der Milz. Dort findet regulär die Präsentation der prozessierten Peptide durch eine DC gegenüber einem Lymphozyten statt, der das Peptid (=Antigen) mit seinem spezifischen Antigenrezeptor erkennt. Bei ausreichen-

der Kostimulation expandiert der Lymphozyt und jede Tochterzelle steht als Effektorzelle für die Immunabwehr bereit. Eine Vielzahl dieser antigenspezifischen Effektorzellen zirkuliert zum Ort der Antigenquelle und beteiligt sich an der Pathogenabwehr. Gesunde Körperzellen präsentieren regelmäßig ihre eigenen Proteine im Komplex mit MHC-I-Molekülen und weisen damit ihre „Unversehrtheit“ gegenüber den CD8⁺ T-Zellen nach [40]. Auch CD8⁺ T-Zellen selbst können sich Antigene gegenseitig präsentieren und dadurch aktiviert werden („Fratri-zid“) [102].

Im Falle einer abgelaufenen Virusinfektion liegen Proteine des Erregers intrazellulär im Zytosol einer Körperzelle vor. Das dort lokalisierte Proteasom fragmentiert enzymatisch die Proteine (Prozessierung). Die Spaltprodukte werden unter Verbrauch von ATP durch „transporter associated with antigen processing“ (TAP) zum endoplasmatischem Retikulum (ER) transportiert (Abbildung 1.5). Im ER liegen MHC-I-Moleküle vor, die durch die Beladung mit einem Antigen eine Konformationsveränderung erfahren und dann als stabiler Antigen-MHC-I-Komplex das ER in Richtung der Zelloberfläche verlassen. Verankert in der Plasmamembran der APZ kann die Präsentation gegenüber einer CD8⁺ T-Zelle erfolgen [40,85]. Erreger, die von extrazellulär z. B. durch Phagozytose aufgenommen wurden, werden nach Verschmelzung des Phagosoms mit einem Lysosom durch die darin gespeicherten Proteasen fragmentiert (siehe Abbildung 1.5). Die Antigene der Erreger werden nach Fusion mit einem MHC-II enthaltenen, zytoplasmatischen Vesikel auf diese MHC-II-Moleküle geladen und für die Antigenpräsentation ebenfalls zur Zelloberfläche transportiert. Ein Antigen im Komplex mit MHC-II kann von einer CD4⁺ T-Zelle erkannt werden [40,85,103].

1.5.4. Kreuzpräsentation und professionelle Antigen-präsentierende Zellen

Ursprünglich wurde konstatiert, dass von intrazellulär stammende Antigene auf MHC-I-Molekülen und demgegenüber extrazelluläre Antigene ausschließlich auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Entgegen dieser Auffassung beschrieben in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts erstmalig Bevan et al. das Phänomen der Kreuzpräsentation [105]. Hierbei wird ein von extrazellulär stammendes Antigen auf MHC-I präsentiert und von einer CD8⁺ T-Zelle erkannt.

Es wird diskutiert, ob diese Antigene die Lipiddoppelmembran des sie umschließenden Phagolysosoms durchdringen und dadurch die Route eines intrazellulären Peptids bzw. Proteins nehmen [103,104]. Alternativ könnte das extrazelluläre Protein in das ER aufgenommen werden und von dort zurück in das Zytosol transportiert werden (Retrotranslokation). Durch das dort lokalisierte Proteasom könnte dann die weitere Prozessierung erfolgen und der TAP-abhängige Ablauf erneut über das ER zu einer Beladung von MHC-I führen [40,85].

Zunächst wurde die Fähigkeit der Kreuzpräsentation nur den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) zugeschrieben [106]. Dazu zählen DC, Makrophagen und B-Zellen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Phagozytoserate, effektive Antigenprozessierung, höhere Dichte von MHC-I-, MHC-II-, kostimulatorischen und adhäsiven Molekülen aus [39,85,86].

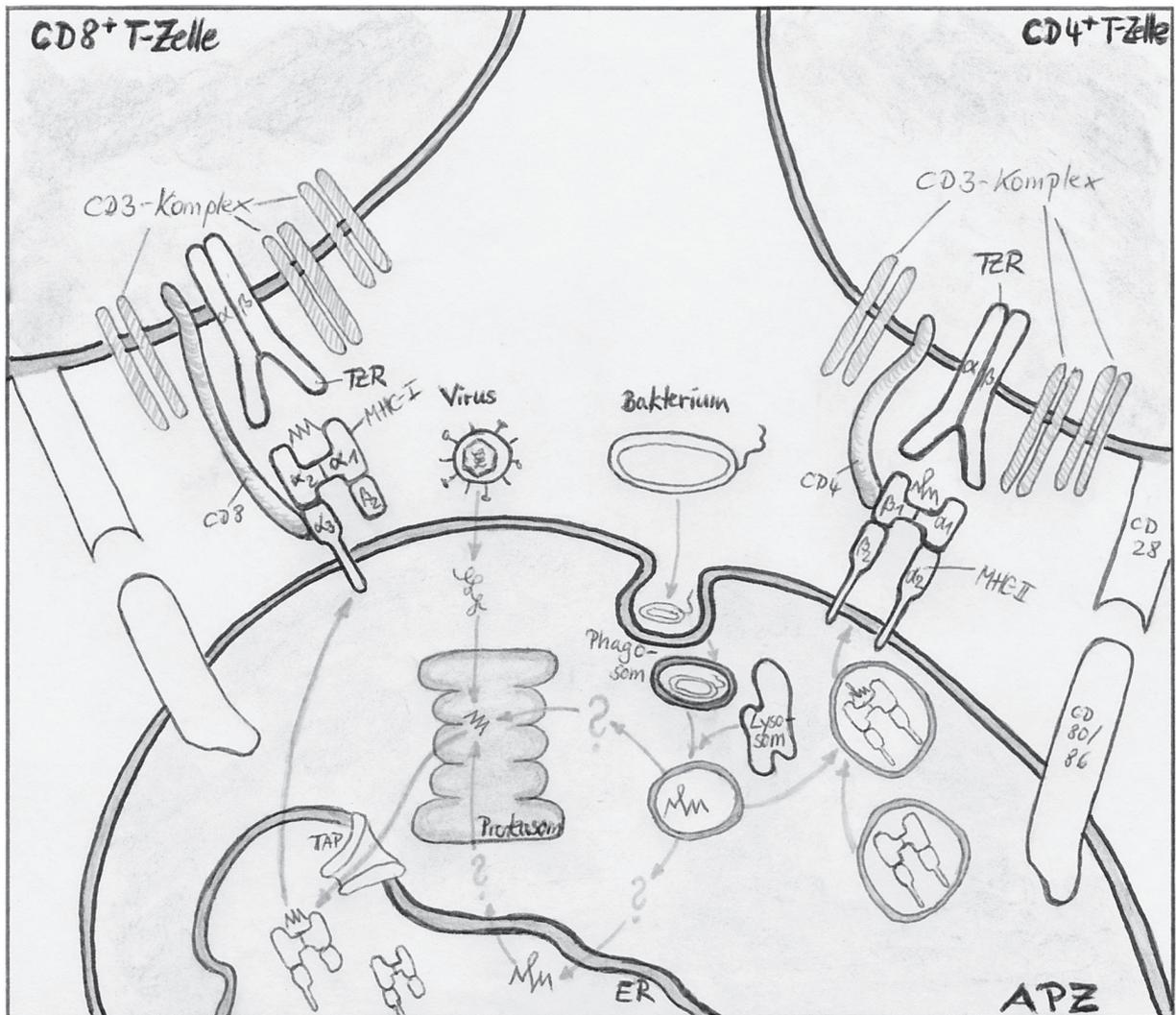


Abbildung 1.5: Schema der Antigenprozessierung und -präsentation. Die membranverankerten Antigenrezeptoren (TZR) bestehen bei 95% der T-Zellen im Blut aus einer α - und einer β -Kette. Das monomorphe CD3-Molekül ist mit dem TZR assoziiert und für die Signaltransduktion verantwortlich. Ein MHC-I-Molekül besteht aus einem β_2 -Mikroglobulin und einer α -Kette, welche in der Zellmembran verankert ist. Die α_1 - und α_2 -Domäne bilden die Bindungsstelle für das Antigen. Die α_3 -Domäne enthält eine Bindungsstelle für das CD8-Molekül von CD8⁺ T-Zellen. Die β_1 -Domäne des MHC-II-Moleküls enthält die Bindungsstelle für CD4 von CD4⁺ T-Zellen. Diese Bindungen stabilisieren als Korezeptoren während der Antigenerkennung die Interaktion des TZR mit dem jeweiligen Antigen-MHC-Komplex. Das MHC-II-Protein ist in der Zellmembran mit seiner α - und β -Kette verankert. Die Antigenfurche bindet längere Peptide (12-25 Aminosäuren) als die des MHC-I (8-10 Aminosäuren), da Letzteres an den Längsenden geschlossen ist [40,85]. Wenn eine APZ neben dem beladenen MHC-Komplex (Signal 1 nach Janeway) an ihrer Oberfläche CD80 oder CD86 (Signal 2) exprimiert und aktivierende Zytokine sezerniert (Signal 3), kann eine vollständige Aktivierung der naiven, antigenspezifischen T-Zelle erfolgen [40]. Bakterien als extrazelluläre Antigene können mit oder ohne Bindung an Oberflächenrezeptoren phagozytotisch in die APZ aufgenommen werden. Aus dem Phagolysosom heraus kann eine Prozessierung des extrazellulären Antigens im Proteasom mit oder ohne Umweg über das ER erfolgen. Somit würde es den für intrazelluläre Antigene typischen Prozessierungsweg nehmen und könnte im MHC-I-Komplex einer CD8⁺ T-Zelle präsentiert werden (Kreuzpräsentation) [103,104]. Modifiziert nach [40,85,86].

Später gelang der Nachweis, dass auch nicht professionelle APZ wie LSEC zur Kreuzpräsentation von Antigenen über MHC-I befähigt sind [51,57].

1.5.5. Aktivierung von T-Zellen

Die Erkennung des spezifischen Antigens über seinen TZR stellt für einen naiven Lymphozyten das Signal 1 entsprechend des von Charles A. Janeway begründeten Konzepts der T-Zellaktivierung dar [40]. Das Signal 2 entspricht der Kostimulation. Hierfür wird zunächst LFA-1 auf lymphozytärer Seite an ICAM-1 oder -2 der APZ gebunden. Das stabilisiert die Interaktion. Die APZ exprimiert daraufhin verstärkt kostimulatorische Moleküle. Dazu gehören die B7-Moleküle CD80/ CD86, die an CD28 der T-Zelle binden oder CD40 der APZ, das an CD40L (CD154) der T-Zelle bindet (Abbildung 1.5). Innerhalb der T-Zelle beginnt eine intrazelluläre Signalkaskade mit eigener Aktivierung, die mit der Sekretion von IL-2 verbunden ist. Dieses Interleukin wirkt autokrin als Wachstumsfaktor und verstärkt die Aktivierung. Dieser Prozess der erstmaligen Antigenpräsentation gegenüber einer naiven T-Zelle mit nachfolgender Aktivierung und klonaler Expansion wird als deren Prägung („priming“) bezeichnet [40,85].

Je nach Art des Antigens bzw. des Erregers, welches bzw. welcher von einer DC aufgenommen wird, sezerniert eine DC während des „priming“ verschiedene Zytokine. Diese proinflammatorisch wirkenden Zytokine entsprechen dem Signal 3 der T-Zellaktivierung nach Janeway [40]. Sie beeinflussen die Differenzierung der T-Zelle in die auf den Erreger abgestimmte Untergruppe von Effektorzellen.

1.5.6. Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen

Nach der vollständigen, antigenspezifischen Aktivierung einer naiven CD8⁺ T-Zelle differenziert sie zur Effektorzelle und wird dann als zytotoxische T-Zelle (zytotoxischer T-Lymphozyt, ZTL) bezeichnet. In dieser Form sezerniert sie als Effektorzytokin IFN- γ , welches dazu führt, dass APZ mehr MHC-I- und mehr kostimulatorische Moleküle exprimieren und damit mehr Antigene präsentieren können. IFN- γ führt nach der Rezeptorbindung (IFNGR-1 oder -2) zur Aktivierung des JAK-STAT-Pfades, welcher eine Aktivierung der Rezeptor tragenden Zelle zur Folge hat. Makrophagen und DC reagieren nachfolgend mit verstärkter Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokinsekretion. Damit hat IFN- γ physiologisch und pathologisch einen proinflammatorischen Effekt auf die Komponenten des Immunsystems [40,86,107].

ZTL können körpereigene Zellen durch Ausbildung von immunologischen Synapsen zerstören. An der Kontaktstelle zwischen einem ZTL und der Zielzelle werden Granzyme (Serinproteasen) freigesetzt. Sie induzieren die Apoptose, den programmierten Zelltod, der Zielzelle über eine Schädigung der Mitochondrien oder durch die Aktivierung der Caspase 3. Sie führt letztlich zur Fragmentation der DNA und damit zum Untergang der Zelle. Auch durch die Bindung des Transmembranproteins FasL (CD95L) oder TRAIL („TNF-related apoptosis-inducing ligand“) an die entsprechenden Rezeptoren der Zielzelle kann Apoptose erfolgen [40]. Damit wahren ZTL die Integrität des Gesamtorganismus durch Eliminierung körpereigener Zellen,

die durch intrazelluläre Viren- oder Bakterieninfektion, durch Tumore oder Zellalterung pathologisch verändert sind. Die Effektorzelle benötigt ausschließlich das präsentierte Antigen (Signal 1) zur Einleitung der effektiven Immunantwort und damit auch weniger Zeit bis zur Erregerabwehr im Vergleich zu einer naiven T-Zelle [40,86,108].

1.5.7. Effektorfunktionen der CD4⁺ T-Zellen

Die Sekretion von IFN- γ und IL-12 durch eine DC während der AGP gegenüber einer CD4⁺ T-Zelle bewirkt deren Differenzierung in eine T-Helferzelle vom Subtyp 1 (Th1). Als Effektorfunktion sezerniert sie dann u. a. selbst IFN- γ und IL-2. Diese Zytokine führen zu einer Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, NK sowie Makrophagen und Granulozyten, was die Abwehr intrazellulärer Erreger verstärkt (CD8⁺ T-Zellhilfe, zellvermittelte Immunabwehr). Th1 stimulieren darüber hinaus die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und dirigieren einen Klassenwechsel der Antikörper in Richtung Immunglobulin G (IgG, humorale Abwehr) [40,86].

B-Zellen werden aber auch vom Subtyp 2 (Th2) der CD4⁺ T-Zellen unterstützt. In ihrer Effektorfunktion fördern diese v. a. die Abwehr extrazellulärer, mehrzelliger Erreger wie Parasiten. Durch Th2 aktivierte B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, die IgE sezernieren. Mit IgE können Parasiten opsoniert und dadurch für Mastzellen und Granulozyten kenntlich gemacht werden. Diese zwei Zelltypen setzen Histamin frei, welches die Abwehrreaktion verstärkt. Die Differenzierung zu Th2 wird durch die Freisetzung von IL-4 während der AGP induziert [40,86].

Wenn eine DC extrazelluläre Bakterien registriert und dadurch aktiviert wird, kann sie interagierende, spezifische CD4⁺ T-Zellen durch die Sekretion von IL-6, IL-21 und TGF- β während der Antigenpräsentation zur Differenzierung in den Subtyp Th17 stimulieren. Deren Effektorfunktionen richten sich gegen die auslösenden extrazellulären Erreger und sind durch die Sekretion der Effektorzytokine IL-17, IL-21, IL-22 und TNF gekennzeichnet [40,86,108,109].

1.5.8. Immunregulation, Anergie und Toleranzentstehung durch die Leber

Laut Janeway sind für eine naive T-Zelle drei Aktivierungssignale erforderlich, um eine effektive T-Zellreaktion gegen ein Antigen auszulösen (Kapitel 1.5.5.). Für die Entstehung eines ZTL ist es sogar meist erforderlich, dass eine aktivierte DC im Rahmen der Antigenpräsentation zusätzlich durch eine CD4⁺ T-Zelle stimuliert wird, um weitere notwendige kostimulatorische Moleküle zu exprimieren [40,109]. Im physiologischen Verlauf einer Immunreaktion kommt es mit der Eliminierung des Erregers zunehmend zur Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β . Dadurch wird eine Immunreaktion reguliert und schließlich beendet. Mit dem Verschwinden von pathogenen Proteinen induzieren ZTL auch gegenseitig Apoptose (aktivierungsinduzierter Zelltod, AICD) durch zunehmende Bindungen von Fas und FasL untereinander. Dies hilft, eine überschießende Immunreaktion zu verhindern [86,110].

Wird dagegen ein Proteinbestandteil ohne weitere Aktivierungssignale durch DC präsentiert, führt das zur Anergie oder Deletion der interagierenden spezifischen T-Zelle oder sie differenziert zu einer T-Suppressorzelle [40,43]. An dieser Schaltstelle zwischen dem angebo-

renen Immunsystem (APZ wie DC) und dem erworbenen Immunsystem (T-Zelle) entscheidet sich die immunologische Konsequenz der AGP. Anergie und Suppression sind dabei zwei Mechanismen, die eine periphere Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen gewährleisten. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass auf eine intrahepatische Antigenpräsentation von exogenen Proteinen keine inflammatorische Immunreaktion folgen muss, z. B. auf Antigene aus Bestandteilen der resorbierten Nahrungsmittel oder der kommensalen Darmflora. Das wird als orale Toleranzinduktion bezeichnet [51,74]. Über die V. portae erreicht stetig das an Fremdproteinen reiche Blut die Leber und durch die fehlende Basalmembran können direkte Kontakte zu den Hepatozyten und den NPZ der Leber entstehen (Kapitel 1.3.). Die stetige Anwesenheit der Fremdproteine ohne inflammatorischen Kontext sowie die Präsentation von Antigenen der Fremdproteine gegenüber den Immunzellen direkt in der Leber (nicht im lymphatischen Gewebe) scheinen die toleranten Immunreaktionen zu ermöglichen. Dadurch wird eine schädliche, inflammatorische Reaktion gegen Nahrungsbestandteile verhindert [50,101,111,112]. Die Toleranzinduktion soll einerseits durch das an antiinflammatorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β , Prostaglandine) reiche Milieu der Leber ermöglicht werden [33,59,73] und andererseits durch die Kreuzpräsentation oraler Antigene durch LSEC [51]. Darüber hinaus bedingen KC im Zusammenspiel mit hepatischen regulatorischen T-Zellen (Treg) ebenfalls Toleranzeffekte [33,74]. Bereits 1969 wurde die Rolle der Leber bei der Induktion systemischer Toleranz erkannt. In experimentellen Allografttransplantationen von Nieren zwischen nicht verwandten Tieren verlängerte die zeitgleiche Übertragung der Leber das Überleben des Nierentransplantates. Damit gilt die Leber als Toleranz induzierendes Organ [113].

Wie es aber bei der AIH zum Bruch der Toleranz und zur Autoimmunität kommt, kann aktuell nur mittels Theorien vermutet werden. Es zeigt sich bei der AIH ein Zytokinmilieu innerhalb der Leber, das reich an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-17 und IL-1 β ist [114,115]. Einerseits erscheint theoretisch möglich, dass anerge, autoreaktive T-Zellen durch diese proinflammatorischen Zytokine aktiviert werden, wenn durch infektiöse oder traumatische Entzündungen (z. B. viral oder hypoxisch bedingt) die immunologische Toleranz zu Gunsten der Abwehr verschoben wird. Andererseits ist postinfektiös ein Versagen der peripheren Toleranz durch „molecular mimicry“ denkbar [27]. Darüber hinaus sind bei Patienten mit AIH quantitative und funktionelle Einschränkungen der Treg beschrieben [116,117]. Es konnte jedoch noch nicht aufgedeckt werden, welche T-Zellpopulation primär ein von hepatischen Zellen präsentiertes Autoantigen erkennt und damit die initiale autoreaktive Immunreaktion anstößt.

1.6. Fragestellung

Das Immunsystem des Menschen ist auf der einen Seite gekennzeichnet durch die Fähigkeit zur Toleranz gegenüber körpereigenen Geweben und Organen sowie durch die Fähigkeit zur Abwehr von körperfremden, pathogenen Strukturen auf der anderen Seite. Dadurch wahrt das Immunsystem die Körperintegrität nach außen und innen bei Entzündungen, Infektionen oder Neoplasien und Gewebedifferenzierungen. Bei der AIH kommt es zum Bruch der „Selbsttoleranz“ mit autoaggressiven Prozessen gegen körpereigene Hepatozyten, die bis zur Leberzirrhose führen können. Die Krankheitsursachen sind bis jetzt nicht bekannt. Da die Symptome der AIH erst weit nach der initialen pathogenetischen Störung auffällig werden, verhindert das die Grundlagenforschung am Menschen. Daher bleiben tierexperimentelle Untersuchungen notwendig zur Aufklärung der zugrunde liegenden Pathogenese. Mit den TF-OVA-Mäusen liegt ein Versuchsmodell vor, bei dem durch das transgene Ovalbuminprotein die Reaktion von T-Zellen auf ein endogenes, hepatozelluläres Antigen getestet werden kann. Das Transgen für Ovalbumin ist unter der Kontrolle des Transferrinrezeptor-Promotors kodiert. Nach Transkription und Translation wird das synthetisierte Modellprotein in der Zellmembran der Hepatozyten verankert. Das Ovalbumin folgt somit stets dem physiologischen Weg eines regulären, autologen Zellproteins.

Wenn, wie bei der AIH, Komponenten des Immunsystems gegen ein autologes Hepatozytenprotein agieren, sind zwei Varianten denkbar, wie das Immunsystem dagegen aktiviert wurde. Einerseits könnten Immunzellen eine Struktur direkt auf den Hepatozyten fehlerhafter Weise als fremd erkannt haben – die Hepatozyten würden als APZ agieren. Andererseits wäre es möglich, dass benachbarte NPZ Hepatozytenfragmente über Phagozytose aufgenommen haben und dann indirekt ein Proteinbestandteil der Hepatozyten gegenüber den Immunzellen präsentiert haben. Für eine Erkennung durch T-Zellen müssten die Hepatozytenproteine nach der Phagozytose in den NPZ prozessiert und die Antigene schließlich auf MHC-Moleküle geladen werden. Beide Varianten, die direkte und die indirekte Antigenerkennung, könnten über die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen zur Initiierung einer Abwehrkaskade führen, die schließlich auch B-Zellen mit der Bildung von (Auto-) Antikörpern involviert. Eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch die Präsentation eines Hepatozyten-assoziierten Antigens durch NPZ würde einer Kreuzpräsentation entsprechen, da das ursprüngliche Protein nicht von der präsentierenden Zelle selbst sondern von extrazellulär stammt. Eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen würde beweisen, dass Antigene des hepatozytären Proteins auf MHC-II-Moleküle geladen werden.

In vivo wurde für das TF-OVA-Modell bereits eine intrahepatische, antigenspezifische Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen. Durch Depletionsversuche wurde auch gezeigt, dass für die effektive Aktivierung mit Bildung von CD8⁺ Effektorzellen Knochenmark-abhängige NPZ der Leber notwendig sind [118]. Aber *in vivo* unterliegen alle Resultate multilateralen Interaktion zwischen allen lokalen, organständigen und den systemischen Zellen sowie humoralen

Komponenten des Immunsystems. Um ganz konkret aufzudecken, welche der hepatischen Zellpopulationen antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren vermag, stellte diese Arbeit die *in vitro* Testung der einzelnen NPZ als APZ gegenüber antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen und auch gegenüber antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen in den Mittelpunkt. Dabei sollten Antworten gefunden, auf die Fragen

- (1) welche der NPZ die Hepatozytenfragmente inklusive des transgenen Ovalbumins aufnimmt;
- (2) ob Antigene der prozessierten Hepatozytenproteine gegenüber CD8⁺ T-Zellen (Kreuzpräsentation) oder gegenüber CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden;
- (3) ob CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen durch Antigene der prozessierten Hepatozytenproteine aktiviert werden können und ob sie dabei in Effektorzellen differenzieren.

Anhand der OT-I CD8⁺ T-Zellen und der OT-II CD4⁺ T-Zellen mit transgenem TZR können spezifisch Peptidsequenzen aus dem Ovalbuminprotein im Komplex mit MHC-Molekülen untersucht werden. Um auf der Seite der hepatischen NPZ die Antigenpräsentation sowohl der professionellen als auch der nicht-professionellen APZ erfassen zu können, konzentrieren wir uns aus methodischen Gründen auf KC und DC gegenüber den LSEC. Jede dieser Populationen sollte aus TF-OVA-Mäusen isoliert und jeweils *in vitro* mit CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen getestet werden. Wenn es bei diesen Untersuchungen durch Präsentation von Antigenen des in Hepatozyten exprimierten Ovalbumins zu einer effektiven Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen kommt, wäre experimentell der Beweis erbracht, dass durch ein endogenes (Hepatozyten-assoziiertes) Protein T-Zellen aktiviert werden können. Bei einer effektiven T-Zellantwort könnten Körperzellen, die dieses Protein exprimieren, zum Ziel der Immunabwehr werden. Damit wäre auf zellulärer Ebene ein Prozess aufgezeigt, mit dem die initiale Pathogenese bei der AIH beginnen könnte, wenn bspw. im inflammatorischen Kontext oder bei fehlerhaften, peripheren Toleranzmechanismen die Balance der Immunität zu Gunsten der Abwehr verschoben würde.

2. METHODIK

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätebezeichnung	Firma/ Standort
Bestrahlungsgerät für Zellen (Cäsiumquelle), Typ OB29/4/9503-11	Institut für Transfusionsmedizin, Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin
Brutschrank Hera Cell 150	Kendro Laboratoy Prod. GmbH, Langenselbold
Digitalcamera D70 Kit, Zoom 18-70mm, f/3,5-4,5G	Nikon
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen und -kanülen (Größe 25“)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FACS Aria I und II	Becton Dickinson, Heidelberg
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss, Jena
MACS® Prä-Separationsfilter	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
MACS®-LS-Säulen, -Ständer, -Magneten	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten 96-Loch Flach- und Rundboden	BD Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten 96-Loch-Flachboden („high-absorb“)	eBioscience, San Diego, USA
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hess.Oldendorf
Pinzetten anatomisch, chirurgisch	Outils Rubis SA, Stabio, Schweiz
Präparierschere	B. Braun, Aesculap AG, Tuttlingen
Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 5ml, 15ml und 50ml	BD Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg
Schüttler Thermoshake	Gerhardt
Spectrophotometer DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Sterilwerkbank Lamin Air® HBB2448	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler GeneAmp PCR System 96000	PerkinElmer, Waltham, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zellsieb (70µm)	BD Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugen:	Centrifuge 5810R Megafuge 1.0 Rotina 420R Tischzentrifuge 5415R
	Eppendorf, Hamburg Heraeus Instruments, Hanau Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Reagenzien, Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Chemikalien

Material	Firma/ Standort
Agarose	Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Carboxyfluoreszein-(diacetat-) Succinimidyl Ester (CFDA-SE/ CFSE) in DMSO	Invitrogen GmbH (Molecular Probes), Karlsruhe
Collagenase Typ-IV	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNA-Marker (GeneRuler™ 100bp DNA-Ladder)	Fermentas
ELISA-Kit (IFN- γ , IL-2, IL-10)	eBioscience, San Diego, USA
Ethanol	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Ethidiumbromid 10mg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FCS), Hitze-inaktiviert für 30 Minuten bei 56°C	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin 10mg/ml	Biochrom AG, Berlin
Ionomycin (IM)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe
Ovalbuminpeptid (OVA ₂₅₇₋₂₆₄) Sequenz: SIINFEKL	Institut für Biochemie, Humboldt Universität Berlin
Ovalbuminpeptid (OVA ₃₂₃₋₃₃₉) Sequenz: ISQAVHAAHAEINEAGR	Institut für Biochemie, Humboldt Universität Berlin
Ovalbuminprotein Grad V	Sigma Aldrich (Chemie GmbH), Steinheim
Paraformaldehydlösung (PFA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin 10.000U/10mg/ml	Biochrom AG, Berlin
Percoll separating solution ($\rho=1,124\text{g/ml}$)	Biochrom AG, Berlin
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Platinum® PCR SuperMix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Proteinase K 10mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roswell Park Memorial Institute medium 1640	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
β -Mercaptoethanol	Sigma, Aldrich, Taufkirchen

2.1.3. Medien und Puffer

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Medien und Puffer

Puffer und Stocklösungen	Zusammensetzung
Erythrozytenlyse-Puffer (pH=7,4)	1M KHCO ₃ 150mM NH ₄ Cl 0,1mM EDTA
Fixierlösung (pH=7)	1×PBS mit 0,5% PFA
MACS-Puffer	1×PBS mit 0,5% BSA 2mM EDTA
PBS/EDTA	1×PBS mit 2mM EDTA
PBS/FCS	1×PBS mit 1% FCS
PBS/Tween-Puffer	1×PBS mit 0,1% Tween 20
Percoll-Trennlösung	1×PBS mit 42% Percoll (ρ=1,124 g/ml) (v/v)
RPMI/FCS	RPMI mit 5% FCS
Phosphorsäure	1M H ₃ PO ₄
TAE-Puffer (pH=8)	40mM Tris 1 mM EDTA 20mM Eisessig
Enzym-Mediumansatz	RPMI 1640 mit 10% FCS 0,05% Collagenase Typ-IV
Willie-Puffer (PCR-Lysepuffer, pH=8,5)	100mM Tris/ 200mM NaCl 10mM EDTA/ 0,2% SDS
Zellkulturmedium	RPMI 1640 mit 10% FCS (v/v) 1% Penicillin/ Streptomycin/ 1% L-Glutamin 0,5% Gentamycin 0,1% β-Mercaptoethanol

2.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten synthetischen Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Spezifität
OVA up	CAAGCACATCGCAACCA	Ovalbumin <i>Gallus gallus</i>
OVA down	GCAATTGCCTTGTCAGCAT	

2.1.5. Antikörper

Tabelle 2.5: Übersicht der für Durchflusszytometrie und FACS verwendeten Antikörper

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft	Einsatz
CD4 (RaM)	RM 4-5	PerCP	BD Pharmingen™, Heidelberg	1:100
CD8α (RaM)	53 – 6.7	PerCP	BD Pharmingen™, Heidelberg	1:100
	53 – 6.7	APC	eBioscience, San Diego, USA	1:200
	53 – 6.7	FITC	eBioscience, San Diego, USA	1:100
CD11b (RaM)	M1/70	PE	eBioscience, San Diego, USA	1:400
	M1/70	V450	BD Pharmingen™, Heidelberg	1:400
CD11c (RaM)	N418	PE	eBioscience, San Diego, USA	1:400
CD19 (RaM)	MB19-1	PE	eBioscience, San Diego, USA	1:400
CD31 (RaM)	390	PE	eBioscience, San Diego, USA	1:200
CD44 (RaM)	IM7	Biotin	eBioscience, San Diego, USA	1:200
	IM7	APC	eBioscience, San Diego, USA	1:400
CD45 (RaM)	30-F11	Biotin	eBioscience, San Diego, USA	1:200
CD62L (RaM)	MEL-14	FITC	eBioscience, San Diego, USA	1:100
CD69 (RaM)	H1.2F3	PE	eBioscience, San Diego, USA	1:400
F4/80 (RaM)	BM8	APC	eBioscience, San Diego, USA	1:200
Va2 (RaM)	B20.1	FITC	eBioscience, San Diego, USA	1:100
	B20.1	PE	eBioscience, San Diego, USA	1:400
MHC-II (RaM)	M5/114.15.2	Biotin	eBioscience, San Diego, USA	1:200
Streptavidin-Anti-Biotin (SA)		FITC	eBioscience, San Diego, USA	1:100
		PerCP	BD Pharmingen™, Heidelberg	1:100
		APC	eBioscience, San Diego, USA	1:400
		APC-Cy7	eBioscience, San Diego, USA	1:400

Tabelle 2.6: Übersicht der für ELISA verwendeten Antikörper

Zytokin	Erstantikörper	Zweitantikörper
Maus IL-2	JES6-1A12	JES6-5H4
Maus IL-10	JES5-16E3	JES5-2A5
Maus IFN-γ	AN-18	R4-6A2

2.1.6. Mikrobeads

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Mikrobeads

Marker	Herkunft
CD146 (LSEC)	Maus, MACS von Miltenyibiotec, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ CD62L ⁺	„T Cell Isolation Kit“, Maus, MACS von Miltenyibiotec
CD8a ⁺ (RaM)	„T Cell Isolation Kit“, Maus, MACS von Miltenyibiotec

2.1.7. Versuchstiere

Die Zucht und Haltung der Mäuse unterlag spezifisch pathogenfreien Bedingungen. Für alle beschriebenen Experimente wurden mindestens acht Wochen alte, männliche oder weibliche Tiere der in nachfolgenden Tabelle aufgeführten Mausstämme verwendet.

Tabelle 2.8: Übersicht der Versuchstiere

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
C57Bl/6	Wildtyp (H-2 ^b)	BfR, Berlin
TF-OVA	Transgene Expression von membrangebundenem OVA ₁₃₉₋₃₈₅ unter TF-Promotor	Eigene Zucht (FEM), Berlin
DTR-BI.6×TF-OVA	Transgene Expression des Fusionsprotein eGFP / humaner Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter CD11c	
Rag1 ^{-/-} OT-I	Defizienz im RAG1 Gen, transgener TZR Vα2/Vβ5 spezifisch für OVA ₃₂₃₋₃₃₉ im Kontext von H-2 ^b	
OT-II (Barnden et al., 1998)	Transgener TZR spezifisch für OVA ₃₂₃₋₃₃₉ im Kontext von H-2 ^b	BfR, Berlin

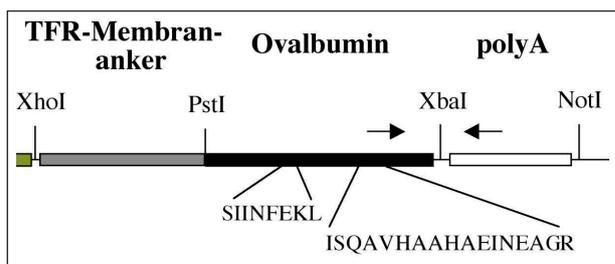


Abbildung 2.1: Schema des DNA-Konstrukts des TF-OVA-Stammes. Unter der Kontrolle des Transferrinrezeptor-Promotors kodiert der Genabschnitt für das Protein des Transferrinrezeptors und des Modellantigens Ovalbumin (OVA₁₃₉₋₃₈₅). Nach der Translation ist das transgene Protein durch die transmembrane Domäne in der Zellmembran der Hepatozyten fixiert mit zellspezifischer Expression [101].

2.2. Methoden

2.2.1. Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Mausstämme

2.2.1.1. Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung (Vermehrung) eines bestimmten Nukleinsäurebereiches. Um die Expression des Transgens in den TF-OVA-Mäusen und den DTR-BI.6×TF-OVA-Mäusen nachzuweisen, musste eine proteolytische Spaltung der Gewebeproteine aus den Biopsien der Schwanzspitzen erfolgen, damit die DNS für die anschließende PCR freigesetzt wird. Jede Probe wurde dafür in 200 µl Willie-Puffer mit 0,4 mg/ml Proteinase-K bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Für die Hitzeinaktivierung des Enzyms war es nach zwei Stunden erforderlich, die Proben 5 Minuten lang auf 95°C zu erwärmen. Daraufhin wurden die Proben 1:5 mit ddH₂O aufgefüllt.

Der Ansatz für die Polymerase-Kettenreaktion bestand aus einem Aliquot der lysierten Gewebebiopsie, jeweils 10 µM der Primer OVA-up und OVA-down sowie dem Platinum® PCR SuperMix. Für jede zu untersuchende Probe wurde je ein Ansatz von 25 µl hergestellt. Die Programme zur Vervielfältigung der DNS sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Programme für die PCR der verschiedenen Mausstämme

PCR-Zyklusphasen	TF-OVA			DTR-BI.6×TF-OVA		
	Zyklen	Temp.	Zeit pro Zyklus	Zyklen	Temp.	Zeit pro Zyklus
Initiale Denaturierung		94°C	2 Min.		95°C	10 Min.
Denaturierungsphase	30	94°C	30 Sek.	35	94°C	30 Sek.
Primeranlagerung		55°C	30 Sek.		62°C	30 Sek.
Elongation		72°C	1 Min.		72°C	45 Sek.
Finale Elongation		72°C	10 Min.		72°C	2 Min.
Kühlung		4°C			4°C	

2.2.1.2. Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung der amplifizierten DNS wurde 1,5 %iges Agarosegel und Ethidiumbromid (10 mg/ml) verwendet. Das Gel wurde mit 17 µl jeder Probe und den jeweiligen DNS-Kontrollen beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt in 1×TAE als Laufpuffer. Im Anschluss fand die Fotodokumentation der sichtbaren DNS-Banden unter UV-Licht im Transilluminator statt.

2.2.1.3. Phänotypanalyse in peripheren Blutproben

Die Testung der Genexpression konnte bei den transgenen Mausstämmen Rag1^{-/-} OT-I und OT-II sowie DTR-BI.6×TF-OVA indirekt über den Nachweis der Oberflächenproteine auf peripheren Blutzellen erfolgen. Hierfür wurden die Vollblutproben der Mäuse zunächst 5 Minuten lang mit 3200 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand mit dem Plasma wurde verworfen und die Zellpellets zweimalig für je 5 Minuten mit Erythrozytenlyse-Puffer inkubiert und danach gewaschen. Anschließend fand in einem 50 µl Puffervolumen die Reaktion der Fluoreszenz-markierten Antikörper mit den Zellen statt, gefolgt von einem abschließenden Waschschrift oder der Reaktion von Sekundärantikörpern bei Verwendung von biotinylierten Primärantikörpern. Je nach Mausstamm wurden dafür Antikörper gegen die Zellmarker CD4, CD8 und Vα2 verwendet. Bei den Rag-Mäusen wurde zusätzlich gegen CD19 gefärbt. Bei den DTR-BI.6×TF-OVA-Mäusen war aufgrund des eGFP („enhanced green fluorescent protein“) keine Färbung nötig. Der Nachweis des Transgens OVA wurde mittels PCR vorgenommen (siehe Kapitel 2.2.1.1.). Die durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD8 bzw. CD4 sowie des spezifischen Vα2⁺ T-Zellrezeptors und die Expression des DTR-eGFP-Gens auf den Prä-DC erfolgte in 400 µl MACS-Puffer am BD FACS Calibur™ (siehe Kapitel 2.2.3.1.).

2.2.2. Zellisolationmethoden

2.2.2.1. Isolation von nicht-parenchymalen Zellen aus der Leber

Für die vorliegende Arbeit sollten reine Populationen von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) der Leber mit antigenspezifischen T-Zellen in Kokulturen getestet werden. Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Arbeitsschritte unter Verwendung von auf 4°C gekühlten Geräten durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten unter Lichtabschluss mit Eiskühlung.

Es wurde bei den Tieren nach zervikaler Dislokation und Kehlschnitt eine Befeuchtung des Fells mit Ethanol und die Eröffnung des Peritonealraums vorgenommen. In einigen Experimenten wurden zusätzlich zu den Leberzellen auch Milzzellen untersucht. Um eine enzymatische Schädigung der Milzzellen während der Leberperfusion zu verhindern, wurde die Milz zuvor stumpf entfernt und in PBS/FCS aufbewahrt. Danach wurde die V. portae mit einer 25“-Kanüle punktiert und darüber die Leber manuell mit 10ml vorgewärmten, 0,05%igem Collagenase-IV-Mediumansatz aus einer Spritze gespült.

Die Gallenblase wurde abgesetzt und die einzelnen, exstirpierten Leberorgane mehrerer Mäuse mechanisch zerteilt und jeweils in ein 50ml Gefäß gegeben, welches je 10 ml des Collagenase-IV-Mediumansatzes enthielt. Hierin erfolgte innerhalb von 20 Minuten die hydrolytische Spaltung der Gewebepeptide durch die Collagenase-IV im Schüttler mit 190 rpm bei 37°C. Anschließend wurde die milchige Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, mit 30 ml PBS/FCS gespült und mit Hilfe eines Spritzenstempels vereinzelt.

Danach erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 300 rpm (Megafuge 1.0), um die großen, parenchymalen Hepatozyten aus dem Zellgemisch abzutrennen. Die nicht-parenchymalen Zellen (NPZ) verblieben im Überstand und wurden mittels Pipette in ein neues 50ml Gefäß gegeben und zentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm Rotina). Der dann entstandene Überstand wurde verworfen. Die Erythrozyten wurden im gelösten Zellpellet anschließend durch die Inkubation mit 800 µl Erythrozytenlyse-Puffer 5 Minuten lang lysiert. Durch Waschen mit 40 ml PBS/FCS wurden die Erythrozytenfragmente schließlich entfernt. Hiernach erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation: 5 ml einer 42 %igen Percoll-Lösung wurden in einem 15 ml Gefäß mit dem Zellpellet vermengt und 20 Minuten lang mit 2000 rpm bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert (Labofuge 400R). Percoll ist ein synthetisches Polymer, welches in der verwendeten 42 %igen Lösung eine geringere Dichte als die mittlere Dichte der nicht-parenchymalen Zielzellen aufweist. Während der Zentrifugation wandern alle Bestandteile der Zellsuspension durch ihre Sedimentationsgeschwindigkeit in der Percoll-Lösung und sammeln sich in unterschiedlichen Dichtephase. Die obere Phase enthält dann Zellfragmente sowie Fettzellen und die intermediäre Phase entspricht der nahezu zellfreien Percoll-Lösung. Diese beiden Phasen wurden mit Hilfe einer Pipette entfernt. Die Unterphase mit den Zielzellen wurde in 10 ml PBS/FCS resuspendiert und zentrifugiert, um Reste des synthetischen Polymers zu entfernen. Danach erfolgte entweder eine erneute Erythrozytenlyse oder direkt die Zählung der Zellen in einem kalkulierten Puffervolumen (siehe Kapitel 2.2.2.5. Bestimmung von Zellzahlen). Für die weitere Aufreinigung schlossen sich MACS (siehe Kapitel 2.2.2.4.) und FACS (siehe Kapitel 2.2.3.2.) an.

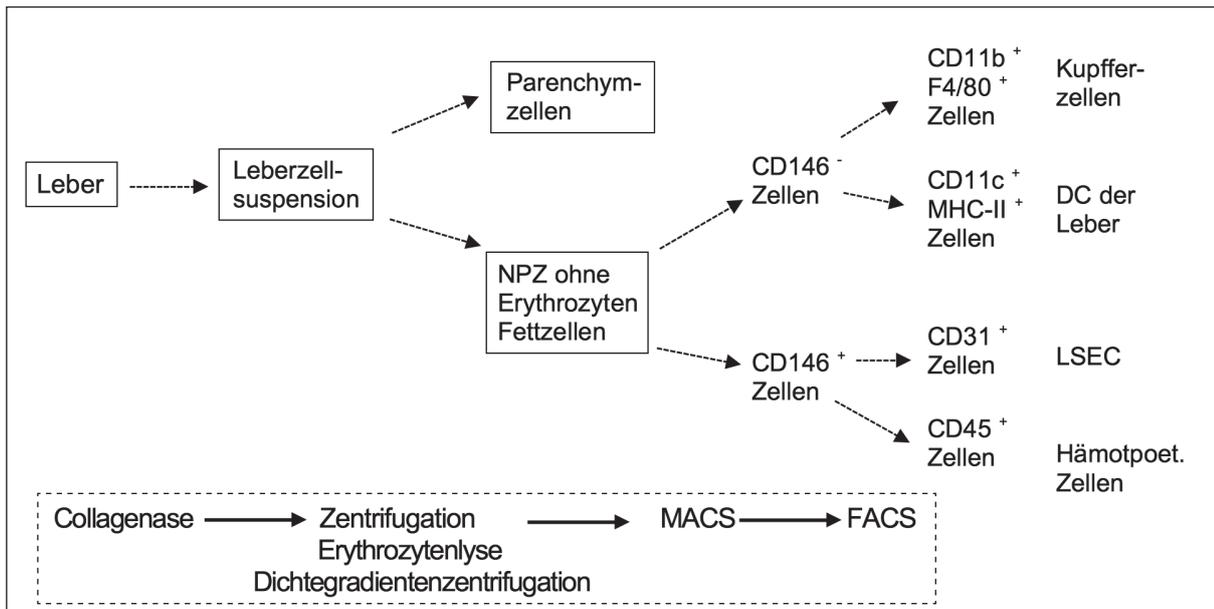


Abbildung 2.2: Isolationsschema für Antigen-präsentierende Zellen der Leber. Aus mehreren Leberorganen wurden durch mechanische und enzymatische Zerkleinerung Zellsuspensionen gewonnen. Nach verschiedenen Zentrifugationen konnten durch Verwendung von MACS und FACS die gewünschten Zellpopulationen (LSEC, KC und DC) von einander unterschieden und isoliert werden. CD („Cluster of Differentiation“), KC (Kupferzellen), MHC („major histocompatibility complex“), DC (Dendritische Zellen), NPZ (nicht-parenchymale Zellen), LSEC (sinusoidale Leberendothelzellen), MACS („magnetic cell separation“), FACS („fluorescence activated cell sorting“).

2.2.2.2. Isolation von nicht-parenchymalen Zellen aus der Milz

Die Milz wurde nach der stumpfen Entfernung über ein 70 µm Zellsieb in 40 ml PBS/FCS gelöst und mit 1500 rpm für 5 Minuten lang zentrifugiert (Rotina), um fragmentierte Zellen zu separieren. Das gelöste Zellpellet wurde mit ein- oder zweimaliger Lyse (800 µl Erythrozytenlyse-Puffer) von Erythrozyten befreit, erneut gesiebt, zentrifugiert und abschließend die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.5.). Für die weitere Aufreinigung wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert (CD11c sowie MHC-II) und der FACS (siehe Kapitel 2.2.3.2.) zugeführt.

2.2.2.3. Isolation von OVA-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen

Die Mäuse des Stammes Rag1^{-/-} OT-I respektive OT-II verfügen über transgene TZR, die jeweils CD8⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺ T-Zellen hervorbringen mit der Antigen-spezifität für Epitope des Ovalbumin. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation und Kehlschnitt getötet. Die größtmögliche Ausbeute an spezifischen T-Zellen wurde durch die Entnahme möglichst vieler Lymphknoten und der Milz erreicht. Über einen kutanen Medianschnitt von iliakal bis submandibulär erfolgte der Zugang zu den bilateralen inguinalen und superfacialen zervikalen Lymphknoten, die mittels Feinpinzetten stumpf resiziert wurden. In direkter Nähe zur V. brachialis konnten die Nodi lymphaticus brachialis sinister und dexter, im axillären Fettdepot die entsprechenden Lymphknoten frei präpariert und exstirpiert werden. Die anschließende Eröffnung des

Peritonealraums ermöglichte den Zugang zur Milz, zu dem hepatischen und den bilateralen iliakalen Lymphknoten sowie zu den mesenterialen Lymphknoten.

Wie in Kapitel 1.5.3. beschrieben, ist für die Immunantwort von CD4⁺ T-Zellen stets Voraussetzung, dass das Antigen im Komplex mit MHC-II auf einer APZ dargeboten wird. Eine Selbstpräsentation wie zwischen CD8⁺ T-Zellen ist nicht möglich [102]. Um grundsätzlich die Funktion der OT-II CD4⁺ T-Zellen *in vitro* zu prüfen, wurden Milzzellen aus Rag1^{-/-} OT-I-Mäusen als antigenunspezifische Zellen genutzt. Aus diesem Grund war bei den OT-II-Mäusen eine getrennte Aufarbeitung von Lymphknoten- und Milzzellen notwendig. Bei Rag1^{-/-} OT-I-Mäusen konnten Lymphknoten und Milz zusammengeführt werden. Zunächst erfolgte eine mechanische Zerkleinerung mit Hilfe eines Spritzenstempels über ein 70 µm Zellsieb mit 40 ml PBS/ FCS in ein 50 ml Gefäß. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1000 µl des Erythrozytenlyse-Puffers 5 Minuten lang inkubiert. Milzzellen neigen verstärkt zur Verklumpung. Um dies zu verhindern, war es erforderlich die Suspension ein weiteres Mal über das Zellsieb in ein neues 50ml Gefäß zu geben und dabei spülend mit 40 ml PBS/FCS aufzufüllen. Nach wiederholter Zentrifugation erfolgte in 20–40 ml Puffer die Zellzählung wie in Kapitel 2.2.2.5. beschrieben. Bei den OT-II-Tieren wurde ein kalkuliertes Aliquot der Milzzellen zur Gewinnung von APZ separiert. Die Zellen dieses Aliquots wurden subletal 10 Minuten lang mit 2,76 Gy/Minute bestrahlt, um eine störende Proliferation in der Positivkontrolle der OT-II CD4⁺ T-Zellen zu verhindern. Die restlichen Milzzellen wurden mit den Lymphknotenzellen vermischt, um daraus OT-II CD4⁺ T-Zellen aufzureinigen. Das erfolgte anschließend mittels MACS (siehe Kapitel 2.2.2.4.).

2.2.2.4. Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (MACS) ist ein Verfahren zur direkten oder indirekten Isolation von Zellen aus Zellgemischen. Eine gewünschte Zellpopulation wird anhand eines charakteristischen Oberflächenmarkers mit Antikörpern markiert. An diese binden Sekundärantikörper, welche mit magnetischen Mikropartikeln (Beads) gekoppelt sind. Alternativ werden Antikörper verwendet, die direkt an Beads gekoppelt sind. Das Zellgemisch wird auf eine Säule gegeben, die mit kleinen ferromagnetischen Kugeln gefüllt ist. Diese Säule befindet sich im Kraftfeld eines angelegten Magneten. Aufgrund der magnetischen Anziehung haften die Zellen an der Säule, die mit den Antikörpern und magnetischen Mikropartikeln markiert sind. Außerhalb des magnetischen Feldes können sie durch komprimierte Pufferspülung eluiert werden und repräsentieren die Positivfraktion (direkte Separation). Bei der indirekten oder negativen Selektion werden die Zielzellen in einem Gefäß unter der Säule aufgefangen und die zu entfernenden Zellen haften magnetisch an der Säule. Dafür existieren vorgefertigte „Kits“ mit einer Vielzahl von Antikörpern, die gegen verschiedene Oberflächenmarker der zu entfernenden Zellen gerichtet sind.

Für die Isolation der APZ der Leber erfolgte mittels MACS eine Positivselektion der LSEC anhand ihrer Expression von CD146 (siehe Abbildung 2.2). Entsprechend des Herstellerproto-

kolls wurden 90 µl MACS-Puffer und 10 µl der CD146-Beads mit je 1×10^7 Zellen für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in MACS-Puffer mit 1500 rpm zentrifugiert (Rotina), das Pellet in 700 µl gelöst und über eine MACS-LS-Säule aufgetrennt. Die Positivfraktion wurde anschließend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert, um die Reinheit der LSEC mittels FACS weiter zu erhöhen. Aus der unter der Säule aufgefangenen Negativfraktion wurden später KC und DC ebenfalls mittels FACS isoliert (siehe Abbildung 2.2). Dafür wurde dieses Zellgemisch ebenfalls mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert (siehe Kapitel 2.2.3.3.).

Die Separation der $V\alpha 2^+$ T-Zellen aus Rag1^{-/-} OT-I- und OT-II-Mäusen erfolgte als Negativselektion („non-touch“-Technik) mit Hilfe der jeweiligen T-Zell-Isolationskits nach Angaben des Herstellerprotokolls. Nach der Zellzählung und anschließenden Zentrifugation wurde das Zellpellet in 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Antikörper-Biotin-Mix für je 1×10^7 Zellen resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden diesem Ansatz weitere 20 µl MACS-Puffer sowie 10 µl Microbeads je 1×10^7 Zellen zugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Um ungebundene Antikörper und Beads zu eliminieren, wurden die Proben in 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Die Zellpellets wurden jeweils in 700 µl MACS-Puffer aufgenommen, auf die MACS-Säulen gegeben und viermal mit je 3 ml Pufferlösung gespült.

Bei den CD4⁺ T-Zellen schloss sich eine weitere Selektion durch die MACS anhand der Expression von CD62L an. Dieser Oberflächenmarker findet sich auf naiven T-Zellen. Im Anschluss an MACS wurden die Zellzahlen ermittelt. Die Reinheit und Naivität der antigenspezifischen T-Zellen wurde durch Anfärbung mit Antikörpern und mittels Durchflusszytometrie gesichert (siehe Kapitel 2.2.3.1.).

2.2.2.5. Bestimmung der Zellzahl

Für jede Bestimmung von Zellzahlen wurden die Zellen in einem kalkulierten Volumen gelöst und 10 µl der Zellsuspension in einer 1:10 Verdünnung mit 0,4 % Trypanblau gemischt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der gebunden an Proteine die Zellmembran von toten Zellen durchdringt und sie damit farblich im Lichtmikroskop von vitalen Zellen unterscheidbar macht. Von der gefärbten Zellprobe wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und lichtmikroskopisch die vitalen (ungefärbten) Zellen in den vier Kammerquadranten gezählt. Die absolute Zahl der Gesamtzellen ließ sich durch folgende Formel ermitteln:

$$\text{Zahl} / 4 \times \text{VF} \times \text{KK} \times \text{Volumen} = \text{Gesamtzellzahl.}$$

Wobei die Kammerkonstante (KK) aus der Fläche und Tiefe der Zählkammer resultiert und mit 10^4 feststehend ist. VF stellt den Verdünnungsfaktor dar.

2.2.3. Durchflusszytometrie und Zellfärbungen

2.2.3.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, dass die Differenzierung und Analyse von Einzelzellen auf Grundlage der Anregung und Emission von Fluoreszenzfarbstoffen durch Laserlicht ermöglicht. Detektierte Zellen, dargestellt mit Hilfe spezifischer Computersoftware,

lassen sich bereits ohne Fluoreszenz aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Granularität durch verschiedene Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichts charakterisieren. Sind fluoreszierende Gruppen an Antikörper gekoppelt, lässt sich durch deren spezifische Bindung an intrazelluläre oder oberflächliche Antigenstrukturen eine Vielzahl gewünschter Zelleigenschaften zusätzlich quantitativ bestimmen. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurde für die vorliegende Arbeit das BD FACS Calibur™ verwendet. Es ermöglicht die Analyse von Zellgröße und -granularität sowie von vier Fluoreszenzparametern. Für die Messung war es je nach Zellmenge erforderlich, das Pellet nach dem letzten Waschschrift in 200–400 µl MACS-Puffer in PBS/EDTA zu lösen.

2.2.3.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Da die Zelldifferenzierung via Fluoreszenz-markierter Antikörper genutzt werden kann, um eine oder mehrere Populationen aus einem Zellgemisch zu isolieren, ermöglicht dieses Verfahren deren höchstmögliche Aufreinigung. Dafür werden die Einzelzellen in Tropfenform elektrisch geladen in einem elektrischen Feld mit Hilfe von geladenen Ablenkplatten in separate Auffanggefäße dirigiert. Diese Zellsortierung erfolgte mit den Geräten BD FACS Aria™ I und II durch die Abteilung „Flow Cytometry“ des DRFZ Berlin.

Zur Differenzierung verschiedener Potentiale zur Antigenpräsentation isolierten wir eine Subpopulation von DC, die sich durch eine starke Expression von MHC-II-Molekülen (MHC-II^{high}) auszeichnet. Dazu wurden DC aus Mäusen (DTR-BI.6×TF-OVA) isoliert, bei denen das Markermolekül GFP transgen mit dem CD11c Molekül gekoppelt ist. Aus diesem Tierstamm können daher reife DC mittels FACS durch die Selektion von GFP-positiven Zellen isoliert werden.

2.2.3.3. Oberflächenfärbungen

Für die Analyse mit der Durchflusszytometrie oder für die FACS wurden ausgewählte Oberflächenantigene der APZ und der T-Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Um eine unspezifische Bindung zu verhindern, wurden die Zellen zunächst mit einem den Fcγ-Rezeptor blockierenden Antikörper (Fcγ (CD16/32), Klon 93, BioLegend, San Diego, USA, Einsatz 1:100) inkubiert. Anschließend wurden je 1×10^6 Zellen mit je 100 µl PBS/BSA und den entsprechenden Antikörpern für 15 Minuten inkubiert.

Die konkreten Konzentrationen der Antikörper und des CFSE (Kapitel 2.2.3.4.) wurden in Vorversuchen mit verschiedenen Titrationen ermittelt (siehe Tabelle 2.5). Bei Einsatz eines direkt mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers konnten nach einem Waschschrift die Zellen direkt gemessen bzw. sortiert werden. Bei der Verwendung eines biotinylierten Primärantikörpers folgte nach dem Waschen ein zweiter Inkubationsschritt mit einem an Streptavidin gekoppelten Fluorochrom. Erfolgte eine spätere Analyse, wurden die Zellen mit 0,5%igen PFA in PBS fixiert.

Für die Zellsortierung wurden die NPZ der Leber nach der Selektion mittels MACS mit

Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen jeweils für die Zellpopulation spezifischen Oberflächenmarkern gefärbt (siehe Abbildung 2.2). In der CD146-negativen Fraktion wurden DC der Leber und KC isoliert. Letztere ließen sich durch ihre Expression von CD11b (PE) und F4/80 (APC) differenzieren. DC der Leber und der Milz konnten anhand von CD11c (PE oder V405) und MHC-II (Biotin mit SA-APC oder mit APC-Cy7) erkannt werden (doppelt positive Merkmalsausprägung und MHC-II^{med./high}). Demgegenüber wurden die CD146⁺ Zellen nach Anfärbung mit einem PE-markierten Antikörper gegen CD31 weiter aufgereinigt. Durch die zusätzliche Anfärbung von CD45 konnten die autofluoreszierenden LSEC sicher von hämatopoetischen Zellen differenziert werden.

2.2.3.4. Intrazelluläre Färbung: Carboxyfluoreszein-(diacetat-) Succinimidyl Ester

Um eine mögliche Proliferation der inkubierten T-Zellen nach einer Antigenerkennung zu quantifizieren, wurde vor der Inkubation eine Färbung dieser Zellen mit Carboxyfluoreszein-(diacetat-)succinimidyl-ester (CFDA-SE) durchgeführt. Der Ester ist für Zellmembranen hochpermeabel. Intrazellulär wird er nach Spaltung durch zytoplasmatische Esterasen zum fluoreszierenden CFSE. Er ist kovalent an zelleigene, zytoplasmatische Moleküle gebunden und wird mit diesen bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Damit kann CFSE langfristig und nach Zellteilungen mit abnehmender Intensität durchflusszytometrisch untersucht werden. Dies ermöglicht die Analysen von Tochterzellgenerationen.

Für die *in vitro* Untersuchungen bewährte sich eine Verdünnung 1:3000 des 15 mM CFDA-SE in RPMI für je 1×10^7 T-Zellen. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Färbereaktion durch die Zugabe von 20ml RPMI mit 5% FCS gestoppt. Die Zellen wurden gewaschen (5 Minuten mit 1500 rpm, Rotina). Abschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Methode und die Lösung der T-Zellen im kalkulierten Volumen des Kulturmediums, um nachfolgend genau 1×10^5 T-Zellen in 200 μ l pro Kulturansatz auszuplattieren.

2.2.3.5. Reinheitskontrollen

Vor Einbringung in die Kultur wurde die Reinheit jeder Population von APZ und die der T-Zellen überprüft. Dafür wurde ein Aliquot jeder Zellsuspension mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen spezifische Oberflächenantigene der selektierten Population gerichtet sind. Zusätzlich erfolgte die Anfärbung charakteristischer Oberflächenantigene anderer Zelltypen zur Überprüfung möglicher Kontaminationen (siehe Kapitel 3.2.).

Ein Aliquot der T-Zellen wurde in Bezug auf Zellreinheit und eine mögliche Voraktivierung am Durchflusszytometer untersucht. Im Mittel waren von den aufgereinigten OT-I CD8⁺ T-Zellen 97,7% positiv für den spezifischen Antigenrezeptor Va2 und 1,6% CD69⁺ sowie 5,3% CD44^{low}. Von den isolierten OT-II CD4⁺ T-Zellen exprimierten im Durchschnitt 86,1% den Antigenrezeptor Va2 und 87,2% waren CD4⁺ CD62L⁺. Eine Expression des Aktivierungsmarkers CD69 zeigten 0,4% und eine Expression von CD44^{low} zeigten 1,8% der CD4⁺ T-Zellen.

2.2.4. Zellkulturen

2.2.4.1. Allgemeine Bedingungen

In den Vorversuchen wurden verschiedene Konzentrationen von APZ mit T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander sowie verschiedene Kulturmedien und Kulturplatten getestet. Unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen fanden sich die meisten vitalen und reagiblen Zellen unter Verwendung von Mikrotiterplatten mit Flachböden und in RPMI als Kulturmedium (Tabelle 2.3). Sämtliche Arbeitsschritte mit den Zellkulturen erfolgten an der Sterilbank. Nach den Zellisolationsverfahren mit MACS und FACS wurden die Zellen zweimalig mit 15ml des Antibiotika enthaltenen Kulturmediums gewaschen (je 10 Minuten mit 1500 rpm, Rotina). Die anschließende Zellzählung war Grundlage für die korrekte Ausplattierung der präferierten Zellkonzentrationen von $2,5 \times 10^4$ bis 2×10^5 APZ pro Ansatz.

2.2.4.2. Kulturschema



2.2.4.3. Inkubation Tag -1

Für die Proliferationsexperimente wurden die isolierten APZ der Leber und DC der Milz zunächst als Monokulturen in je 200 μ l des Kulturmediums als Duplikat oder Triplikat in eine 96-Loch-Platte mit Flachböden eingebracht. Einzelne Zellproben jeder Population wurden zusätzlich mit Ovalbuminprotein (100 mg/ml Medium) inkubiert. So konnte zeitgleich die Erkennung eines Antigenes mit endogenem Ursprung gegenüber der Erkennung eines Antigenes eines zusätzlichen phagozytierten, exogenen Proteins durch die spezifischen T-Zellen untersucht werden (Tabelle 3.2).

2.2.4.4. Inkubation Tag 0

Nach einer Zeitspanne von 22 Stunden, welche der Adhärenz der NPZ diene, wurde die Kulturplatte hinsichtlich des Mediums makroskopisch und der Zellstatus mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde das Kulturmedium abpipettiert und die Zellen wurden mit auf 37°C erwärmten, frischen Kulturmedium vorsichtig gewaschen. Dadurch konnten tote, nicht adhärenente Zellen und in den jeweiligen Proben ggf. nicht phagozytiertes Ovalbuminprotein entfernt werden. Die isolierten und mit CFSE gefärbten OT-I CD8⁺ T-Zellen bzw. OT-II CD4⁺ T-Zellen wurden mit den drei unterschiedlichen APZ kokultiviert. Dafür wurde das Pellet der T-Zellen nach dem letzten Zentrifugationsschritt in einem kalkulierten Volumen des Kulturmediums gelöst. Berechnet anhand der Gesamtzahl konnten die T-Zellen dann direkt und in konstanter Konzentration von 1×10^5 in 200 μ l Medium ausplattiert werden.

2.2.4.5. Ernte Tag 3

Auf der Grundlage der Vorversuche mit Proliferationsanalysen am ersten bis siebten Tag nach der Kokultivierung, wurde Tag drei nach der T-Zellinkubation als Zeitpunkt für die Messungen präferiert (Abbildung 3.1). Mittels Lichtmikroskops wurden zunächst am Tag drei die Zellgröße, -verteilung und eventuelle Proliferationsherde beurteilt (Abbildung 3.4). Hiernach erfolgte eine Zentrifugation der 96-Loch-Platte für 10 Minuten mit 1200 rpm (Centrifuge 5810R), um anschließend 180 µl des Überstandes aus jeder Probe in eine separate Kulturplatte zu überführen. Diese Überstände wurden für die Zytokinanalyse bis zur Messung mittels ELISA bei -80°C aufbewahrt.

Anschließend wurden die T-Zellen aus den Kulturplatten durch zweimaliges Spülen mit je 200 µl des Mediums in FACS-Röhrchen überführt. Mit jeweils 1 ml PBS/FCS wurden die Proben zentrifugiert (5 Minuten mit 1500 rpm, Rotina) und tote Zellen mit dem Überstand entfernt. Die T-Zellen wurden danach mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern (CD8 oder CD4 PerCP sowie CD69 PE und CD44 APC) inkubiert und abschließend gewaschen. Es schloss sich die Fixierung der Zellen durch Lösung des Pellets in 300 µl 0,5% PFA in PBS an. Bei initial 1×10^5 eingebrachten T-Zellen, wurden Ansätze mit weniger als 2×10^4 lebenden, spezifischen T-Zellen an Tag drei als negativ und damit ohne Proliferation definiert.

2.2.5. Enzym-gekoppelter Immun-Sorptions-Essay

Als bioanalytisches Verfahren erbringt der Enzym-gekoppelter Immun-Sorptions-Essay (ELISA) durch die Kombination von Antikörperreaktionen und enzymatischen Farbstoffreaktionen den qualitativen und quantitativen Nachweis von Antigenen. Die Farbintensitäten werden photometrisch gemessen und über die Werte einer Standardreihe berechnet. Für diese Arbeit wurden für die Konzentrationsbestimmungen von IFN-γ in den Überständen der Zellkulturen vorgefertigte Sets entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet (Tabelle 2.6). Zwischen jedem der folgenden Inkubationsschritte erfolgten mehrmalige Waschvorgänge mit PBS/Tween-Puffer.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit hoher Proteinaffinität wurde pro Vertiefung mit je 100 µl des gelösten „Erstantikörpers“ gegen IFN-γ als Antigen über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte am nächsten Tag zunächst die 1-stündige Inkubation mit einer Blockierlösung (200 µl/Loch), um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurden nach dem Waschen je Ansatz 100 µl der Standardreihe oder 100 µl der zu untersuchenden Proben für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte für eine weitere Stunde die Reaktion mit einem Biotin-konjugierten „Zweitantikörper“ (Detektionsantikörper), der spezifisch an ein anderes Epitop des zu bestimmenden Zytokins bindet. Daraufhin folgte die Zugabe von je 100 µl der Enzymlösung mit Avidin-HRP (Meerrettichperoxidase), welches an Biotin bindet. Nach weiteren 30 Minuten wurden je 100 µl der TMB-Lösung (Tetramethylbenzidin) zugegeben, welches das Substrat für HRP darstellt. Das Enzym führt zur Umsetzung des farblosen Substrats in ein gelbliches Reaktionsprodukt entsprechend der Zahl der Antigen-Antikörper-Bindungen und

damit entsprechend der Konzentration des untersuchten Zytokins. Die Überstände der Kokulturen und der Negativkontrollen wurden für den ELISA im Verhältnis 1:2 verdünnt und die der Positivkontrollen 1:100. Die Enzymreaktionen wurden nach 15 Minuten durch je 50 µl einer 1M H₃PO₄ Lösung gestoppt, die Proben bei 405 nm photometrisch gemessen und anhand der standardisierten Eichkurve und Verdünnungsfaktoren berechnet.

2.2.6. Graphische Darstellung und Statistik

2.2.6.1. Computer-Software

Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mit Hilfe der Software „CellQuestPro Version 5.2.“ aufgenommen und ausgewertet.

2.2.6.2. Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung der Ergebnisse und die statistische Auswertung wurde mit dem Programm „GraphPadPrism“ vorgenommen. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittels (SEM) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanzniveaus wurde der ungepaarte Students T-Test angewendet. Berechnete Unterschiede wurde als signifikant angenommen mit * = $p < 0,5$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

3. ERGEBNISSE

3.1. OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen werden *in vitro* unterschiedlich schnell aktiviert

Proliferation und effektive Aktivierung sind neben Anergie und Toleranz die möglichen Reaktionen einer T-Zelle, die auf die Erkennung eines spezifischen Antigens folgen können (siehe Kapitel 1.5.5. und 1.5.8.). Für die vorliegende Arbeit wurden in Zeitreihen zunächst die Proliferation sowie der Aktivierungsstatus der OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen unter den gegebenen Kulturbedingungen untersucht, um den Zeitpunkt für optimale Vergleiche auch zwischen den beiden T-Zellpopulationen zu eruieren. Wichtiges Ziel war hierbei, einen repräsentativen Aktivierungsmarker als Parameter für die Fragestellung zu ermitteln.

T-Zellen exprimieren im humanen und murinen System das Transmembranprotein CD69 (Leu-23) vorrangig im aktivierten Phänotyp. Nachdem ein Antigen-MHC-Komplex an einen spezifischen TZR gebunden hat, wird CD69 direkt durch die Proteinkinase-C induziert und ist als frühester Aktivierungsmarker detektierbar [119,120]. CD44 (Ly-24) erfüllt als Glykoprotein der äußeren Zellmembran u. a. auf T-Zellen verschiedene Funktionen bei der Zelladhäsion und -migration. Die Expression von CD44 ist bei naiven T-Zellen auf ein niedriges und in geringem Maße auf ein intermediäres Level beschränkt [121].

In diesem Mausmodell exprimierten den Oberflächenmarker CD69 nach 48-stündiger Inkubationsdauer durchschnittlich 37,3 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen und 5,1 % der OT-II CD4⁺ T-Zellen in den jeweiligen Positivkontrollen der Zeitreihen. Nach 72 Stunden waren im Mittel 6,0 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen und 8,3 % der OT-II CD4⁺ T-Zellen CD69⁺. Für die Positivkontrollen wurden OT-I CD8⁺ T-Zellen als Monokultur mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (SIINFEKL) inkubiert. Die OT-II CD4⁺ T-Zellen wurden für die Positivkontrolle zusammen mit 2×10^5 subletal bestrahlten Milzzellen kokultiviert (aus OT-II-Mäusen, siehe Kapitel 2.2.2.3.) und dem Ansatz wurde Ovalbuminprotein zugesetzt (siehe Kapitel 3.3. und Tabelle 3.2).

CD44 konnte als Aktivierungsmarker in diesen Ansätzen nach 48 Stunden auf durchschnittlich 57,3 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen und auf 6,5 % der OT-II CD4⁺ T-Zellen detektiert werden. Nach weiteren 24 Stunden (Tag drei) zeigte sich im Mittel eine Expression von CD44^{med./high} bei 85,0 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen und 56,3 % der OT-II CD4⁺ T-Zellen. Zu diesem Zeitpunkt war die Zahl der proliferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen maximal. Sie lag bei durchschnittlich 87,7 % der inkubierten Zellen in den Positivkontrollen der Zeitreihen. Die höchste Proliferation für die CD4⁺ T-Zellen wurde am fünften Tag ermittelt – hier waren durchschnittlich 92,5 % proliferiert.

Damit lässt sich erkennen, dass unter den gewählten Kulturbedingungen OT-I CD8⁺ T-Zellen das Maximum ihrer Proliferation zu einem früheren Zeitpunkt aufweisen als OT-II CD4⁺ T-Zellen. Es wird ferner gezeigt, dass bei beiden Populationen der Anstieg der Expression von

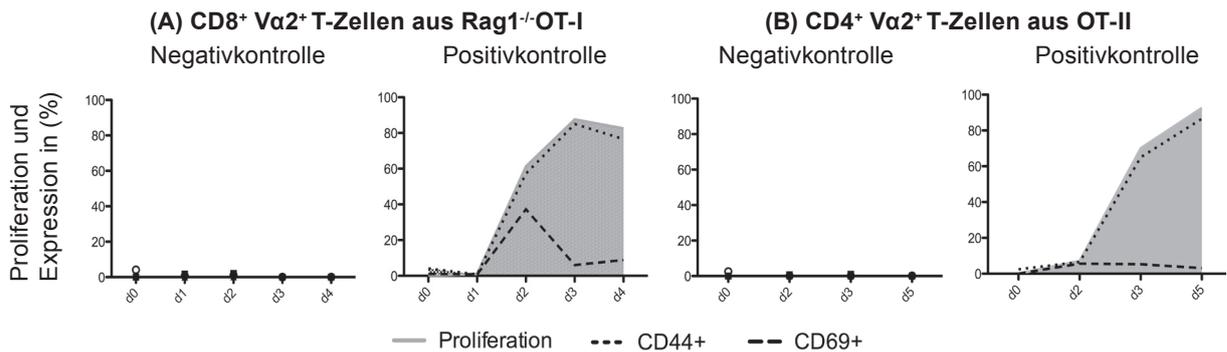


Abbildung 3.1: Zeitlicher Verlauf der *in vitro* T-Zellproliferation und Expression der Aktivierungsmarker. Jeweils 1×10^5 T-Zellen wurden inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte die Analyse des Proliferations- und Aktivierungsstatus mittels Durchflusszytometrie anhand der Intensität von CFSE und der Expression von CD44 und CD69. (A) Die Positivkontrolle der OT-I CD8⁺ T-Zellen (Zusatz von SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) zum Medium der Monokultur) zeigte an Tag drei das Maximum der Proliferation und der Expression von CD44. (B) Für die Positivkontrolle der OT-II CD4⁺ T-Zellen wurden diese zusammen mit subletal bestrahlten Milzzellen (2×10^5 je Ansatz) aus OT-II-Mäusen und mit Ovalbuminprotein inkubiert. Durch die Ergebnisse dieser Verlaufsprofile wurde Tag drei nach Einbringen der T-Zellen für die Auswertung präferiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate von jeweils mindestens zwei Durchführungen.

CD69 im Vergleich mit dem von CD44 vom Ausmaß her geringer und darüber hinaus früh wieder rückläufig ist. CD69 wurde relativ zu den OT-I CD8⁺ T-Zellen von weniger OT-II CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Der Aktivierungsmarker CD44 wurde zum jeweiligen Proliferationsmaximum von annähernd gleich vielen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen exprimiert: Genau von 85,0% der OT-I CD8⁺ T-Zellen (Tag drei) und 86,5% der OT-II CD4⁺ T-Zellen (Tag fünf).

Zudem ließ sich demonstrieren, dass das Expressionslevel von CD44^{med./high} in beiden T-Zellpopulationen quantitativ in etwa dem Ausmaß der Proliferation entsprach. Aus diesem Grund wurde dieser Marker als Parameter für den Aktivierungsstatus präferiert. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Populationen wurde einheitlich Tag drei ausgewählt. Der Verlauf der untersuchten Parameter ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

3.2. Isolation und Reinheit der Antigen-präsentierenden Zellen

3.2.1. Aufreinigung von sinusoidalen Leberendothelzellen mit MACS und FACS

Für diese Arbeit wurde die Reinheit der selektierten Zellpopulationen vor der Kultivierung mittels durchflusszytometrischer Analysen kontrolliert. Diese Kontrollen beinhalteten auch die Gegenprüfungen hinsichtlich eventuell verunreinigender Zellpopulationen.

Die Zelloberfläche der sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) ist durch eine hohe Dichte der Adhäsionsmoleküle CD31 und CD146 gekennzeichnet (Tabelle 3.1). Nach der direkten Selektion der CD146⁺ Zellen mittels MACS aus der Leberzellsuspension konnte ein Aufreinigungsgrad von mindestens 90% CD146⁺ Zellen erreicht werden. Anschließend wurden

die Zellen zusätzlich mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) im direkten Verfahren über die Expression von CD31 selektiert. Knochenmark-abhängige Zellen konnten dabei über die Anfärbung ihres obligatorisch exprimierten Oberflächenmoleküls CD45 differenziert und depletiert werden (siehe Kapitel 3.2.3.3.). Durch diesen Arbeitsschritt erhöhte sich die Reinheit der LSEC gemessen an der Expression von CD31 auf durchschnittlich 98,9%. Im Mittel exprimierten davon 2,0% MHC-II^{med./high}. Es lagen zudem keine relevanten Kontaminationen durch Kupferzellen (KC) oder Dendritische Zellen (DC) vor (jeweils <0,3%). Dies wurde am Durchflusszytometer über die Oberflächenmarker F4/80, CD11c und MHC-II in der CD31⁺ Fraktion ermittelt. Die durchflusszytometrischen Analysen der LSEC vor und nach der FACS sind beispielhaft in Abbildung 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.1: Oberflächenmarker der untersuchten Zellen. Erst in Folge einer Aktivierung exprimieren DC der Leber als reife Zellen hohe Level an MHC-II-Molekülen, CD80 und CD86. MHC („major histocompatibility complex“), L-DC (DC der Leber), M-DC (DC der Milz), KC (Kupferzellen), LSEC (sinusoidale Leberendothelzellen), M+M (Makrophagen und Monozyten), NK (Natürliche Killerzellen), TZ (T-Zellen), EZ (Endothelzellen), BZ (B-Zellen), ICAM („intercellular adhesion molecule“), CTLA („cytotoxic T-lymphocyte antigen“), VCAM (vascular cell adhesion molecule“), CSFR („colony stimulating factor receptor“), OVA (Ovalbumin), TZR (T-Zellrezeptor) [39,40,55,56].

Antigen	Funktion	Expression durch
MHC-I	Antigenpräsentation gegenüber CD8 ⁺ TZ	Alle kernhaltigen Zellen
MHC-II	Antigenpräsentation gegenüber CD4 ⁺ TZ	L-DC, M-DC, KC, fraglich LSEC
F4/ 80	(Ly-71) periphere Toleranz?	M+M, NK
CD4	Signaltransduktion über MHC-II-Moleküle	CD4 ⁺ TZ (DC, NK)
CD8	Signaltransduktion über MHC-I-Moleküle	CD8 ⁺ TZ, lymphoide DC
Va2	Bestandteil des OVA-spezifischen TZR	TZ mit Spezifität für OVA
CD11b	Adhäsion, Chemotaxis	M+M, NK, myeloide DC
CD11c	Adhäsion, Zellmigration	DC, NK, TZ, M+M
CD31	Zelladhäsion, Zellaktivierung	EZ, TZ, BZ, NK
CD40	kostimulatorisches Molekül bei TZ-Interaktion, Ligand für CD154	DC, KC, fraglich LSEC
CD44	Zelladhäsion, Aktivierungsmarker	TZ, BZ, NK, M+M
CD45 B220	Signaltransduktion in TZ und BZ	Hämatopet. Zellen, plasmazytoide DC
CD54	(ICAM-1) Zelladhäsion	LSEC, KC, DC
CD62L	Zelladhäsion, Aktivierungsmarker	TZ, BZ, NK, M+M
CD69	sehr frühe Zellaktivierung und Zelldifferenzierung	TZ, NK
CD80	(B7.1) kostimulatorisches Molekül bei Interaktion mit TZ, Ligand für CD28 und CTLA-4	KC, DC, fraglich LSEC
CD86	(B7.2) kostimulatorisches Molekül bei Interaktion mit TZ, Ligand für CD28 und CTLA-4	KC, DC, fraglich LSEC
CD106	(VCAM-1) Zelladhäsion	LSEC
CD115	(M-CSFR) Rezeptor für CSF-1	KC
CD146	(9F1) Zelladhäsion	LSEC

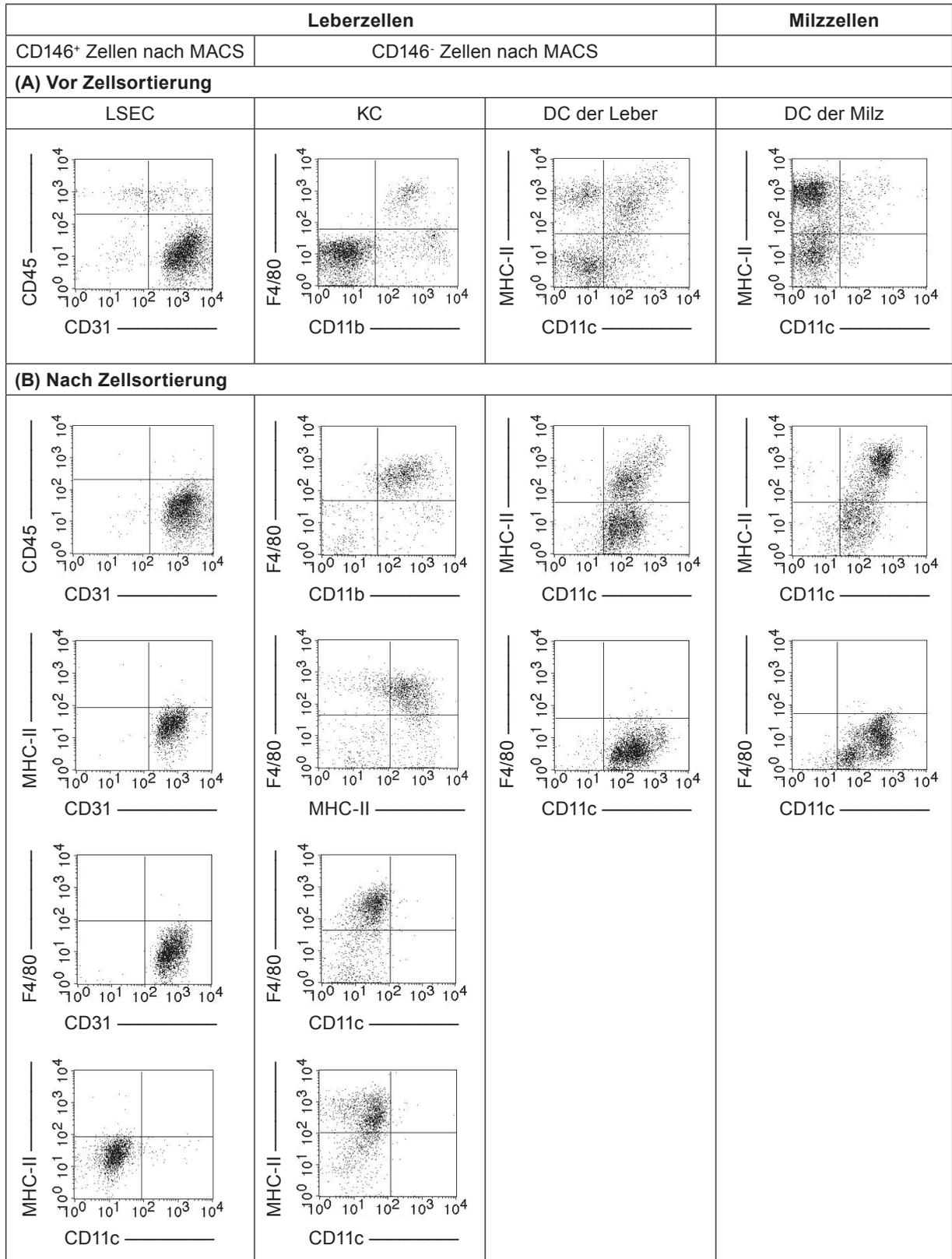


Abbildung 3.2: Isolation der Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) der Leber aus TF-OVA-Mäusen (Durchflusszytometrie). Die jeweils charakteristischen Oberflächenmarker der APZ wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. (A) Im Zellgemisch erfolgte vor der FACS die Analyse der Zellmarker von LSEC, KC und DC. (B) Im Anschluss an die FACS wurden die Zellmarker der APZ erneut analysiert und die einzelnen Populationen zusätzlich auf eventuell verunreinigende Zellen untersucht. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von vier bis acht Kontrollmessungen, eingeschlossen wurden alle vitalen Zellen.

3.2.2. Aufreinigung von Kupfferzellen aus der CD146⁻ Zellfraktion

Aus der Suspension CD146⁻ Zellen nach der MACS wurden KC mittels FACS über ihre Oberflächenmoleküle CD11b und F4/80 identifiziert (siehe Kapitel 2.2.3.3.). Ein geringer Teil von KC exprimiert auch CD11c, was die Differenzierung zu DC erschwert. Diese sind durch CD11c und MHC-II als charakteristische, aber nicht universelle Zellmarker gekennzeichnet. Durch die jeweils zeitgleiche Isolation von KC und DC aus der Fraktion der CD146⁻ Zellen, konnten KC und DC anhand der vier Zellmarker als distinkte Populationen sicher voneinander getrennt werden. Der Anteil von KC (doppelt positiv für CD11b und F4/80) im Gemisch der CD146⁻ Zellen betrug nach MACS durchschnittlich 9,5%. Die Kontrollmessungen nach der FACS zeigten im Durchschnitt einen Anteil 80,0% CD11b und F4/80 doppelt positiver Zellen. Im Mittel exprimierten 67,3% der F4/80⁺ Zellen MHC-II^{med/high} und 3,4% CD11c an ihrer Oberfläche. Es fanden sich durchschnittlich 2,1% und maximal 3,0% CD11c⁺ MHC-II⁺ Zellen als Kontamination in den Populationen der KC. Beispiele der durchflusszytometrischen Analysen von KC sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

3.2.3. Aufreinigung von Dendritischen Zellen der Leber aus der CD146⁻ Zellfraktion

Zur qualitativen Analyse von DC der Leber wurde die Suspension CD146⁻ Zellen nach der MACS sowie nach der FACS anhand der verschiedenen Zellmarker charakterisiert (siehe Kapitel 2.2.3.3.). Dabei betrug der Anteil CD11c⁺ und MHC-II⁺ Zellen vor der FACS durchschnittlich 11,7%. Die CD11c exprimierenden DC der Leber konnten im Mittel auf 95,0% angereichert werden. Von ihnen exprimierten durchschnittlich 42,4% hohe oder intermediäre Level von MHC-II. Bei den Kontrollmessungen waren maximal 3%, im Mittel 1,8% der Zellen positiv für F4/80, den Zellmarker von KC (Abbildung 3.2).

Es gilt als sicher, dass innerhalb der Fraktion von DC die reifen Zellen für eine effektive Aktivierung von T-Zellen verantwortlich sind. Die reifen DC sind gekennzeichnet durch eine Expression von MHC-II^{high} [122]. Um das Potential der MHC-II^{high} DC im transgenen Ovalbumin-Modell der AIH zu testen und mit dem der Gesamtpopulation zu vergleichen, wurden diese Zellen aus dem Lebergewebe des Mausstammes DTR-BI.6×TF-OVA separat isoliert. Durch die Expression von eGFP unter dem Promotor des CD11c konnten reife, MHC-II^{high} DC über ihre durch das Transgen vermittelte Fluoreszenz identifiziert und mittels FACS isoliert werden. Nach der Sortierung waren 95,0% der Zellen positiv für CD11c und MHC-II^{high} (Abbildung 3.3). Mit dieser hochspezifisch aufgereinigten Subpopulation von DC der Leber wurde ein Vergleich des Potentials zur Aktivierung von T-Zellen gegenüber dem Potential der Gesamtpopulation von DC der Leber ermöglicht.

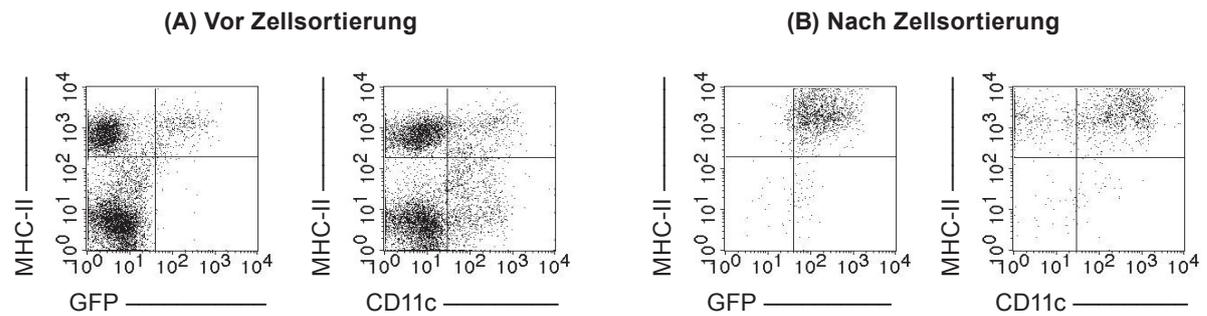


Abbildung 3.3: Isolation reifer DC aus DTR-BI.6xTF-OVA-Mäusen (Durchflusszytometrie). (A) Vor der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung erfolgte im Aliquot des Zellgemisches die Anfärbung der MHC-II^{high} Moleküle und zusätzlich von CD11c mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern. (B) Im Anschluss an die FACS wurden die Zellmarker der DC erneut analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse einer Analyse von insgesamt drei Kontrollmessungen, eingeschlossen wurden alle vitale Zellen.

3.2.4. Aufreinigung von Dendritischen Zellen der Milz als Vergleichspopulation

Das dendritische Zellkompartiment der Leber unterscheidet sich hinsichtlich seiner phänotypischen und immunmodulatorischen Eigenschaften von dem anderer Organe [87]. Um eine vergleichende Aussage über den Einfluss dieser organspezifischen Unterschiede auf die Aktivierung der T-Zellen treffen zu können, wurden für die vorliegende Arbeit zusätzlich DC der Milz isoliert.

Analog zu DC der Leber wurden DC der Milz durch die FACS anhand ihrer Oberflächenmarker CD11c und MHC-II identifiziert und ihr Aufreinigungsgrad auf durchschnittlich 90,0% erhöht. Die intermediäre und hohe Expression von MHC-II unterschied sich mit durchschnittlich 49,2% nicht signifikant von der Expression bei DC der Leber ($p=0,313$, T-Test). DC, die ausschließlich MHC-II^{high} exprimierten, waren in der Milz jedoch signifikant häufiger als in der Leber mit im Durchschnitt 37,4% gegenüber 16,1% (Abbildung 3.2 (B), $p=0,003$, T-Test).

Maximal 0,9% und im Durchschnitt 0,4% der sortierten Zellen aus der Milz waren positiv für den Makrophagenmarker F4/80. Beispiele der Analysen mittels FACS sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

3.3. Ausschluss unspezifischer Aktivierungen der T-Zellen

Für das TF-OVA-Modell ist bisher noch kein Nachweis einer spezifischen T-Zellaktivierung *in vitro* erfolgt. Um eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen unter den gegebenen Kulturbedingungen auszuschließen, wurden CD8⁺ T-Zellen aus C57Bl/6 isoliert. Die T-Zellen wurden mit CFSE markiert und zusammen mit APZ der Leber aus TF-OVA-Mäusen inkubiert. Analog erfolgte als weitere Kontrolle die Kultivierung von CD8⁺ T-Zellen aus Rag1^{-/-} OT-I-Mäusen zusammen mit LSEC, KC oder DC der Leber aus C57Bl/6-Tieren. Über die Fluoreszenzab-

nahme von CFSE bzw. die Expression von CD44 wurden die Proliferation bzw. die Aktivierung der T-Zellen mittels FACS analysiert.

Nach Auswertung entsprechender Vorversuche wurden alle Analysen 72 Stunden nach Einbringung der T-Zellen in die Kulturen durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.). Zu diesem Zeitpunkt wurden, wie in Kapitel 2.2.4.5. dargestellt, die T-Zellen mikroskopisch kontrolliert (Abbildung 3.4), anschließend gewaschen und nach Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern am Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurden zunächst alle lebenden T-Zellen in die Auswertung eingeschlossen. Anhand des intrazellulären Farbstoffs CFSE und der Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 konnte die Proliferation der T-Zellen in einem Diagramm sowie gegenüber den Aktivierungsmarkern dargestellt werden. T-Zellen, die ohne endogenes oder exogenes Antigen inkubiert wurden, stellen eine Negativkontrolle dar (entsprechend M1 im Histogramm von CFSE). Das endogene Antigen der APZ stammt in diesem TF-OVA-Modell von den durch Phagozytose aufgenommenen Hepatozyten bzw. deren Fragmenten, die das transgene Ovalbuminprotein enthalten. Als exogenes Antigen ist in diesen Untersuchungen das dem Kulturmedium als Kontrolle zugesetzte Ovalbuminpeptid oder -protein definiert.

Gegenüber den nicht proliferierten Zellen in M1 entspricht der Anteil der proliferierten T-Zellen aus allen Ansätzen dem Abschnitt M2 im Histogramm. Er repräsentiert in allen graphischen Darstellungen den Prozentsatz der proliferierten Zellen bemessen an allen lebenden $\text{V}\alpha 2^+$ T-Zellen. Es zeigte sich in diesen Spezifitätskontrollen im Durchschnitt eine unspezifische Proliferation von 4,3% der $\text{CD}8^+$ T-Zellen aus C57Bl/6 in den Ansätzen mit LSEC oder KC oder DC der Leber aus TF-OVA. Eine unspezifische Aktivierung der Immunzellen anhand der Expression von CD44 konnte nicht nachgewiesen werden.

Um die Aktivierbarkeit der $\text{CD}8^+$ T-Zellen aus den Mäusen der Stämme C57Bl/6 und $\text{Rag}1^{-/-}$ OT-I grundsätzlich zu überprüfen, wurde in den jeweiligen Monokulturen der $\text{CD}8^+$ T-Zellen dem Medium Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin (IM) zugegeben. Diese beiden Substanzen bewirken eine nicht-selektive, aber breite Stimulation der T-Zellen durch eine Genaktivierung. Die intrazellulären Signaltransduktionswege werden dabei durch einen Anstieg des zytosolischen Calciums beeinflusst. Bei PMA geschieht dies über die Bindung an die Proteinkinase-C und bei Ionomycin über die Erhöhung der Membranpermeabilität.

In diesen Proben konnte eine im Durchschnitt 97%ige Proliferation nachgewiesen werden und ein hoher Anteil der Immunzellen war $\text{CD}44^{\text{med/high}}$ (Abbildung 3.5 (A, B)). $\text{CD}8^+$ T-Zellen aus OT-I-Mäusen zeigten demgegenüber keine proliferative Reaktion nach der Inkubation mit LSEC, KC und DC der Leber aus Mäusen des Stammes C57Bl/6 (Abbildung 3.5 (B)). Das Peptid SIINFEKL stellt die immunogene Aminosäuresequenz des Ovalbumins dar, über welche die T-Zellen mit $\text{V}\alpha 2^+$ Rezeptor es als Antigen im Komplex mit MHC-I erkennen.

Die Ansätze der Monokulturen mit SIINFEKL ($\text{OVA}_{257-264}$) wiesen nach drei Tagen eine durchschnittliche Proliferation von 97,7% der $\text{CD}8^+$ T-Zellen auf und sie waren mit einer Expression von 89,2% $\text{CD}44^{\text{med./high}}$ stark aktiviert (Abbildung 3.5 (C)). Dieser Ansatz mit SIINFEKL

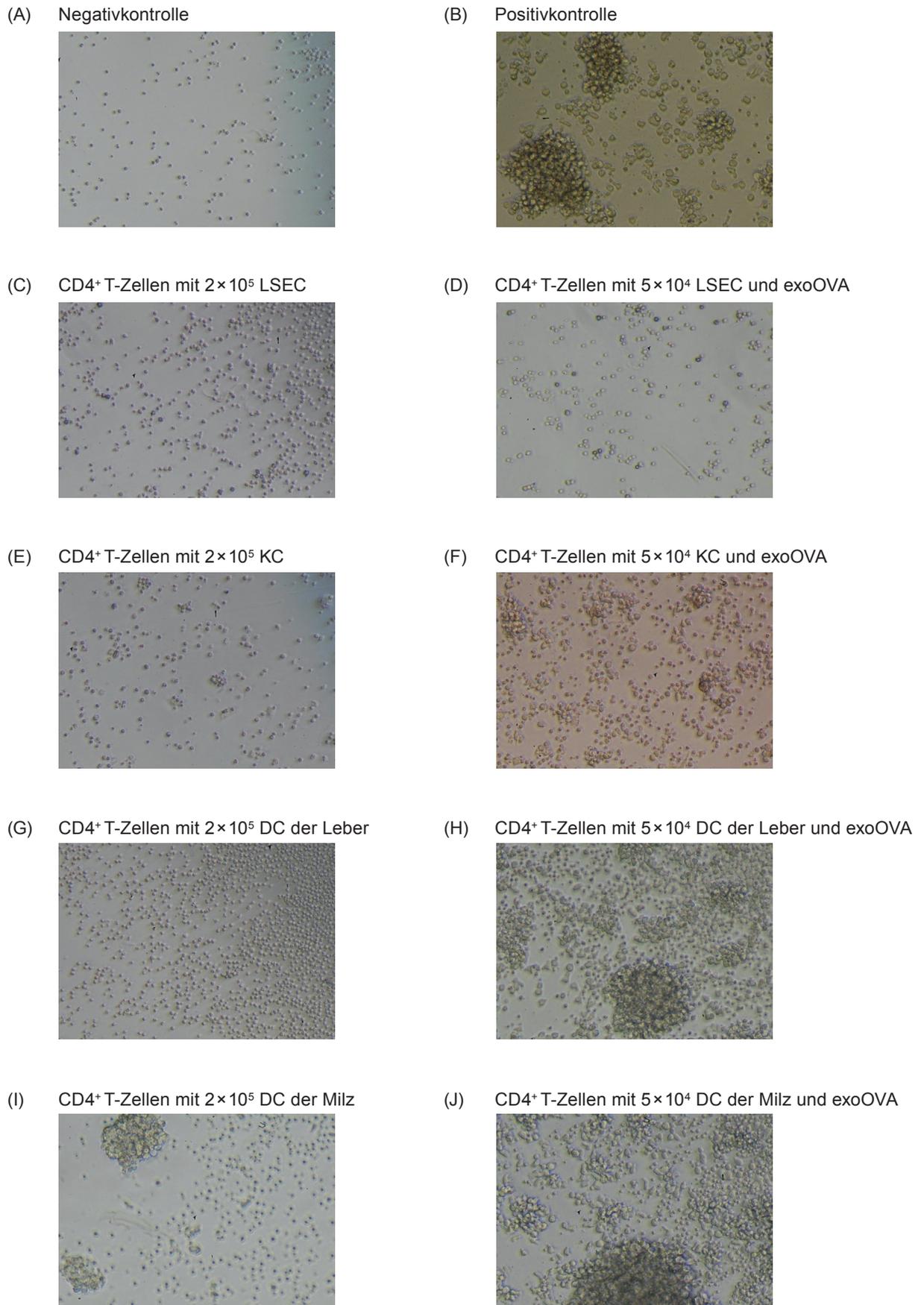


Abbildung 3.4: Mikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen. CD4⁺ T-Zellen aus OT-II-Mäusen und APZ aus TF-OVA-Mäusen nach dreitägiger Inkubation. Repräsentative Aufnahmen in 10facher Vergrößerung.

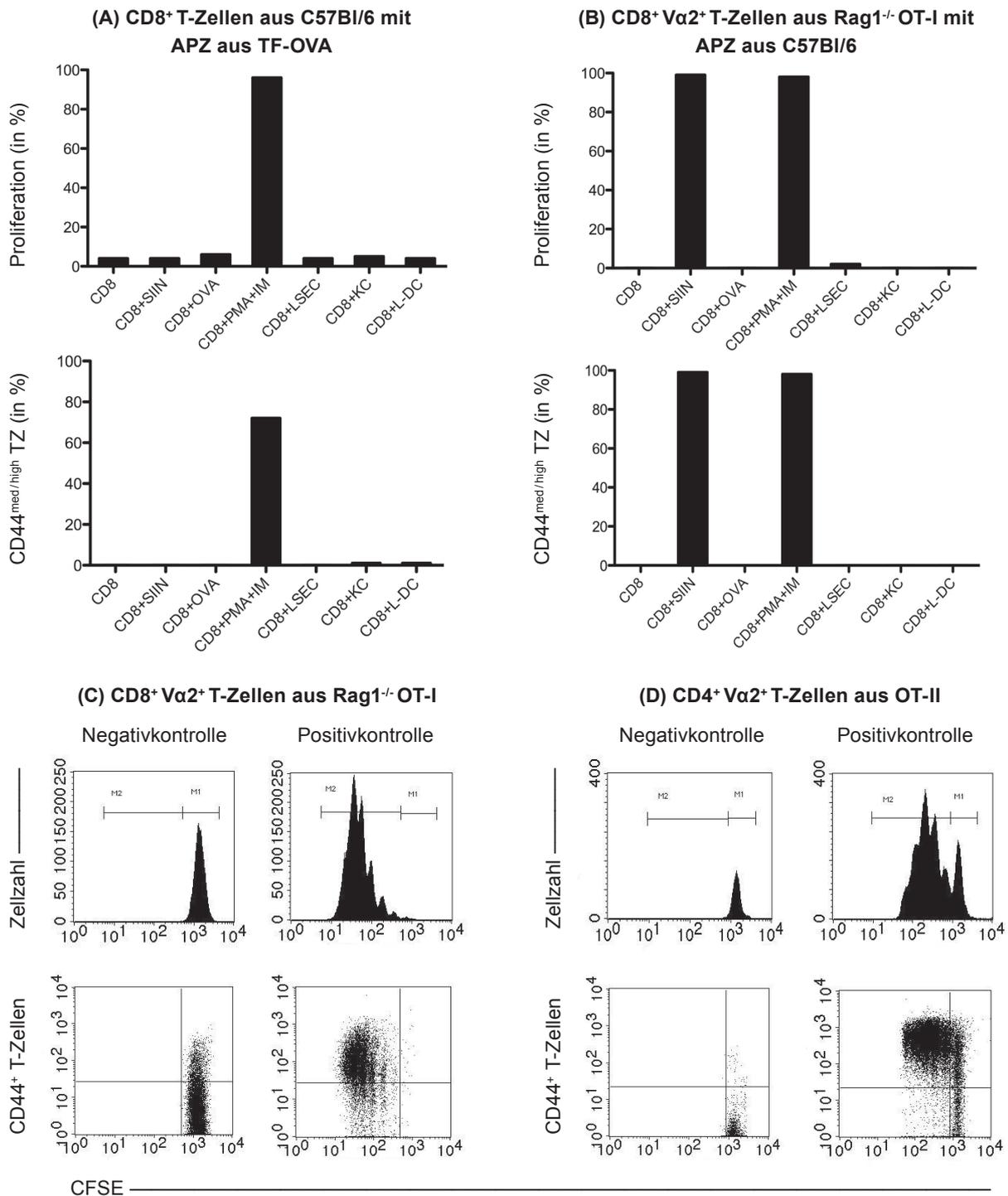


Abbildung 3.5: Nachweis der Antagenspezifität der T-Zellaktivierung unter den gegebenen Kulturbedingungen. Jeweils 2×10^5 Zellen (LSEC, KC und DC aus der Leber) wurden mit je 1×10^5 T-Zellen inkubiert. Nach 72h erfolgte die Analyse des Proliferations- und Aktivierungsstatus der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie anhand der Intensität von CFSE und der Expression von CD44. (A) Es fand keine Proliferation oder Aktivierung statt, wenn T-Zellen aus C57Bl/6-Mäusen mit APZ aus TF-OVA-Mäusen kultiviert wurden oder (B) OT-I CD8⁺ T-Zellen mit LSEC, KC oder DC der Leber aus C57Bl/6-Mäusen kultiviert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate eines separaten Nachweises. (C) Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse einer Analyse der Durchflusszytometrie von OT-I CD8⁺ T-Zellen der Negativkontrolle (Monokultur) und der Positivkontrolle (T-Zellen mit SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄)) sowie (D) von OT-II CD4⁺ T-Zellen der Negativkontrolle und der Positivkontrolle (T-Zellen mit sublethal bestrahlten Milzzellen und Ovalbuminprotein). Eingeschlossenen wurden alle vitalen, CFSE-markierten und CD8⁺ oder CD4⁺ Zellen.

fungierte fortan als Positivkontrolle für die OT-I CD8⁺ T-Zellen (Tabelle 3.2). Analog wurde der Ansatz von 20×10^4 subletal bestrahlten Milzzellen (aus OT-II, siehe Kapitel 2.2.2.3.) und Ovalbuminprotein mit CD4⁺ T-Zellen als Positivkontrolle für OT-II CD4⁺ T-Zellen definiert. Die Analyse nach dreitägiger Kultur ergab durchschnittlich eine Proliferation von 44,7% mit einer Aktivierung von 38,9% gemessen an der Expression von CD44^{med./high} der CD4⁺ T-Zellen. Repräsentative Darstellungen der Analysen aus der Durchflusszytometrie dieser Kontrollen sind in Abbildung 3.5 (D) zu finden.

Damit konnte eine ausschließlich spezifische Proliferation und Expression von CD44 der T-Zellen auf das zelluläre Modellantigen Ovalbumin *in vitro* gesichert werden. Es konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Untersuchungsbedingungen Vitalität und Immunreaktion der T-Zellen nicht eingeschränkt sind.

Tabelle 3.2: Übersicht der untersuchten Zellkulturen. M-DC* nach Bestrahlung, OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid 0,1 µg/ml (Sequenz SIINFEKL), OVA-Protein 100 mg/ml, OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid 5 µg/ml (Sequenz ISQAVHAAHAEINEAGR). Als APZ wurden in den Ansätzen jeweils LSEC, KC, DC der Leber oder DC der Milz inkubiert.

Probe	1 × 10 ⁵ CD8 ⁺ T-Zellen plus	1 × 10 ⁵ CD4 ⁺ T-Zellen plus
Negativkontrolle	Monokultur	Monokultur
Positivkontrolle	OVA ₂₅₇₋₂₆₄ -Peptid (SIINFEKL)	20 × 10 ⁴ M-DC* + OVA-Protein
APZ	5 × 10 ⁴ APZ + OVA-Protein 2,5 × 10 ⁴ APZ 5 × 10 ⁴ APZ 1 × 10 ⁵ APZ 2 × 10 ⁵ APZ	5 × 10 ⁴ APZ + OVA-Protein 2,5 × 10 ⁴ APZ 5 × 10 ⁴ APZ 1 × 10 ⁵ APZ 2 × 10 ⁵ APZ
Zusatzkontrolle	OVA-Protein	OVA-Protein
		M-DC*
		OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid

3.4. Antigenpräsentation durch sinusoidale Leberendothelzellen aus TF-OVA-Mäusen

Das murine TF-OVA-Modell ist gekennzeichnet durch eine weitestgehend auf die Hepatozyten beschränkte transgene Expression von Ovalbumin [101]. Es wird angenommen, dass im Rahmen der physiologischen Zellregeneration in der Leber die zur Phagozytose befähigten Zellpopulationen der Leber auch Hepatozytenfragmente und damit auch das transgene Ovalbumin aufnehmen. Mit Hilfe dieses Modellantigens sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und wie effektiv verschiedene Leberzellen das hepatozytäre Protein internalisieren, ob sie es als endogenes, aber extrazelluläres Antigen über MHC-I- oder MHC-II-Moleküle präsentieren und ob dabei effektive Aktivierungen von T-Zellen induziert werden.

LSEC kleiden als einschichtige Zellschicht ohne Basalmembran die Sinusoide der Leber aus (Näheres in Kapitel 1.3. und 1.4.2.). In der Leber findet auch unter nicht inflammatorischen Bedingungen eine Interaktion zwischen Gewebe- und Immunzellen statt, da in den Sinusoiden enge Kontakte zwischen T-Zellen und LSEC oder zu KC und DC stattfinden können (Abbildung 1.1(A)). Um diese nicht-parenchymalen Leberzellen separat hinsichtlich ihres Potentials zur Aktivierung der T-Zellen zu untersuchen, wurde die direkte Interaktion unter jeweils äquivalenten Bedingungen anhand des transgenen Ovalbumin *in vitro* getestet. Dafür wurden jeweils LSEC, KC oder DC der TF-OVA-Mäuse mit naiven OT-I CD8⁺ T-Zellen oder naiven OT-II CD4⁺ T-Zellen inkubiert. Dies erfolgte in Konzentrationsreihen von $2,5 \times 10^4$ bis 2×10^5 APZ pro Ansatz in einer 96-Loch-Platte mit jeweils 1×10^5 Immunzellen (siehe Tabelle 3.2).

In den Ansätzen mit der geringsten Zelldichte von LSEC waren nach dreitägiger Kokultur im Mittel 7,3 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen proliferiert und von ihnen exprimierten 5,5 % CD44^{med./high}. 5×10^4 LSEC induzierten durchschnittlich eine proliferierende Fraktion von 14,0 % und 1×10^5 LSEC eine proliferierende Fraktion von durchschnittlich 39,0 % der spezifischen CD8⁺ T-Zellen. In den Ansätzen mit der höchsten Zelldichte (2×10^5 LSEC) waren im Mittel 60,3 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen proliferiert und 68,7 % exprimierten CD44^{med./high}.

Die unter äquivalenten Bedingungen getesteten OT-II CD4⁺ T-Zellen zeigten keine Proliferation oder Aktivierung durch LSEC mit endogenem Ovalbumin (Abbildung 3.6). Um eine unzureichende Kostimulation der CD4⁺ T-Zellen auszuschließen, wurde dem Kulturmedium zusätzlicher Proben testweise anti-CD28 zugesetzt. Dies führte nicht zu einer Änderung der Proliferationsergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die entsprechenden Positivkontrollen zeigten eine Proliferation von durchschnittlich 97,7 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen (mit SIINFEKL) und 69,2 % der OT-II CD4⁺ T-Zellen (mit bestrahlten Milzzellen und Ovalbuminprotein).

Um das grundsätzliche Vermögen von LSEC zur Antigenpräsentation im MHC-II-Komplex in diesem System zu prüfen, wurde in jedem durchgeführten Experiment an Tag -1 ein Duplikat von 5×10^4 LSEC aus TF-OVA-Mäusen zusätzlich mit exogenem Ovalbuminprotein inkubiert (siehe Kapitel 2.2.4.3.). Nicht phagozytierte Reste des exogenen Proteins wurden durch Waschen am Tag 0 vor dem Einbringen der T-Zellen entfernt. In diesen Ansätzen zeigte sich nach drei Tagen bei den CD4⁺ T-Zellen durchschnittlich eine Proliferation von 6,3 % und Expression von CD44^{med./high} von ebenfalls 6,3 % (Abbildung 3.6).

Die Proliferation und Aktivierung von OT-I CD8⁺ T-Zellen (60,3 % in M2 und 51,0 % CD44^{med./high}) nach Zugabe von exogenem Ovalbuminprotein unter gleichen Kulturbedingungen stellt die Reaktion dieser Immunzellen auf ein Antigen dar, das zeitgleich aus endogener und exogener Quelle im MHC-I-Komplex auf LSEC vorliegen kann. Im Vergleich mit der Proliferation von OT-I CD8⁺ T-Zellen, denen ausschließlich endogenes Antigen auf 5×10^4 LSEC präsentiert wurde, ist die Proliferation bei 5×10^4 LSEC mit zusätzlichem, exogenem Ovalbumin deutlich gesteigert (14,0 % vs. 60,3 %).

Diese Ergebnisse zeigen, dass LSEC das endogene Antigen Ovalbumin aufnehmen können und dass sie in der Lage sind, das Antigen im Komplex mit MHC-I zu präsentieren, da es

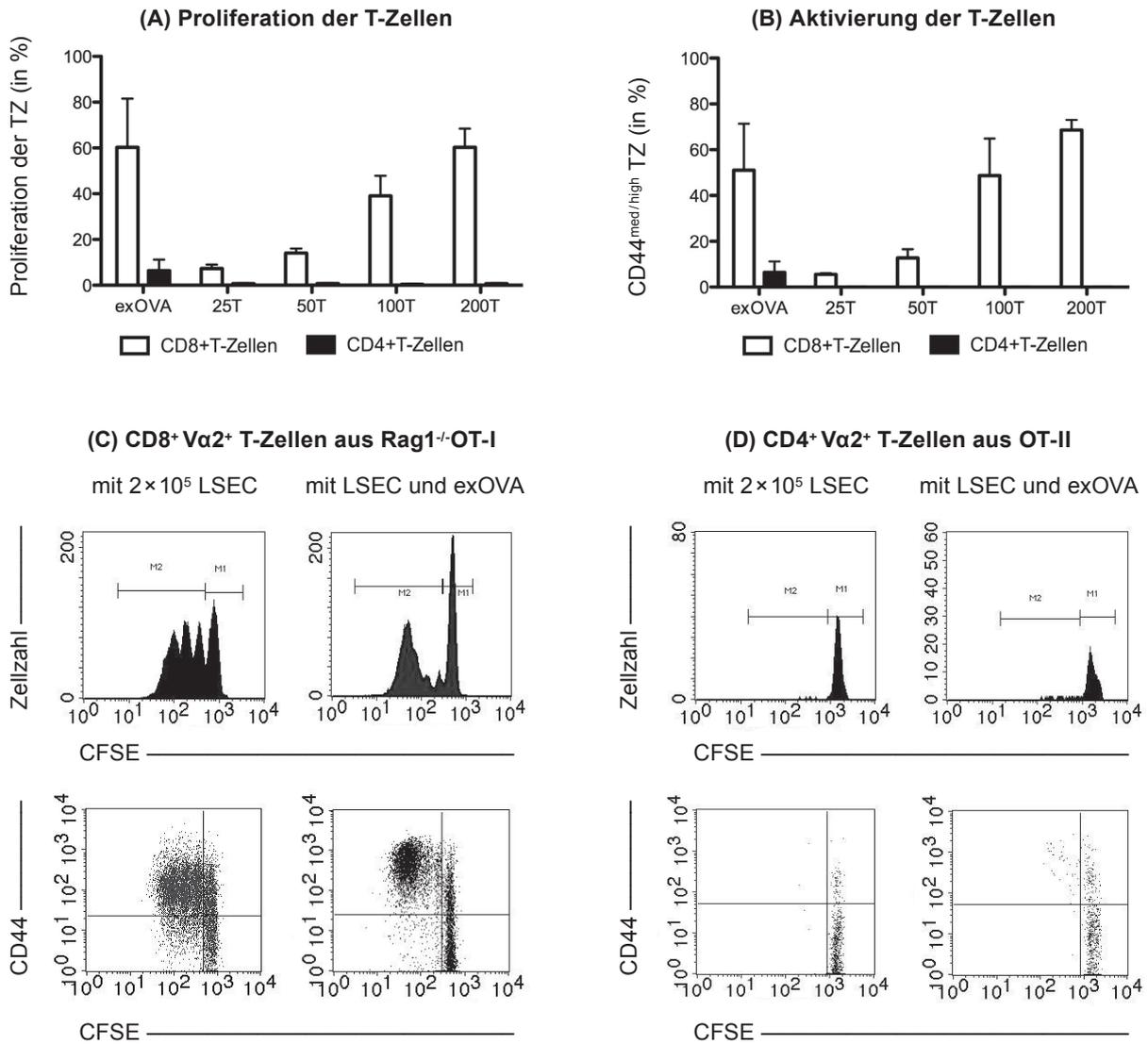


Abbildung 3.6: Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit LSEC aus TF-OVA-Mäusen. Isolierte LSEC wurden in unterschiedlichen Konzentrationen ($2,5 \times 10^4$ bis 2×10^5) mit je 1×10^5 OT-I CD8⁺ T-Zellen oder OT-II CD4⁺ T-Zellen inkubiert. Separate Proben der LSEC wurden vor Einbringung der T-Zellen mit Ovalbuminprotein (exOVA) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse von Proliferation und Aktivierung der T-Zellen erfolgte 72h nach deren Kultivierung anhand der Intensität von CFSE und ihrer Expression von CD44. (A) Vergleich der Proliferationen von OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit LSEC. (B) Vergleich der Expression von CD44 durch OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit LSEC. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten oder Triplikaten aus mindestens drei unabhängigen Durchführungen. (C) und (D) Analysen der Durchflusszytometrie von OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen von repräsentativen Durchführungen. Eingeschlossenen wurden alle vitalen, CFSE markierten CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen.

zu einer Aktivierung und Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen kam. Höhere Konzentrationen der LSEC führten dabei zu einem nahezu linearen Anstieg der Proliferation von OT-I CD8⁺ T-Zellen. Demgegenüber war keine Proliferation der CD4⁺ T-Zellpopulation zu verzeichnen, wenn diese mit LSEC aus TF-OVA-Mäusen inkubiert wurde. Exogenes Protein führte zu einer minimalen Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen. Dies zeigt, dass unter den gegebenen Bedingungen LSEC sowohl endogenes als auch exogenes Antigen prozessieren, und dass sie beides über MHC-I-Moleküle an CD8⁺ T-Zellen (Kreuzpräsentation), nicht aber über MHC-II-Moleküle an CD4⁺ T-Zellen präsentieren.

3.5. Antigenpräsentation durch Kupferzellen aus TF-OVA-Mäusen

Die einzigartige Struktur der Lebersinusoiden ermöglicht den Kontakt zwischen den zirkulierenden T-Zellen und LSEC ebenso wie zu KC, den in der Leber residenten Makrophagen (Abbildung 1.1(A)). Diese (teilweise) Knochenmark-abhängigen Zellen verfügen über eine hohe Phagozytoserate, vor allem für höhermolekulare Strukturen (fraglich existieren auch hepatische, sessile Vorläuferzellen [67] in Kapitel 1.4.3.).

Um das Präsentationsvermögen von KC für ein endogenes Antigen zu prüfen, wurden die Zellen aus TF-OVA-Mäusen mit V α 2⁺ T-Zellen aus OT-I- oder OT-II-Mäusen unter den gleichen Konditionen inkubiert wie LSEC. Von den mit $2,5 \times 10^4$ KC inkubierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen waren nach 72 Stunden durchschnittlich 42,3% proliferiert und 38,7% exprimierten CD44^{med./high} (Abbildung 3.7). Höhere Zahlen von KC führten zu einer höheren Proliferation von OT-I CD8⁺ T-Zellen. Bei der Inkubation mit 2×10^5 KC proliferierten im Mittel 75,0% der OT-I CD8⁺ T-Zellen und sie waren, gemessen an der Expression von CD44^{med./high}, zu 65,0% aktiviert.

Nach der gleichen Inkubationszeit waren im Mittel nur 2,0% der OT-II CD4⁺ T-Zellen proliferiert, die mit 2×10^5 KC aus TF-OVA inkubiert waren und 1,3% exprimierten CD44^{med./high}. Nach der Vorinkubation mit exogenem Ovalbuminprotein proliferierten durchschnittlich 40,0% der CD4⁺ und 78,9% der CD8⁺ T-Zellen.

So wurde am Beispiel des endogenen Antigens Ovalbumin gezeigt, dass KC endogenes Antigen auf MHC-I-Moleküle laden, *in vitro* gegenüber OT-I CD8⁺ T-Zellen präsentieren und diese dabei aktivieren können (Kreuzpräsentation). Nach der Inkubation mit der höchsten Anzahl von KC ließ sich für OT-II CD4⁺ T-Zellen eine diskrete Proliferation nachweisen. Erst nach Zugabe von exogenem Protein wurde eine deutliche Reaktion der CD4⁺ T-Zellen beobachtet. Damit wurde für KC eine Aufnahme und Prozessierung von extrazellulärem, exogenem Antigen mit nachfolgender Präsentation im Komplex mit MHC-II nachgewiesen. Eine Präsentation von endogenem, extrazellulärem Antigen auf MHC-II-Molekülen scheint bei KC nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

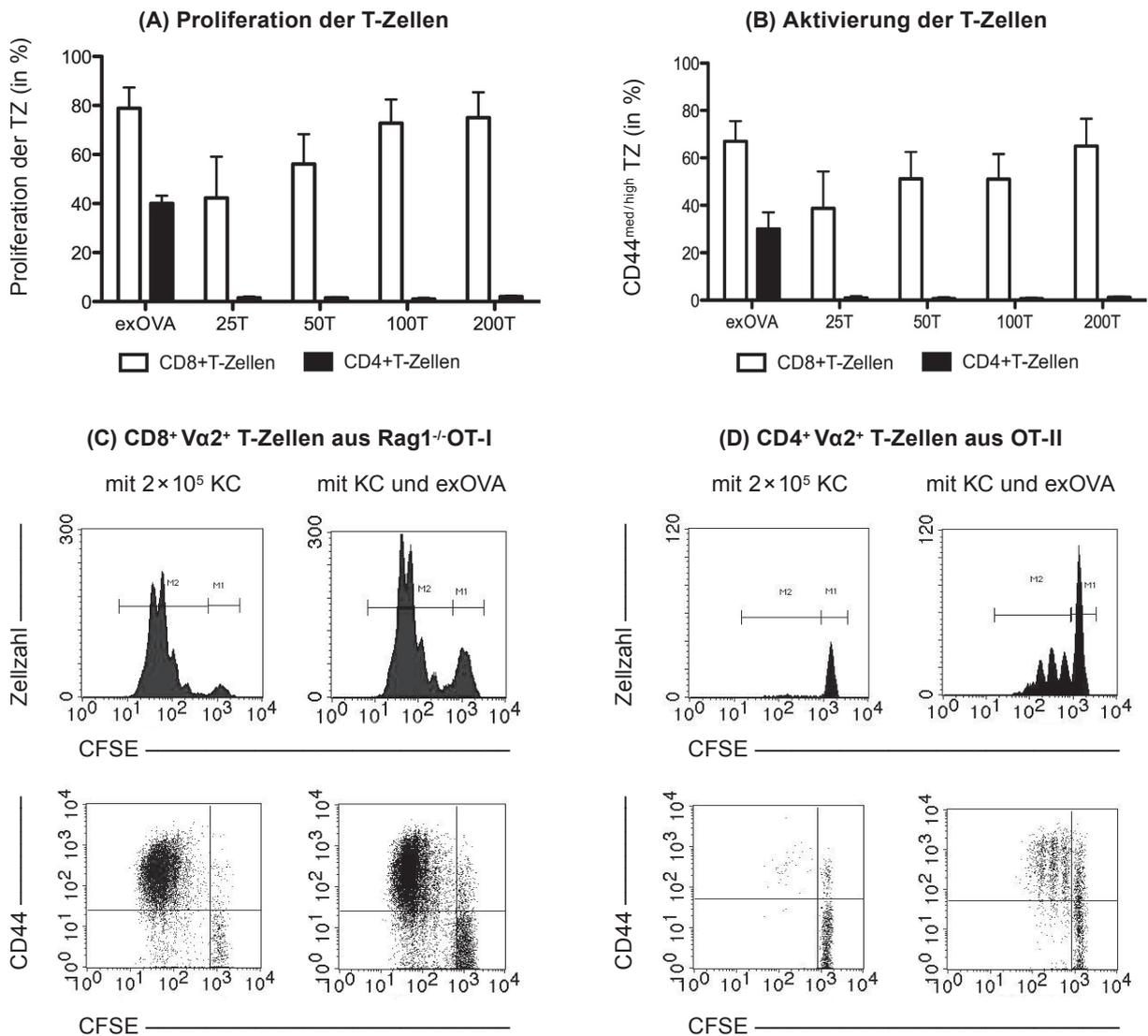


Abbildung 3.7: Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit KC aus TF-OVA-Mäusen. Isolierte KC wurden in unterschiedlichen Konzentrationen ($2,5 \times 10^4$ bis 2×10^5) mit je 1×10^5 OT-I CD8⁺ T-Zellen oder OT-II CD4⁺ T-Zellen inkubiert. Separate Proben der KC wurden vor Einbringung der T-Zellen mit Ovalbuminprotein (exOVA) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse von Proliferation und Aktivierung der T-Zellen erfolgte 72h nach deren Kultivierung anhand der Intensität von CFSE und ihrer Expression von CD44. (A) Vergleich der Proliferationen von OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit KC. (B) Vergleich der Expression von CD44 durch OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit KC. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten oder Triplikaten aus mindestens drei unabhängigen Durchführungen. (C) und (D) Analysen der Durchflusszytometrie von OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen von repräsentativen Durchführungen. Eingeschlossenen wurden alle vitalen, CFSE markierten CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen.

3.6. Antigenpräsentation durch Dendritische Zellen

3.6.1. Dendritische Zellen der Leber

DC präsentieren in allen Geweben des menschlichen Körpers Antigene im Kontext von MHC-I und MHC-II. Laut verschiedenen Studien exprimiert im Vergleich zu anderen Organen ein ungewöhnlich geringer Anteil von DC der Leber MHC-II^{high}. Damit weist unter physiologischen Bedingungen nur ein geringer Teil von DC der Leber einen reifen Phänotyp auf [83,87,89]. Anhand des TF-OVA-Modells sollte die Präsentationsfähigkeit der DC quantifiziert und mit der anderer APZ der Leber verglichen werden.

Auch bei DC der Leber zeigte sich eine mit der Zellzahl zunehmende Expansion von kokultivierten OT-I CD8⁺ T-Zellen: 2,5×10⁴ DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen führten nach dreitägiger Kokultur durchschnittlich zur Proliferation von 6,0% der OT-I CD8⁺ T-Zellen und zur Expression von CD44^{med./high} bei 5,3% der Zellen. OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit 5×10⁴ DC der Leber inkubiert waren, proliferierten im Mittel zu 28,8% und bei mit 1×10⁵ DC inkubierten OT-I CD8⁺ T-Zellen proliferierten im Mittel 58,7%. Die Kokulturen mit 2×10⁵ DC führten durchschnittlich zu einer Proliferation von 69,0% der OT-I CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3.8).

Bei den antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen zeigte sich nur in der Kultur mit der höchsten Zellzahl an DC (2×10⁵) eine zur Negativkontrolle gesteigerte Proliferation von 4,2% der OT-II CD4⁺ T-Zellen (p=0,052, T-Test). Die Kulturen von DC, die zusätzlich mit exogenem Ovalbuminprotein inkubiert worden waren, bevor die OT-II CD4⁺ T-Zellen eingebracht wurden, zeigten nach drei Tagen im Mittel eine Proliferation von 59,7% der OT-II CD4⁺ T-Zellen und eine Aktivierung mit einer Expression von CD44^{med./high} bei 53,3% der Zellen.

Diese Ergebnisse belegen, dass DC der Leber endogenes, extrazelluläres Ovalbumin über MHC-I-Moleküle präsentieren. Sie bewirkten dabei eine deutliche, konzentrationsabhängige Proliferation und Aktivierung (CD44^{med./high}) von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Neben dieser Kreuzpräsentation vermochten sie in hohem Maße exogenes, extrazelluläres Ovalbuminprotein über MHC-II-Moleküle gegenüber den antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren. Endogenes Antigen führte in diesem Modell mit DC der Leber nur zu sehr einer geringen Proliferation und Aktivierung von OT-II CD4⁺ T-Zellen.

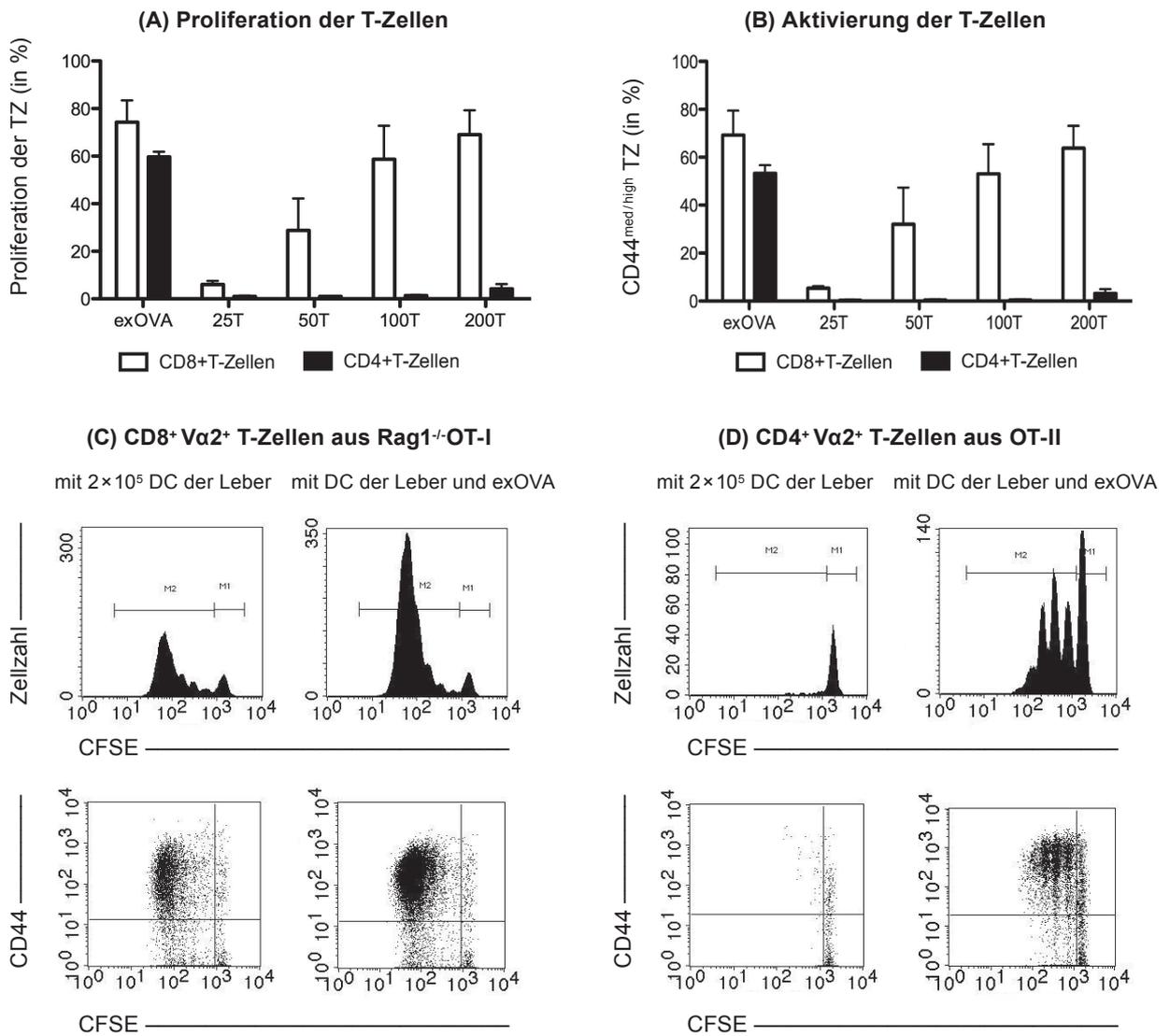


Abbildung 3.8: Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen. Isolierte DC wurden in unterschiedlichen Konzentrationen ($2,5 \times 10^4$ bis 2×10^5) mit je 1×10^5 OT-I CD8⁺-T-Zellen oder OT-II CD4⁺-T-Zellen inkubiert. Separate Proben der DC wurden vor Einbringung der T-Zellen mit Ovalbuminprotein (exOVA) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse von Proliferation und Aktivierung der T-Zellen erfolgte 72h nach deren Kultivierung anhand der Intensität von CFSE und ihrer Expression von CD44. (A) Vergleich der Proliferationen von OT-I CD8⁺-T-Zellen und OT-II CD4⁺-T-Zellen nach Inkubation mit DC. (B) Vergleich der Expression von CD44 durch OT-I CD8⁺-T-Zellen und OT-II CD4⁺-T-Zellen nach Inkubation mit DC. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten oder Triplikaten aus mindestens drei unabhängigen Durchführungen. (C) und (D) Analysen der Durchflusszytometrie von OT-I CD8⁺-T-Zellen und OT-II CD4⁺-T-Zellen von repräsentativen Durchführungen. Eingeschlossen wurden alle vitalen, CFSE markierten CD8⁺ oder CD4⁺-T-Zellen.

3.6.2. Der Einfluss von reifen Dendritischen Zellen der Leber

Nach aktuellem Wissensstand stellen DC die potentesten Aktivatoren des adaptiven Immunsystems dar (Kapitel 1.4.4.) [40,86]. Dennoch induzierten DC der Leber aus TF-OVA-Tieren in den durchgeführten Experimenten eine geringere Proliferation von OT-I CD8⁺ T-Zellen als KC (Abbildung 3.7 (A) und 3.8 (A)). Aufgrund dieser Ergebnisse war es von Interesse, ob der Eindruck der geringeren Immunaktivierung für die Gesamtpopulation der DC gilt oder ob dies durch den geringeren Anteil von reifen DC innerhalb der Leber begründet ist. Bei KC waren mit durchschnittlich 67,3 % signifikant mehr Zellen MHC-II^{med/high} als in der Gesamtpopulation von DC der Leber mit durchschnittlich 42,2 % MHC-II^{med/high} ($p=0,028$, T-Test). Um dies genauer zu untersuchen, wurden aus DTR-B1.6×TF-OVA-Mäusen ausschließlich reife DC der Leber isoliert (siehe Kapitel 2.2.3.2.). Die Zellen wurden in einem direkten Vergleich mit der Gesamtpopulation DC der Leber gestellt in Bezug auf die Aktivierung von OT-I CD8⁺ T-Zellen. Die Untersuchungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie bei den zuvor beschriebenen Experimenten.

Bei den mit $2,5 \times 10^4$ MHC-II^{high} DC inkubierten OT-I CD8⁺ T-Zellen zeigte sich eine durchschnittliche Proliferationsrate von 44,3 %. Sie ist im Vergleich mit der durch die Gesamtpopulation von DC der Leber erreichte Proliferationsrate von 6,0 % signifikant höher ($p=0,0005$, T-Test). Die Aktivierung, gemessen als Expression von CD44^{med/high} lag bei den OT-I CD8⁺ T-Zellen in dieser niedrigsten Zellzahl mit MHC-II^{high} DC im Mittel bei 35,2 %. Das entspricht einer signifikant höheren Aktivierung als der durch die Gesamtpopulation DC mit einer Expression von CD44^{med/high} bei 5,3 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen.

Mit zunehmender Anzahl von APZ verringerten sich die Differenzen: Mit 5×10^4 MHC-II^{high} DC kokultivierten OT-I CD8⁺ T-Zellen proliferierten durchschnittlich 54,5 % gegenüber 28,8 % bei den mit 5×10^4 nicht selektierten DC der Leber. Dieser Unterschied ist nicht mehr signifikant, ebenso wenig wie der bei den mit 1×10^5 MHC-II^{high} DC inkubierten OT-I CD8⁺ T-Zellen. Hier zeigte sich im Mittel eine Proliferationsrate von 72,0 % gegenüber 58,7 % bei den mit der Gesamtpopulation inkubierten OT-I CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3.9).

In den Ansätzen, die zusätzlich mit exogenem Antigen getestet wurden, waren die Proliferation und Aktivierung der OT-I CD8⁺ T-Zellen, die jeweils mit MHC-II^{high} DC oder mit der Gesamtpopulation kokultiviert waren, vergleichbar hoch. Ebenso lassen sich keine signifikanten Unterschiede bei den Proliferationsraten der OT-I CD8⁺ T-Zellen aus den Kulturen der MHC-II^{high} DC gegenüber denen aus den Kokulturen der KC finden: Bei $2,5 \times 10^4$ APZ 44,3 % vs. 42,3 % wie auch bei 5×10^4 APZ 54,5 % vs. 56,1 % und bei 1×10^5 APZ 72,0 % vs. 72,8 % (MHC-II^{high} DC gegenüber KC).

Durch diese direkten Vergleiche konnte gezeigt werden, dass bei der Präsentation von endogenem Antigen eine stärkere Proliferation und Aktivierung (CD44^{med./high}) von OT-I CD8⁺ T-Zellen durch die reifen hepatischen DC bewirkt wird als durch nicht selektionierte DC der Leber. Demgegenüber scheint der Anteil unreifer DC innerhalb der Gesamtpopulation im Vergleich mit KC zu der geringeren Proliferationsreaktion auf das präsentierte, endogene Antigen zu

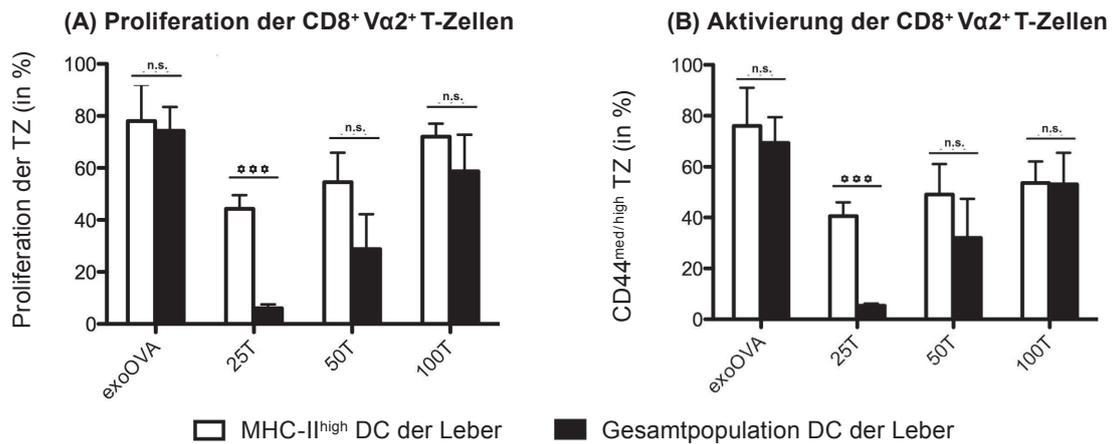


Abbildung 3.9: Vergleich der Reaktion der OT-I CD8⁺ T-Zellen nach Kultivierung mit reifen DC der Leber gegenüber der Gesamtpopulation DC. Aus DTR-BI.6×TF-OVA-Mäusen isolierte, reife DC der Leber wurden in unterschiedlichen Konzentrationen ($2,5 \times 10^4$ bis 1×10^5) mit je 1×10^5 OT-I CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Separate Proben der DC wurden vor Einbringung der T-Zellen mit Ovalbuminprotein (exoOVA) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse von Proliferation und Aktivierung der T-Zellen erfolgte 72h nach deren Kultivierung anhand der Intensität von CFSE und ihrer Expression von CD44. (A) Vergleich der Proliferationen und (B) der Expressionen von CD44 durch OT-I CD8⁺ T-Zellen nach Inkubation mit DC der Leber. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten oder Triplikaten aus mindestens zwei unabhängigen Durchführungen (***= $p < 0,001$, n.s.=nicht signifikant, T-Test).

führen. Ein exogenes Antigen hingegen bewirkt eine annähernd gleich starke Proliferation und Aktivierung (CD44^{med./high}) der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert durch KC (78,9 %) oder MHC-II^{high} DC (78,0 %) oder durch die Gesamtpopulation DC der Leber (74,3 %).

3.6.3. Dendritische Zellen der Milz aus TF-OVA-Mäusen

Um die Potenz von DC der Leber zur Antigenpräsentation in Relation zu DC anderer Organe untersuchen zu können, wurden zum Vergleich DC der Milz aus TF-OVA-Mäusen isoliert. Die Analysen der Proliferation und Aktivierung von antigenspezifischen OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den zuvor beschriebenen Untersuchungen.

Auch bei dieser Subpopulation von DC zeigte sich in der Präsentation des endogenen Modellantigens eine mit der Zellzahl steigende Proliferation und Aktivierung (CD44^{med./high}) der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Bei den mit 2×10^5 DC der Milz inkubierten OT-I CD8⁺ T-Zellen waren nach 72 Stunden im Mittel 71,2 % proliferiert und 67,0 % aktiviert, gemessen an der Expression von CD44^{med/high}.

Nach der gleichen Inkubationszeit mit 2×10^5 DC der Milz waren 17,2 % der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen proliferiert und 10,3 % der Zellen exprimierten CD44^{med/high}. Das Proliferationsergebnis der OT-II CD4⁺ T-Zellen mit 2×10^5 DC der Milz ist dabei hoch signifikant zur Negativkontrolle ($p = 0,002$, T-Test). Waren diese APZ mit exogenem Ovalbuminprotein vorinkubiert, proliferierte ein annähernd gleich großer Anteil der beiden T-Zellpopulationen und zwar 72,9 % der OT-I CD8⁺ und 77,8 % der OT-II CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.10).

Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit denen von DC der Leber, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei den gemessenen Proliferationen und Aktivierungen (CD44^{med./high}) der antigenspezifischen T-Zellen. Zur Veranschaulichung sind nachfolgend die jeweiligen Proliferationen der Immunzellen gegenübergestellt - jeweils für alle Zellzahlen DC der Leber und DC der Milz in Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Übersicht der Proliferationen der Ovalbumin-spezifischen T-Zellen nach Kokulturen mit DC der Leber oder DC der Milz. Gegenübergestellt wurden jeweils die durchschnittlichen Proliferationen der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen für jede Zellzahl von APZ und für die Ansätze mit Vorinkubation mit exogenem Protein. Die zugehörigen Signifikanzen p wurden aus den Mittelwerten von Duplikaten oder Triplikaten aus mindestens zwei unabhängigen Durchführungen mit den zu vergleichenden DC aus Leber und Milz berechnet (T-Test).

	OT-I CD8 ⁺ T-Zellen (Proliferation in %)			OT-II CD4 ⁺ T-Zellen (Proliferation in %)		
	L-DC	M-DC	Signifikanz p	L-DC	M-DC	Signifikanz p
exoOVA	74,3	72,9	0,936	59,7	77,8	0,115
2,5 × 10 ⁴	6,0	10,5	0,152	1,0	2,0	1,000
5 × 10 ⁴	28,8	24,5	0,856	1,0	1,0	1,000
1 × 10 ⁵	58,7	48,5	0,592	1,3	3,0	0,148
2 × 10 ⁵	69,0	71,2	0,884	4,2	17,2	0,055

Eine stärkere Proliferation und Aktivierung von OT-II CD4⁺ T-Zellen durch DC der Milz im Vergleich zu DC der Leber lässt sich anhand dieser Daten also nicht belegen. Die zell- und organspezifische Expression des transgenen Ovalbumin auf Hepatozyten wurde nachgewiesen [101]. Die Tatsache, dass DC der Milz aus TF-OVA-Mäusen *in vitro* zu einer Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen führen, spricht dafür, dass ein Teil der DC das Antigen in der Leber aufgenommen haben und in die Milz migriert sind. Die Proliferation von OT-I CD8⁺ T-Zellen und von OT-II CD4⁺ T-Zellen belegt, dass DC der Milz das endogene Antigen im Komplex mit MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentieren.

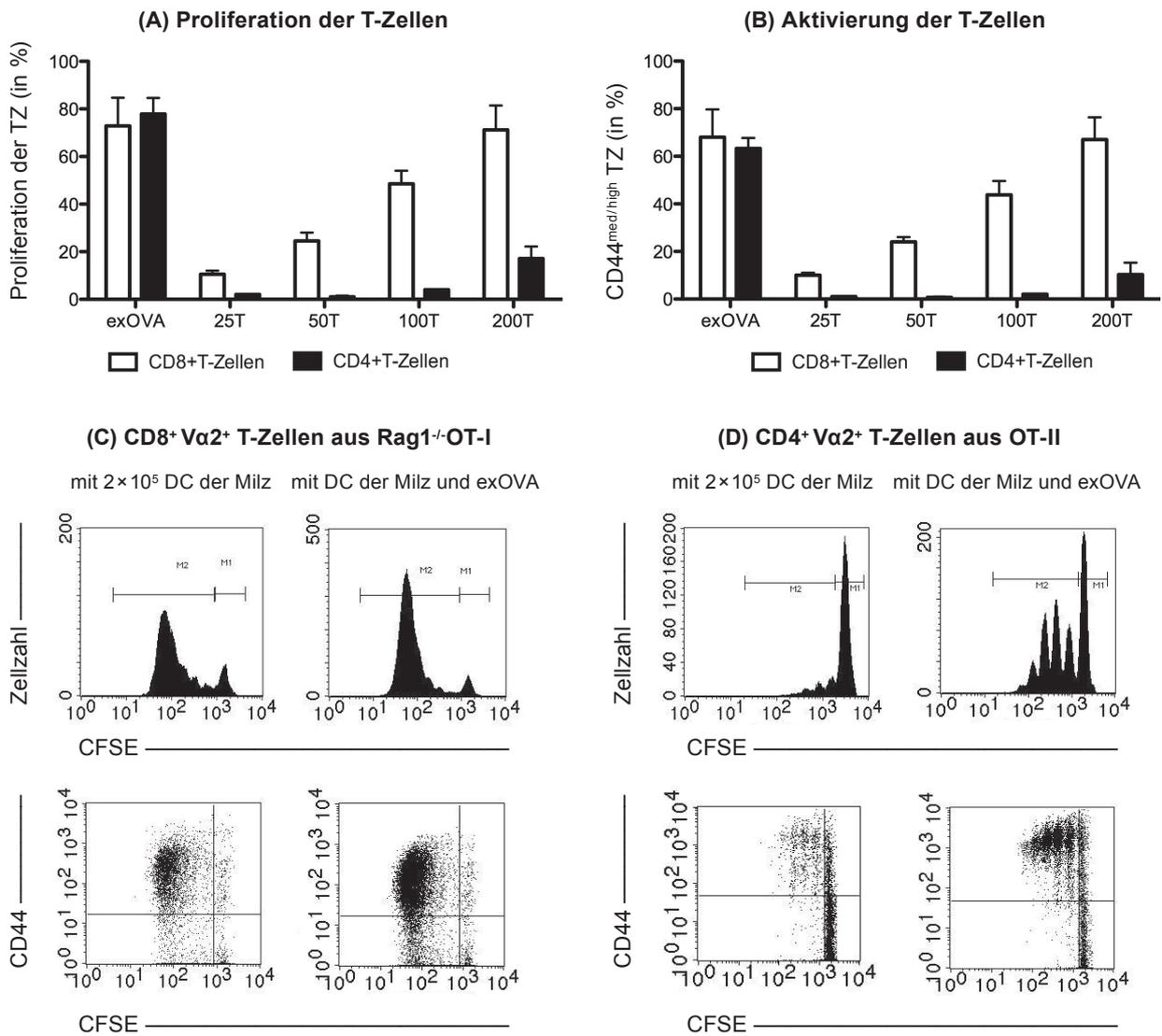


Abbildung 3.10: Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit DC der Milz aus TF-OVA-Mäusen. Isolierte DC wurden in unterschiedlichen Konzentrationen ($2,5 \times 10^4$ bis 2×10^5) mit je 1×10^5 OT-I CD8⁺-T-Zellen oder OT-II CD4⁺-T-Zellen inkubiert. Separate Proben der DC wurden vor Einbringung der T-Zellen mit Ovalbuminprotein (exOVA) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse von Proliferation und Aktivierung der T-Zellen erfolgte 72h nach deren Kultivierung anhand der Intensität von CFSE und ihrer Expression von CD44. (A) Vergleich der Proliferationen von OT-I CD8⁺-T-Zellen und OT-II CD4⁺-T-Zellen nach Inkubation mit DC. (B) Vergleich der Expression von CD44 durch OT-I CD8⁺-T-Zellen und OT-II CD4⁺-T-Zellen nach Inkubation mit DC. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten oder Triplikaten aus mindestens zwei unabhängigen Durchführungen. (C) und (D) Analysen der Durchflusszytometrie von OT-I CD8⁺-T-Zellen oder OT-II CD4⁺-T-Zellen von repräsentativen Durchführungen. Eingeschlossenen wurden alle vitalen, CFSE markierten CD8⁺ oder CD4⁺-T-Zellen.

3.7. Unterschiedliche Aktivierungen der T-Zellen durch die verschiedenen Leberzelltypen

3.7.1. Antigen-präsentierende Zellen der Leber aktivieren OT-I CD8⁺ T-Zellen

Die Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen belegen, dass LSEC, KC und DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen durch Präsentation eines endogenen Antigens OT-I CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation und Expression von Aktivierungsmarkern stimulieren können. Für die beiden genannten Parameter ist bei jeder dieser hepatischen Zellpopulationen eine Steigerung in Abhängigkeit der Zellzahl zu beobachten. So findet sich bei der höchsten Zellzahl von APZ (2×10^5) kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Proliferationen: Nach der Inkubation mit LSEC proliferierten durchschnittlich 60,3 %, nach der Inkubation mit KC durchschnittlich 75,0 % und nach der Inkubation mit DC der Leber im Mittel 69,0 % gegenüber 71,2 % proliferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen nach der Inkubation mit DC der Milz (Abbildung 3.11 (A)).

Um in einem Bereich submaximaler Aktivierung die quantitativen Unterschiede zwischen KC und DC als professionelle gegenüber nicht-professionellen APZ bei der T-Zellaktivierung untersuchen zu können, wurden die Ansätze mit 5×10^4 Zellen herangezogen. Bei dieser Zellzahl zeigte sich, dass LSEC als nicht-professionelle APZ eine signifikant geringere Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen induzierten als KC und DC der Milz ($p=0,009$ bzw. $p=0,043$, T-Test). Aufgrund der großen Varianz der Proliferationsraten bei den Kokulturen mit DC der Leber konnte für diese Zellpopulation keine Signifikanz im Vergleich zu LSEC gezeigt werden ($p=0,261$, T-Test). Die Proliferationsrate der OT-I CD8⁺ T-Zellen nach Inkubation mit DC der Leber war mit 28,8 % gegenüber 14,0 % nach Inkubation mit LSEC numerisch jedoch annähernd doppelt so hoch.

Die vorherige Zugabe von exogenem Ovalbuminprotein führte zu einer deutlichen Erhöhung der Proliferationsraten von OT-I CD8⁺ T-Zellen. Erneut ließ sich eine Differenz zwischen den nicht-professionellen und den professionellen APZ aufzeigen (Abbildung 3.11 (B)). Nach Kokultur mit LSEC proliferierten im Mittel 60,0 % der OT-I CD8⁺ T-Zellen, nach Kokultur mit KC im Mittel 78,9 % ($p=0,347$ für LSEC, T-Test) und nach Kokultur mit DC der Leber proliferierten durchschnittlich 74,3 % ($p=0,186$ für LSEC, T-Test) sowie durchschnittlich 72,9 % nach Kokultur mit DC der Milz ($p=0,302$ für LSEC, T-Test).

Auch bei OT-II CD4⁺ T-Zellen zeigte sich eine deutliche Proliferation, wenn die APZ vor der Kokultur mit exogenem Ovalbumin inkubiert worden waren. Dabei war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Proliferation der Immunzellen nach Inkubation mit LSEC gegenüber der nach einer Inkubation mit KC ($p=0,005$, T-Test) zu beobachten. Auch zwischen den Proliferationen der OT-II CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit LSEC zu denen nach Inkubation mit DC der Leber ($p=0,001$, T-Test) sowie im Vergleich der T-Zellproliferationen nach Kokultur mit DC der Milz war ein signifikanter Unterschied zu dokumentieren ($p < 0,001$ für LSEC, T-Test).

Ohne vorherige Inkubation mit exogenem Ovalbumin konnte selbst in der höchsten Zellzahl (2×10^5) bei sehr geringer Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen nach 3-tägiger Kokultur

mit KC und DC der Leber kein Unterschied zu LSEC gezeigt werden. Mit hoch signifikanten Werten konnte aber bewiesen werden, dass in diesen murinen, transgenen Zellexperimenten antigenspezifische OT-I CD8⁺ T-Zellen, nicht aber antigenspezifische OT-II CD4⁺ T-Zellen durch ein hepatisches, endogenes Antigen aktiviert werden ($p \leq 0,001$ für den Vergleich der T-Zellproliferationen bei Kultivierung mit 2×10^5 LSEC, KC, DC der Leber oder DC der Milz).

3.7.2. Effektorfunktion der OT-I CD8⁺ T-Zellen

Die Leber gilt als Toleranz-induzierendes Organ [113] und ihr Milieu als reich an antiinflammatorischen Zytokinen [33,59,73]. Eine Aktivierung von T-Zellen kann auch ohne nachfolgende Effektorfunktion ablaufen (siehe Kapitel 1.5.8.). Um in unserem transgenen Modell zu differenzieren, ob die Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen nach Erkennung des endogenen Antigens auch zu einer effektiven Aktivierung der OT-I CD8⁺ T-Zellen führt, bestimmten wir die Konzentration des Effektorzytokins IFN- γ mittels ELISA in den Überständen der Kokulturen (Kapitel 2.2.5.).

In den Überständen der Negativ- und Positivkontrollen der OT-I CD8⁺ T-Zellen sowie in den Überständen der einzelnen APZ ohne Immunzellen war IFN- γ nicht nachweisbar (Daten Monokulturen der APZ nicht gezeigt). In den Kokulturen der OT-I CD8⁺ T-Zellen mit 2×10^5 KC wurden durchschnittlich 271 pg/ml IFN- γ gemessen (Proliferation 75,0%). In den Kokulturen der OT-I CD8⁺ T-Zellen mit 2×10^5 DC der Leber wurden durchschnittlich 519 pg/ml gemessen (Proliferation 69,0%) und in denen der DC der Milz im Mittel 1016 pg/ml (Proliferation 71,2%). In den Überständen der Kokulturen mit LSEC konnte kein IFN- γ nachgewiesen werden (Abbildung 3.11 (C)). Das gilt auch für die Ansätze der LSEC, die zuvor mit exogenem Ovalbuminprotein versetzt worden waren.

Wird die Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen mit der ermittelten Konzentration von IFN- γ in Relation gebracht, zeigt sich, dass KC unter den professionellen APZ die höchste Proliferation aber geringste Sekretion von IFN- γ induzierten. Das zeigt sich ebenso bei den Ansätzen mit zusätzlichem, exogenem Ovalbumin: Hier wurde in den Überständen der Kokulturen mit KC trotz stärkstem Proliferationsreiz (durchschnittlich 78,9%) die geringste Menge des Effektorzytokins nachgewiesen mit durchschnittlich 73 pg/ml IFN- γ (Abbildung 3.11 (D)). In den Kokulturen mit DC der Leber und zusätzlichem, exogenem Ovalbumin wurden im Mittel 2660 pg/ml IFN- γ mittels ELISA bestimmt (Proliferation im Durchschnitt 74,3%) und in den Überständen der Ansätze mit DC der Milz wurden durchschnittlich 3191 pg/ml IFN- γ detektiert (Proliferation im Durchschnitt 72,9%).

In diesem transgenen Tiermodell wurde damit die Kreuzpräsentation eines endogenen Antigens auf LSEC, KC und DC der Leber indirekt belegt, da die antigenspezifischen OT-I CD8⁺ T-Zellen proliferiert sind und sie Aktivierungsmarker exprimierten. In diesem Rahmen wurde gezeigt, dass bei hohen Zahlen der APZ eine Sättigung der Reaktion der OT-I CD8⁺ T-Zellen eintritt. Bei submaximaler Aktivierung konnte ein quantitativer und qualitativer Unterschied bei der T-Zellaktivierung zwischen LSEC und den professionellen APZ der

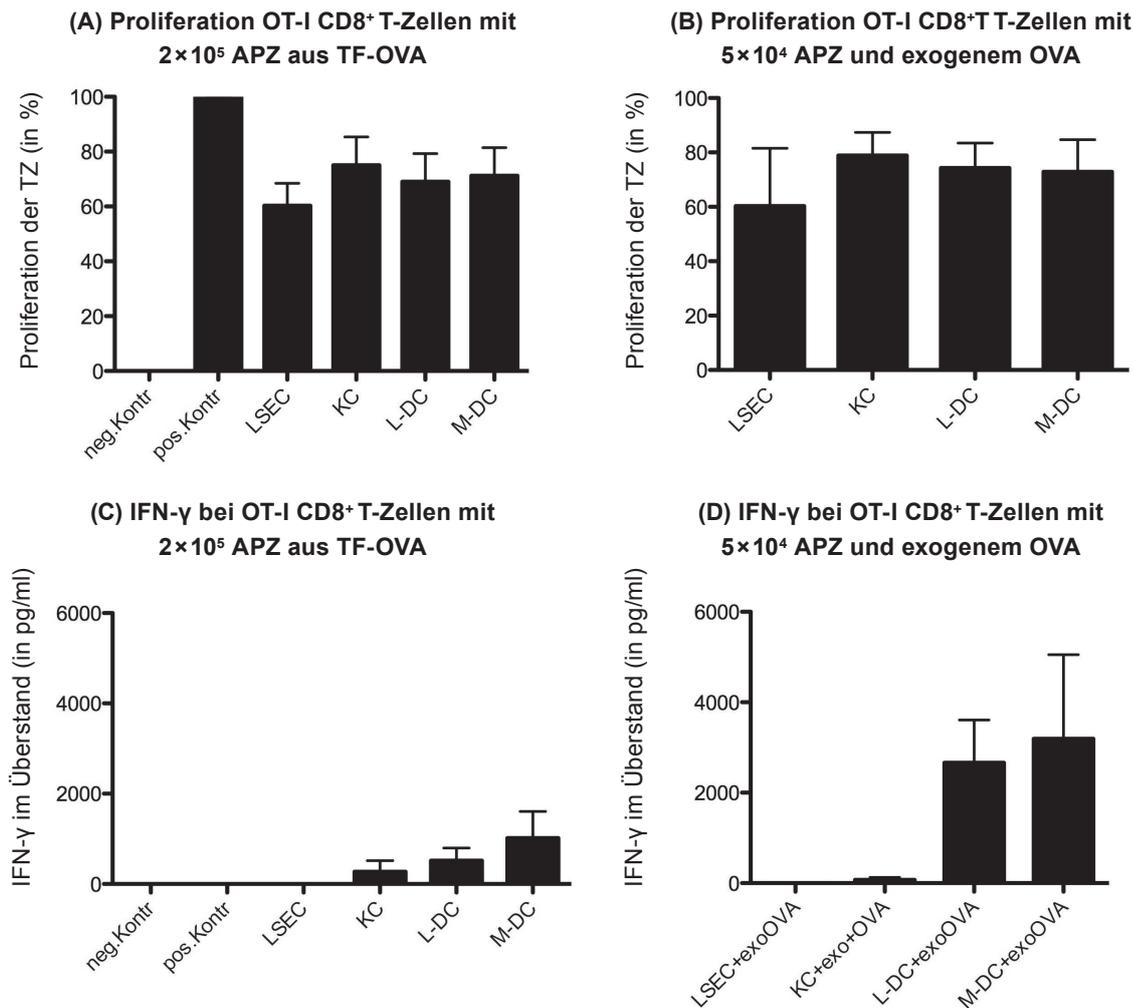


Abbildung 3.11: Vergleich der Potentiale zur effektiven Antigenpräsentation mit endogenem oder exogenem Antigen. (A) Isolierte APZ der Leber und DC der Milz wurden mit je 1×10^5 OT-I CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse der Proliferationen der T-Zellen erfolgte 72h nach deren Kultivierung anhand der Intensität von CFSE. (C) Die Konzentration des Effektorzytokins IFN-γ wurde mittels ELISA aus den Überständen der Zellkulturen bestimmt. (B, D) Separate Proben der APZ wurden vor Einbringung der T-Zellen mit Ovalbuminprotein (exoOVA) inkubiert. Die Proliferationen der CD8⁺ T-Zellen und die Konzentration des IFN-γ wurden bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten oder Triplikaten aus mindestens zwei unabhängigen Durchführungen.

Leber gezeigt werden. Es wurde ferner bewiesen, dass ausschließlich die untersuchten professionellen APZ (KC und DC der Leber) eine signifikante Effektorfunktion der OT-I CD8⁺ T-Zellen induzierten. Die nicht professionellen Antigen-präsentierenden LSEC induzierten dagegen keine messbare Produktion von IFN-γ bei den OT-I CD8⁺ T-Zellen. Eine signifikante Proliferation und Aktivierung von OT-II CD4⁺ T-Zellen durch APZ der Leber nach der Aufnahme des transgenen, hepatozytären Proteins konnte indes nicht induziert werden.

4. DISKUSSION

4.1. Hochspezifische Isolation von hepatischen Antigen-präsentierenden Zellen

Die hochspezifische Aufreinigung jeder untersuchten Leberzellpopulation ist Voraussetzung, um die Präsentation eines hepatozellulären Antigens durch die verschiedenen Zelltypen konkret vergleichen können. Um das zu gewährleisten, wurden für die vorliegende Arbeit die etablierten Verfahren zur Isolation von hepatischen Zellen [33,123,124] durch die Anwendung der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) weiterentwickelt (Abbildung 2.2 und 3.2). Die dabei erreichten Aufreinigungsgrade entsprechen mit 98,9% bei sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) den angegebenen Reinheitsgraden anderer Verfahren von Katz et al., Kruse et al. oder Schurich et al. mit 96% bis 99% [55,58,125].

Als Kupferzellen (KC) wurden für diese Arbeit mittels FACS ausschließlich Zellen direkt selektiert, die eine deutliche und doppelt positive Expression der Oberflächenmoleküle F4/80 und CD11b aufwiesen. In den anschließenden Kontrollen am Durchflusszytometer zeigten durchschnittlich 80% diese beiden Zellmarker. Ein hoher Anteil an verunreinigenden Dendritischen Zellen (DC) konnte mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper ausgeschlossen werden. Maximal 3% der Zellen waren CD11c⁺ MHC-II⁺. Das lässt vermuten, dass es durch die Abläufe der Zellisolation bei einem Teil der KC nach der FACS zu einer Erniedrigung der Expression von F4/80 und CD11b gekommen ist.

Zusätzlich sichert die hier angewendete, zeitgleiche Separation von KC und DC der Leber aus einer CD146⁻ Zellfraktion heraus in maximaler Form die Reinheit der beiden Populationen (Abbildung 2.2). Dies ist technisch begründet, da eine überschneidende Expression von analysierten Oberflächenmarkern automatisch zum Verwerfen der Zellen bei der FACS führt. So wurden ausschließlich Zellen in Kultur gebracht, die zuvor mit einem eindeutigen Nachweis der doppelt positiven Marker von KC (CD11b und F4/80) oder DC (CD11c und MHC-II) identifiziert wurden.

Bei anderen Untersuchungen werden die häufig verwendeten Isolationsverfahren der MACS mit Bead-gebundenen Antikörpern oder die Dichtegradientenzentrifugation vermutlich nicht zu einer höheren Reinheit bei der Aufreinigung führen, als das hier angewandte Verfahren. Die MACS beinhaltet keine Sortierung auf Einzelzellebene. Es kann dabei auch keine Berücksichtigung der überschneidenden Expressionsmuster für die Oberflächenmarker CD11b und CD11c bei KC und DC der Leber erfolgen [76,91]. So bleibt bei den Studien von Katz et al. [55], Schurich et al. [126] sowie You et al. [33] unklar, ob und mit welchem Resultat jeweils Gegenfärbungen für eventuell verunreinigende Zellfraktionen durchgeführt wurden.

Dadurch sehen wir im Vergleich mit anderen Publikationen einen deutlichen Vorteil für das

hier angewandte Isolationsverfahren. Die erreichten Aufreinigungsgrade erlauben somit eine störungsfreie Analyse und zuverlässige Interpretation von T-Zellreaktionen aus den jeweiligen Kokulturen heraus.

4.2. Zellkulturen und transgene Proteine als probate Verfahren zur Untersuchung von Immunreaktionen

In vivo wurde für das TF-OVA-Modell bereits untersucht, ob eine der Subpopulationen von T-Zellen hepatozelluläres Antigen erkennt und dadurch intrahepatisch aktiviert werden kann [101]. Doch *in vivo* lässt sich bis auf indirekte Aussagen aus Depletionsversuchen oder bis auf verallgemeinernde Aussagen aus Untersuchungen mit Knochenmark-Chimären nicht herausfinden, welcher hepatische Zelltyp konkret Antigene gegenüber T-Zellen präsentieren kann und mit welcher immunologischen Konsequenz. Durch das im vorherigen Abschnitt beschriebene Isolationsverfahren war es möglich, selektiv LSEC, KC und DC *in vitro* in ihrer Interaktion mit antigenspezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen. Da im Stamm TF-OVA das Ovalbumin als transgenes Protein in der Zellmembran der Hepatozyten exprimiert wird, entspricht dies den physiologischen Eigenschaften eines Zellproteins. So kann es unter der Vorstellung der physiologischen Zellerneuerung als Zellfragment apoptotischer Hepatozyten über Phagozytose durch NPZ aufgenommen werden. Für phagozytierte Proteine sind grundsätzlich nach der intrazellulären Prozessierung die Präsentationen im Komplex mit MHC-I oder MHC-II möglich (siehe Kapitel 1.5.3.). Eine nachgewiesene Aktivierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen beweist indirekt, dass ein solches Protein über MHC-I- bzw. über MHC-II-Moleküle präsentiert wurde und dass eine ausreichende Kostimulation (Signal 2 nach Janeway, Kapitel 1.5.5.) vorgelegen hat.

Bertolino et al. konnten mit ihrem transgenen Mausmodell Met-K^b ebenfalls *in vivo* eine intrahepatische, antigenspezifische Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen aufzeigen und damit nachweisen, dass auch im nicht-lymphatischen Gewebe eine Aktivierung von T-Zellen stattfindet [111]. In diesem Modell konnte aber nicht getestet werden, ob auch eine Aktivierung von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen erfolgt, da das verwendete transgene Alloantigen der Empfängermause (H-2K^b Expression in Hepatozyten) auf MHC-I-Moleküle beschränkt ist. Auch bei dem Modell von Wuensch et al. ist die untersuchte Antigenerkennung von vornherein auf CD8⁺ T-Zellen limitiert [50]. Durch die Verwendung eines Antigens, das mittels Adeno-assoziiertem Virus in Hepatozyten übertragen wurde, erfolgte die Antigenpräsentation ausschließlich auf MHC-I-Molekülen und damit die Erkennung ausschließlich durch CD8⁺ T-Zellen (virale, intrazelluläre Proteine nach Prozessierung auf MHC-I, siehe Kapitel 1.5.3.). Bei der effektiven Aktivierung der untersuchten CD8⁺ T-Zellen im Modell von Wuensch et al. ist außerdem eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems nicht ausgeschlossen, weil ein virales Transduk-

tionsmodell genutzt wurde. Ebenso bieten Mausmodelle mit „knock-out“-Tieren vielfältige, nicht kalkulierbare Beeinflussungen des Gesamtorganismus, welche die eindeutige Beurteilung des untersuchten Sachverhaltes einschränken. Dazu zählen auch BALB/c-Tgfb1^{-/-}-Mäuse, die von Robinson et al. als Untersuchungsmodell der AIH genutzt wurden [127]. Die Arbeitsgruppe konstatierte, dass CD4⁺ T-Zellen für die Leberschädigung verantwortlich sind. Doch es bleibt unklar, ob diese T-Zellpopulation auch den Beginn der Immunreaktion verursacht. Im TF-OVA-Modell wurde nachgewiesen, dass CD4⁺ T-Zellen allein keine Hepatitis induzieren, aber sehr wohl eine durch CD8⁺ T-Zellen verursachte Hepatitis verstärken [118].

Die initiale immunologische Störung, die zur Entstehung der AIH führt, bleibt weiterhin ungeklärt. Die Frage, ob ein Antigen mit hepatozellulärem Ursprung primär durch CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen erkannt wird, kann mit dem TF-OVA-Modell untersucht werden. Durch Rag1^{-/-} OT-I-Mäuse und OT-II-Mäuse stehen CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen zur Verfügung, die transgene TZR exprimieren und spezifisch jeweils definierte Ovalbuminsequenzen im Kontext spezifischer MHC-Moleküle erkennen. Für die hier vorliegende Arbeit wurde die Naivität der antigenspezifischen T-Zellen immer durch ihre indirekte Selektion („no-touch“) gesichert und vor Einbringung in die Kulturen über die Messung der Aktivierungsmarker geprüft.

In jeder Untersuchung liefen separate Kontrollen inklusive aller verwendeten Medienzusätze mit, um alle theoretisch möglichen Beeinflussungen und unspezifischen Reaktionen der analysierten T-Zellen zu erkennen bzw. auszuschließen (Abbildung 3.5). Es zeigte sich weder eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen aus C57Bl/6, die mit hepatischen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) aus TF-OVA-Mäusen inkubiert worden waren. Noch proliferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit hepatischen APZ aus C57Bl/6-Mäusen kokultiviert worden waren.

Die isolierten Zellen mehrerer Leberorgane wurden während des Isolationsverfahrens vereinigt. Dadurch können die Ergebnisse unabhängig von intra- und interindividuellen, biologischen Schwankungen interpretiert werden. Somit stellt das verwendete Modell in der *in vitro* Testung ein sicheres Verfahren dar, das die Möglichkeit bietet, CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen gleichermaßen in ihrer Reaktion auf ein endogenes Antigen zu untersuchen und die Ergebnisse statistisch auszuwerten. Jedoch repräsentieren die erhobenen Ergebnisse immer nur die immunologische Interaktion zwischen einer Population hepatischer APZ und einem T-Zellsubtyp. Das Zusammenspiel im physiologischen Zellverband und die Wirkungen des lokalen Zytokinmilieus werden dabei nicht berücksichtigt. Ziel dieser Arbeit war es, die separaten Populationen hepatischer APZ bei der Antigenpräsentation (AGP) gegenüber CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen und dabei professionelle und nicht-professionelle APZ zu vergleichen.

4.3. Die Immunreaktionen von $V\alpha 2^+$ T-Zellen nach Kokultur mit Antigen-präsentierenden Zellen aus TF-OVA-Mäusen

Die hier erhobenen Daten stimmen mit den *in vivo* Ergebnissen des TF-OVA-Modells von Derkow et al. überein, die zeigen, dass antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen, nicht jedoch antigenspezifische $CD4^+$ T-Zellen intrahepatisch durch endogenes Antigen aktiviert werden [101]. Die hier vorgestellten Ergebnisse aus Zellkulturverfahren spezifizieren darüber hinaus die Unterschiede zwischen den professionellen und den nicht-professionellen APZ der Leber. Zum anderen belegt die Aktivierung von OT-II $CD4^+$ T-Zellen nach Präsentation von Antigen des exogenen Ovalbuminprotein die Bedeutung des Ursprungs von Antigenen für die Immunreaktion.

4.3.1. LSEC, KC und DC der Leber aktivieren *in vitro* antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen durch Präsentation eines endogenen Antigens

Nach dem von Janeway begründeten Konzept sind drei aktivierende Signale während der AGP Voraussetzung für eine effektive Aktivierung von naiven T-Zellen (Kapitel 1.5.5.) [40]. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten durchflusszytometrische Analysen der Proliferationen von T-Zellen anhand der Intensität von CFSE und die Analyse der T-Zellaktivierungen über die Expression von CD44 mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper. Die getesteten OT-I $CD8^+$ T-Zellen und OT-II $CD4^+$ T-Zellen wurden für 72h mit hepatischen APZ der Leber kokultiviert. Nach dieser Zeit waren die mit LSEC, KC oder DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen inkubierten antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen proliferiert und aktiviert. Bei jeder der drei hepatischen Zellpopulationen führten höhere Zellzahlen zu einer höheren Proliferation OT-I $CD8^+$ T-Zellen und auch zu einer vermehrten Aktivierung gemessen an der Expression von CD44.

Im Vergleich mit der Proliferationsrate der OT-I $CD8^+$ T-Zellen, die mit KC oder DC der Leber inkubiert waren, lag die Rate der proliferierten OT-I $CD8^+$ T-Zellen, die mit LSEC aus TF-OVA-Mäusen inkubiert waren, niedriger. Das zeigte sich besonders in den Kokulturen mit geringen Zellzahlen ($2,5 \times 10^4$ und 5×10^4 APZ). Die vergleichsweise niedrige Proliferationsrate könnte durch eine geringere Expression von kostimulatorischen Molekülen auf LSEC bedingt sein. Alternativ könnte eine geringere Antigenmenge die Ursache sein, z.B. weil die Phagozytosefähigkeit von LSEC für zelluläre Bestandteile geringer ist als die von KC oder DC der Leber. Dafür sprechen die Ergebnisse von Ruomei et al. und Seternes et al., die zeigen, dass LSEC hauptsächlich lösliche Antigene und Makromoleküle <200 nm endozytotisch aufnehmen (über Stabilin-1 und -2) und weniger partikuläre Bestandteile phagozytieren als bspw. KC [52,128]. Die Tatsache, dass LSEC grundsätzlich zur Phagozytose von Zellfragmenten befähigt sind, wurde durch die Aufnahme von apoptotischen Tumorzellen durch LSEC nachgewiesen [129]. Die mit der hier vorliegenden Arbeit gezeigte antigenspezifische Proliferation und Aktivierung der OT-I $CD8^+$ T-Zellen im TF-OVA-Modell beweist, dass LSEC Hepatozytenfragmente inklusive dem transgenen Ovalbuminprotein aufgenommen und prozessiert haben. Die

Präsentation der spezifischen Antigensequenz im Komplex mit MHC-I entspricht einer Kreuzpräsentation, weil das Protein für LSEC zwar endogen, aber dennoch extrazellulär vorlag. Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von Antigenen wurde für LSEC im Jahr 2000 von Limmer et al. nachgewiesen [56]. Hingegen publizierten Katz et al. anderslautende Ergebnisse: Sie sahen keine Proliferation von OT-I CD8⁺ T-Zellen nach der Inkubation mit murinen LSEC und Ovalbuminpeptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄ Sequenz: SIINFEKL) [55]. Dieses zu unseren Resultaten widersprüchliche Ergebnis kann nicht durch geringere Zahlen APZ (1×10^4) oder zu kürzere Inkubationszeiten (72h) erklärt werden. Das durch Katz et al. verwendete Ovalbuminpeptid bedarf keiner Prozessierung durch LSEC. Die Inkubation der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen mit LSEC in Anwesenheit des Peptids hätte schon für sich genommen zur Proliferation der CD8⁺ T-Zellen führen müssen, da sich CD8⁺ T-Zellen das Peptid gegenseitig präsentieren können [102,138].

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die residenten Makrophagen der Leber, die KC, in besonders hohem Maße zelluläres Material aus dem Blut entfernen [70,77]. Das könnte die relativ hohen Proliferationsraten der OT-I CD8⁺ T-Zellen erklären, die mit KC der TF-OVA-Mäuse inkubiert waren (Abbildung 3.7(A)). Besonders auffällig waren die Unterschiede bei den niedrigsten Zellzahlen: Der Anteil der proliferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen aus der Kokultur mit $2,5 \times 10^4$ KC lag etwa 6- bis 7-mal höher als der Anteil der proliferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit $2,5 \times 10^4$ LSEC oder $2,5 \times 10^4$ DC der Leber inkubiert waren. Bei 5×10^4 KC war der Anteil der proliferierten CD8⁺ T-Zellen noch zweimal so hoch wie der bei den mit DC der Leber inkubierten CD8⁺ T-Zellen. Das lässt eine hohe Aufnahme und Prozessierung des hepatozellulären Ovalbumins vermuten. Die Proliferation und Aktivierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen beweist die Kreuzpräsentation des endogenen Antigens im Komplex mit MHC-I sowie eine ausreichende Kostimulation der CD8⁺ T-Zellen durch KC bei der AGP.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Ebrahimkhani et al. überein [78]. Sie testeten u. a. KC *in vitro* hinsichtlich ihrer Präsentation und Aktivierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels eines Antigens hepatozellulären Ursprungs. Es zeigte sich eine deutliche Proliferation der CD8⁺ T-Zellen als Reaktion auf die Kreuzpräsentation durch KC. Weitere vergleichbare Studien, die ebenfalls im murinen System *in vitro* die Kreuzpräsentation von Antigenen durch KC untersucht haben, finden sich aktuell nicht in der Literatur. Die Arbeiten, die *in vivo* mittels Depletionsversuchen bei Mäusen die Funktion von KC bei der intrahepatischen Antigenpräsentation gegenüber CD8⁺ T-Zellen erforschten, lassen lediglich indirekte Aussagen zu. Einige Arbeiten werden in Kapitel 4.3.2. näher betrachtet.

Auch untersuchte DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen führten *in vitro* durch die Präsentation des endogenen Antigens zur Proliferation und Aktivierung der OT-I CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3.8). Die professionellen Antigen-präsentierenden DC stellen allgemein hin die potentesten Aktivatoren von T-Zellen dar, u. a. weil sie über ausreichend kostimulatorische Moleküle und inflammatorische Zytokine verfügen (Kapitel 1.4.4. und Kapitel 1.5.5.–1.5.7.). Unter Berücksichtigung dieses Potentials zur Induktion von proinflammatorischen Immunreaktionen wirken die Proliferationsraten der OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen inku-

biert waren, verhältnismäßig gering. Proliferation und Aktivierung (gemessen an der Expression von CD44) waren in Abhängigkeit von der Zahl der inkubierten DC zunehmend. Aber die Proliferationen der OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit DC der Leber inkubiert waren, blieb bei allen Zellzahlen im Mittel unter der Proliferationsrate der OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit der gleichen Zahl KC kokultiviert waren. In diesem Zusammenhang erscheinen DC der Leber im Vergleich mit KC weniger effektiv. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Pillarisetty et al. unterstützt, die DC der Leber mit den immunologischen Eigenschaften von DC der Milz verglichen haben [87]. Sie isolierten murine DC aus beiden Organen mittels FACS anhand der Expression CD11c. Sie testeten beide Populationen *in vitro* hinsichtlich ihrer Antigenaufnahme und ihrer Fähigkeit zur T-Zellaktivierung. Sie fanden heraus, dass DC der Leber in vergleichbarer Zeit weniger Antigene phagozytierten und eine geringere T-Zellaktivierung induzierten als DC der Milz. Darüber hinaus war die Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-II^{high} bei ihren Untersuchungen in der hepatischen Zellpopulation wesentlich geringer. Ein geringerer Anteil an MHC-II^{high} DC könnte (zusammen mit der geringeren Expression von kostimulatorischen Molekülen) die durch Pillarisetty et al. gemessene, geringere T-Zellaktivierung durch DC der Leber bedingen. Sie gaben allerdings in ihrer Studie keine konkreten Zahlen für die unterschiedlichen Expressionsmuster und keine Signifikanz an.

In unserem Modell war der Anteil an DC der Leber, der hohe oder intermediäre Level von MHC-II-Molekülen exprimierte, nicht signifikant geringer als der Anteil bei DC der Milz (42,4 % gegenüber 49,2 % MHC-II^{med./high}, Abbildung 3.2, Kapitel 3.2.3. und 3.2.4.). Das ist am ehesten methodisch bedingt, da die FACS der beiden Populationen über die Zellmarker CD11c und MHC-II erfolgte und demnach keine CD11c⁺ MHC-II⁻ Zellen selektiert wurden. Auch Steptoe et al. [83] und O'Connell et al. [91] sowie Plitas et al. [130] wiesen im murinen System nach, dass die Population von DC der Leber einen vergleichsweise geringen Anteil reifer Zellen enthält. Dagegen konnten Bamboat et al. bei dem Vergleich von humanen DC der Leber und DC des peripheren Blutes keine unterschiedlich hohe Expression von MHC-II-Molekülen finden [89]. Sie isolierten DC aus hepatischem Resektionsgewebe und aus peripheren Blutproben der gleichen Patienten. Trotz der übereinstimmenden Expressionslevel von MHC-II-Molekülen durch die beiden Populationen von DC, konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass DC der Leber Antigene in geringerem Maße phagozytierten und prozessierten als DC des peripheren Blutes. Sie hatten dafür die Zellen mit FITC-konjugiertem Dextran und DQ-Ovalbumin (Fluoreszenz nach intrazellulärer, proteolytischer Spaltung) inkubiert und die Fluoreszenz jeweils am Durchflusszytometer analysiert. Zusätzlich erbrachte die Zytokinbestimmung in den Zellkulturen deutlich höhere Mengen des antiinflammatorischen IL-10 in den Überständen von DC der Leber als in den Überständen der DC des Blutes. Damit scheinen die vorrangig tolerogenen Eigenschaften von DC der Leber sowohl im murinen als auch im humanen System bestätigt.

Im TF-OVA-Modell zeigte sich im direkten Vergleich von MHC-II^{high} DC mit der Gesamtpopulation DC der Leber eine signifikant höhere Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen und höhere Expression von CD44, wenn sie mit MHC-II^{high} DC kokultiviert waren. Das beweist, dass die

reifen DC innerhalb der Gesamtpopulation der DC der Leber stärker immunogen bei der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen wirken. Der signifikante Unterschied beschränkte sich jedoch auf die Ansätze mit $2,5 \times 10^4$ APZ. Mit zunehmender Zellzahl verringerte sich der Unterschied bei den proliferierten Fraktionen. Das lässt vermuten, dass bei höheren Zellzahlen die erreichte Proliferation bereits im submaximalen Bereich liegt.

In allen durchgeführten Experimenten wurde separaten Proben mit 5×10^4 APZ aus TF-OVA-Mäusen zusätzlich Ovalbuminprotein zugesetzt, bevor die OT-I CD8⁺ T-Zellen inkubiert wurden (siehe Kapitel 2.2.4.4. und Tabelle 3.2). In diesen Proben war die Proliferation und Aktivierung der OT-I CD8⁺ T-Zellen, gemessen an der Expression von CD44, deutlich höher als in den Kokulturen, in denen ausschließlich das endogene Antigen durch 5×10^4 LSEC, KC und DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen präsentiert wurde. Dass ein zugeführtes, exogenes Antigen *in vitro* eine Reifung von APZ bewirkt und damit deren Fähigkeit, antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren, wurde bereits für DC der Leber von Abe et al. gezeigt [131]. In unserem Modell liegen damit das endogene Antigen vom transgenen Ovalbumin der Hepatozyten und zeitgleich das Antigen vor, das aus dem exogenen Ovalbuminprotein stammt.

Durch die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen mit den hepatischen APZ aus TF-OVA-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass alle drei getesteten APZ im Modus der Kreuzpräsentation mit endogenem Antigen OT-I CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Weil für die Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle eine vorherige Internalisierung und Prozessierung des endogenen, zellulären Ovalbumin durch die APZ stattgefunden haben muss, ist der Ablauf dieser Prozesse durch die erfolgte Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen indirekt bewiesen.

4.3.2. Antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen werden *in vitro* nicht durch endogenes Antigen der Leber aktiviert

Die *in vivo* Untersuchungen im TF-OVA-Modell hatten keine Proliferation der transferierten OT-II CD4⁺ T-Zellen in der Leber gezeigt [101,118]. Um mögliche supprimierende oder regulatorische Mechanismen im Gesamtorganismus auszuschließen, wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die naiven OT-II CD4⁺ T-Zellen *in vitro* jeweils mit einer der drei isolierten Zellpopulationen der Leber aus TF-OVA-Mäusen getestet. Nach dreitägiger Kokultur wurden die T-Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation und Aktivierung anhand der Intensität von CFSE und ihrer Expression von CD44 mittels Durchflusszytometrie analysiert.

LSEC aus TF-OVA-Mäusen führten dabei nicht zu einer Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen in den Kokulturen (Abbildung 3.6). Das endogene Protein wurde zwar von LSEC phagozytiert – das wurde durch die Proliferation von OT-I CD8⁺ T-Zellen indirekt bewiesen. Aber möglicherweise wurde das Protein nach der Phagozytose aufgrund seines Ursprunges oder aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften bei der intrazellulären Prozessierung nicht oder nicht ausreichend auf MHC-II-Moleküle geladen, um eine Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen zu bedingen. Andererseits könnten LSEC nicht genügend kostimulatorische Oberflächenmoleküle exprimieren, was eine Aktivierung der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen verhindern würde.

Nach der Aufreinigung und vor der Kultivierung erfolgte jeweils die Prüfung des Aufreinigungsgrades und der Oberflächenmarker der isolierten NPZ der Leber. Bei LSEC zeigte sich eine Expression von MHC-II bei nur durchschnittlich 2,0% der Zellen. Das steht im Widerspruch zu der Publikation von Limmer et al. [56]. Dort wird einleitend die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen auf LSEC beschrieben und dabei als Quelle eine Arbeit von Knolle et al. von 1999 benannt [123]. In dieser wiederum werden als Quelle zwei Veröffentlichungen angegeben: Eine stammt von Rubenstein et al. aus dem Jahr 1986 - dort wird aber explizit angegeben, dass ein Zellgemisch aus KC und LSEC hinsichtlich der Aktivierung von T-Zellen untersucht wurde („LSLC“ als „liver sinusoidal lining cells“) [132]. Die angegebene Expression von MHC-II bei durchschnittlich 44% der untersuchten Zellen ist aufgrund der hier vorgelegten eigenen Ergebnisse eher den KC im Zellgemisch zuzuschreiben. Dieser Schluss liegt nahe, weil sich auch in der anderen von Knolle et al. benannten Veröffentlichung aus dem Jahr 1991 (Scoazec und Feldmann) kein Hinweis auf eine signifikante Expression von MHC-II bei LSEC finden lässt [133]. Es wurde dort durch immunhistochemische Färbungen an humanen Kryostatproben von Leberresektionen bei LSEC nur in wenigen Fällen eine sehr schwache Expression von MHC-II sichtbar. Konkrete Zahlen finden sich nicht in dieser Arbeit. Ferner wurde in der Publikation von Knolle et al. selbst [123] der Phänotyp von murinen LSEC mittels Durchflusszytometrie bestimmt und die Expression von MHC-II-Molekülen lediglich im Vergleich mit DC als „geringer“ angegeben. Konkrete Zahlen zur Expression oder Abbildungen der durchflusszytometrischen Analysen finden sich auch in dieser Arbeit nicht. Darüber hinaus wurde nicht offengelegt, ob auch Gegenprüfungen hinsichtlich verunreinigender Zellen innerhalb der Population von aufgereinigten LSEC erfolgt sind. Die Isolation der LSEC wurde durch Knolle et al. mit Hilfe der Dichtegradienten- und Gegenstromzentrifugation durchgeführt. Zwei Verfahren, die laut Katz et al. nicht berücksichtigen, dass LSEC bei gleicher Zellgröße wie DC innerhalb derselben Schicht aufgetrennt werden [55]. Katz et al. erweiterten daher das Standardprotokoll und nutzten die MACS im Anschluss an die hydrolytische Spaltung und Dichtegradientenzentrifugation. Die MACS erfolgte anhand von CD45 als Negativselektion, um Leukozyten zu entfernen. Auch wenn Katz et al. keine konkreten Zahlen für die anschließende Reinheit der Zellpopulationen angegeben haben, ihre Phänotypanalysen mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-markierter Antikörper ergaben die Expression von MHC-I, nicht aber von MHC-II oder kostimulatorischen Molekülen durch LSEC. Eine Proliferation von transgenen CD4⁺ T-Zellen konnten Katz et al. durch Kokultur mit LSEC und in Anwesenheit von exogenem Ovalbumin nicht nachweisen. Es bleibt zu berücksichtigen, dass im gleichen Versuchsansatz von Katz et al. auch die antigenspezifischen OT-I CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit des Ovalbuminpeptids mit LSEC nicht proliferiert sind. Dieses Resultat stimmt mit unseren Ergebnissen nicht überein und kann methodisch aus unserer Sicht nicht nachvollzogen (in Kapitel 4.3.1. dargelegt, Seite 61).

Ein grundlegender Unterschied in der Untersuchung der LSEC hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur T-Zellaktivierung liegt im Vergleich zu unserem Modell bei Knolle et al. häufig in der Ver-

wendung von CD4⁺ Effektorzellen [59,61,123]. Die Th1-Zellen vom Klon LNC.2.F1 wurden *in vitro* mit LSEC und in Anwesenheit des für sie spezifischen Antigens PPD getestet. In einigen Untersuchungen, in denen naive, transgene CD4⁺ T-Zellen (6.5⁺) untersucht wurden, waren diese aber zeitgleich mit dem für sie spezifischen Antigen Hämagglutinin (Membranprotein des Influenzavirus) und LSEC inkubiert [61,123]. In diesen Studien lag das Antigen in exogener Form mit viralem Ursprung vor. Damit ist ein zum endogenen Antigen (im TF-OVA-Modell) differenter, intrazellulärer Prozessierungsweg und eine mögliche Aktivierung der APZ mit Stimulation einer Zytokinsekretion während der Antigenpräsentation nicht auszuschließen. Bei der durch Kruse et al. *in vitro* nachgewiesenen Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit LSEC wurde mit exogenem Peptid stimuliert, so dass keine Phagozytose und Prozessierung des Antigens erfolgen muss und dieser Teil der Funktionalität der LSEC unberücksichtigt bleibt [58].

Unter den getesteten APZ der Leber zeigten in unseren Messungen KC die stärkste Expression von MHC-II-Molekülen. Dies stimmt zunächst einmal mit den Ergebnissen von You et al. überein [33]. Sie haben durchflusszytometrisch eine deutliche Expression von MHC-II bei KC nachgewiesen, die auch höher war als die Expression bei DC der Leber. You et al. kultivierten murine KC und naive OT-II CD4⁺ T-Zellen zusammen mit OVA-Peptid. Dennoch resultierte in ihren Untersuchungen nur eine geringe Proliferation der CD4⁺ T-Zellen. Trotz der Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen auf KC wurde keine effektive Aktivierung der T-Zellen erzielt. Auch ein regulatorischer Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen konnte nicht gesichert werden. Das Forscherteam vermutete u. a., dass sich KC nach dem Isolationsverfahren in einem nicht aktivierten Zustand befanden und daher als unreife APZ zur Anergie der T-Zellen führten. Zur weiteren Differenzierung gaben sie den Kulturen der KC Polyinosinic-Polycytidylic-Säure (Poly I:C,) in das Medium, um eine virale Infektion zu imitieren und eine Aktivierung der KC zu erreichen. Dies führte zur höheren Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen bei KC und auch zu einer stärkeren Proliferation der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen mit OVA-Peptid.

In unserem TF-OVA-Modell mit dem endogenen Antigen (ohne Zusatz von Ovalbuminprotein) zeigte sich nur in den Kokulturen mit der höchsten Zellzahl von KC eine minimale Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen. Diese war so diskret, dass sie in Relation zu der Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen eher unwesentlich erscheint. Dieser fehlende Proliferationsreiz für OT-II CD4⁺ T-Zellen durch KC mit endogenem Ovalbumin und die auch vergleichsweise geringe Proliferation mit exogenem Ovalbuminprotein (TF-OVA-Modell) oder -peptid (You et al.) in Kokulturen mit KC sprechen dafür, dass KC im nicht inflammatorischen Kontext einen tolerogenen oder anergisierenden Effekt bei der AGP haben. You et al. wiesen *in vitro* sogar eine aktive Suppression der CD4⁺ T-Zellproliferation durch KC nach [33]. Aktivierende Reize wie Infektionen scheinen eine Reifung der KC zu induzieren, der dann eine veränderte AGP mit immunogener T-Zellaktivierung folgt [75,80].

Auch im humanen System gibt es Hinweise auf die gegensätzlichen Effekte der KC im

Rahmen der AGP: Burgio et al. untersuchten mittels immunhistochemischer Färbungen von Leberbiopsien den Phänotyp von KC. Dabei zeigte sich bei Patienten mit HCV-Infektion ein reifer Phänotyp der KC mit deutlich höherer Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD40 [80]. Demgegenüber wurde anhand von isolierten KC aus humanen Leberresektaten nachgewiesen, dass KC mit der Sekretion von IL-10 entscheidend zum tolerogenen Milieu der Leber beitragen. Nach der *in vitro* Stimulation der KC mit LPS lagen in den Überständen erhöhte Mengen von IL-10 vor [73]. LPS dient dabei als Beispiel für die Endotoxinwirkung des *in vivo* an Bestandteilen der kommensalen Darmflora reichen Pfortaderblutes (siehe Kapitel 1.5.8.).

In unserem Modell entfernten wir bei den mit exogenem Ovalbuminprotein versetzten Proben nicht phagozytiertes Protein jeweils vor der Inkubation der T-Zellen (Kapitel 2.2.4.4.). Genau in diesen Ansätzen zeigte sich eine je nach hepatischer Zellpopulation unterschiedlich starke Proliferation und Aktivierung der OT-II CD4⁺ T-Zellen: Durch LSEC stimulierte OT-II CD4⁺ T-Zellen zeigten nur eine unwesentliche Proliferation; durch KC stimulierte OT-II CD4⁺ T-Zellen zeigten dagegen eine deutliche Proliferation, die aber noch von der Proliferationsrate der OT-II CD4⁺ T-Zellen übertroffen wurde, die mit DC der Leber inkubiert waren (jeweils nach Vorinkubation mit exogenem Ovalbuminprotein). Dies beweist, dass das exogene Protein bei professionellen APZ nach Phagozytose und Prozessierung in dem notwendigen Maße auf MHC-II-Moleküle geladen wird und mit ausreichenden kostimulatorischen Signalen präsentiert wird, dass es zu einer Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen kommen konnte. Es wurde jedoch nicht differenziert, ob und welcher Effektorphänotyp durch diese Aktivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen induziert wurde. Außerdem muss dabei berücksichtigt werden, dass bei diesen konkreten Experimenten durch APZ der Leber aus TF-OVA-Mäusen, das Antigen nach der Vorinkubation mit Ovalbuminprotein aus endogenem und exogenem Ursprung vorlag.

Im TF-OVA-Modell stellte sich bei DC der Leber hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Aktivierung von OT-II CD4⁺ T-Zellen durch ein endogenes Antigen ein ähnliches Bild dar wie bei KC: Es resultierten nur in den Ansätzen mit der höchsten Zellzahl von DC minimale Proliferationen der OT-II CD4⁺ T-Zellen. Die Proliferation war im Durchschnitt wiederum so gering, dass sie im Vergleich zu der Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen unerheblich erscheint. Die fehlende Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen aus der Kokultur mit DC der Leber kann aber nicht durch eine zu kurze Inkubationszeit bedingt sein, da im gleichen Inkubationszeitraum die OT-II CD4⁺ T-Zellen der Positivkontrolle (1×10^5 T-Zellen mit 2×10^5 sublethal bestrahlten Milzzellen und Ovalbuminprotein) deutlich proliferierten. Außerdem führte exogenes Ovalbuminprotein als Vorinkubation der DC in der gleichen Zeit zu einer starken Proliferation und Aktivierung der OT-II CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.8). Wie bereits in Kapitel 4.3.1. ausgeführt, konnten Abe et al. *in vitro* zeigen, dass sich durch die Zufuhr eines exogenen Antigens die Expression von MHC-II-Molekülen und von kostimulatorischen Molekülen auf murinen DC der Leber erhöht [131]. Weiterführend war in ihrer Studie in den Proben mit exogenem Antigen das Ausmaß der T-Zellaktivierung erhöht, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt

und die gesteigerte Proliferation der CD4⁺ T-Zellen durch die Zugabe von exogenem Protein erklären könnte.

Die Expression von MHC-II-Molekülen durch DC der Leber wurde in unserem Modell vor der Inkubation gemessen. Sie war geringer als die Expression von MHC-II durch KC und entspricht damit den Messergebnissen von You et al. [33]. Darüber hinaus exprimierte innerhalb der hepatischen Population von DC der TF-OVA-Mäuse ein vergleichsweise geringer Anteil MHC-II^{med./high}. Das wurde auch von Steptoe et al. an Mäusen durch die immunhistochemische Analyse verschiedener Organe belegt [83]. Es resultierte dabei im Vergleich mit Herz, Nieren und Pankreas in der Leber die geringste Dichte an MHC-II^{med./high} DC. Im direkten Vergleich mit DC der Milz sahen Pillarisetty et al. eine geringere Expression von MHC-II^{high} bei DC der Leber [87]. Wie bereits in Kapitel 4.3.1. (Seite 62) dargestellt, konnte die Forschergruppe *in vitro* nachweisen, dass die Gesamtpopulation der DC mit ihrem überwiegend unreifen Phänotyp eine geringere T-Zellaktivierung induzierte als DC der Milz im gleichen Versuchsansatz. Mit Blick auf das humane System wurde ebenfalls in Kapitel 4.3.1. die Arbeit von Bamboat et al. diskutiert [89]. Die Arbeitsgruppe hatte nachgewiesen, dass DC der Leber deutlich weniger Antigene phagozytierten als DC des peripheren Blutes. Nach Inkubation der beiden dendritischen Zellpopulationen mit Peptiden aus CMV, EBV und Influenzavirus sowie des Tetanustoxins untersuchten sie in Kokulturen mit autologen CD4⁺ T-Zellen deren Proliferation und Effektorstatus. Dabei zeigte sich, dass DC der Leber eine mäßige Proliferation der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen induzierten und dabei in Abhängigkeit von sezerniertem IL-10 ein regulatorischer CD4⁺ Subtyp (CD25⁺ FoxP3⁺) resultierte. Die Autoren schlussfolgerten aufgrund dieser Ergebnisse, dass DC der Leber durch ihren tolerogenen Effekt auf T-Zellen dazu beitragen, übermäßige Immunreaktionen auf Antigene des Portalblutes zu begrenzen.

Der Reifestatus einer DC während der AGP beeinflusst die immunologische Reaktion der antigenspezifischen T-Zelle. Daher ist es denkbar, dass auch im TF-OVA-Modell nicht aktivierte KC und DC der Leber nach der Vorinkubation mit Ovalbuminprotein durch eine unzureichende Stimulation während der Antigenpräsentation die OT-II CD4⁺ T-Zellen zwar aktivierten, aber eine antigenspezifische Anergie oder AICD induzierten. Eine Differenzierung des CD4⁺ T-Zellstatus (Effektorfunktion oder AICD) ist in den vorliegenden Untersuchungen aber nicht erfolgt. Zusammengefasst wurde mit dem TF-OVA-Modell *in vitro* und *in vivo* [101,118] nachgewiesen, dass keine antigenspezifische Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen durch ein endogenes von NPZ der Leber präsentiertes Antigen erfolgt.

4.3.3. Nur professionelle Antigen-präsentierende Zellen der Leber führen zu einer effektiven Aktivierung von OT-I CD8⁺ T-Zellen

Die *in vitro* Untersuchungen mit den isolierten NPZ der Leber im TF-OVA-Modell haben gezeigt, dass LSEC, KC und DC antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Es resultierte bei jeder der drei Zellpopulationen eine deutliche, mit zunehmender Zahl der APZ auch steigende Proliferationsrate der OT-I CD8⁺ T-Zellen. Doch zur Induktion einer Effektorfunktion werden

laut Janeway während des „priming“ von T-Zellen auch aktivierende Zytokine als drittes Signal benötigt (Kapitel 1.5.5.). Um zu differenzieren, ob im TF-OVA-Modell *in vitro* CD8⁺ Effektorzellen generiert wurden, erfolgte nach dreitägiger Inkubation die Analyse der Überstände hinsichtlich des Vorkommens von IFN- γ (siehe Kapitel 2.2.5. und 3.7.2.). Dabei beschäftigte sich eine zentrale Frage dieser Untersuchungen mit den möglichen Unterschieden bei der antigenspezifischen T-Zellaktivierung durch nicht-professionelle APZ gegenüber professionellen APZ.

Unter den gegebenen Kulturbedingungen zeigte sich, dass LSEC im Vergleich zu den professionellen APZ eine geringere Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen und geringere Expression von CD44 induzierten (siehe Kapitel 3.7.1.). Vor allem bei niedrigen Zellzahlen waren diese Unterschiede signifikant. Darüber hinaus konnte weder in den Kulturen der OT-I CD8⁺ T-Zellen mit LSEC aus TF-OVA-Mäusen noch in den Ansätzen mit zusätzlicher Vorinkubation von Ovalbuminprotein das Effektorzytokin IFN- γ nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Damit wurde gezeigt, dass LSEC das transgene Ovalbuminprotein mit Zellfragmenten der Hepatozyten aufgenommen und prozessiert haben; dass es als für LSEC extrazelluläres aber endogenes Protein im Modus der Kreuzpräsentation auf MHC-I-Moleküle geladen und gegenüber naiven OT-I CD8⁺ T-Zellen präsentiert wurde. Die durchflusszytometrisch gesicherte Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen beweist diese Prozesse indirekt. Die Proliferation und Aktivierung (gemessen an der Expression von CD44) führte aber nicht zur Produktion des Effektorzytokins IFN- γ .

Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten von Limmer et al. und von Oppen et al. überein. Sie zeigen jeweils, dass Mäusen p. o. oder i. v. appliziertes Ovalbumin durch LSEC aufgenommen wurde und im Modus der Kreuzpräsentation zur Proliferation von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen führt. Darüber hinaus wiesen die T-Zellen dann aber keine Effektorfunktion auf [51,57]. Dabei hatten von Oppen et al. antigenpräsentierende LSEC mit OT-I CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und die Überstände der Zellkulturen untersucht – es zeigte sich ebenfalls keine Sekretion von IFN- γ [57]. Berg et al. konnten einen toleranten Phänotyp von CD8⁺ T-Zellen nachweisen, die durch LSEC geprägt worden waren [129]. Die Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe von Tumorzellen im murinen System belegen, dass LSEC (Tumor-) Zell-assoziierte Antigene aufnehmen und kreuzpräsentieren (in Kapitel 4.3.1., Seite 60 beschrieben). Außerdem konnten sie *in vitro* zeigen, dass kokultivierte, antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen nach der Erkennung ihres spezifischen Antigen-MHC-I-Komplexes auf LSEC in einen toleranten Status übergehen. Nach fünftägiger Kokultur wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse von CFSE eine starke Proliferation der CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus resultierte aber kein Nachweis von IFN- γ bei der intrazellulären Färbung der CD8⁺ T-Zellen. Wurde aber unter den gleichen Kulturbedingungen das Tumorzell-assoziierte Antigen durch DC der Milz präsentiert, zeigte sich eine deutliche Expression von IFN- γ bei CD8⁺ T-Zellen.

Ein anders lautendes Ergebnis haben Ebrahimkhani et al. 2011 veröffentlicht [78]: Laut ihren Untersuchungen können auch LSEC *in vitro* eine effektive Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen mit Sekretion von IFN- γ induzieren. Sie hatten ein Verfahren vorgestellt, mit dem sie durch Dichtegradientenzentrifugation, MACS und FACS zeitgleich Hepatozyten, Ito-Zellen, LSEC

und KC isolieren können. CD8⁺ T-Zellen, die mit LSEC inkubiert waren, wiesen bei der intrazellulären Färbung geringe Mengen IFN- γ auf. Unter Betrachtung des Isolationsverfahrens fällt auf, dass in keinem der Arbeitsschritte DC der Leber entfernt wurden. Katz et al. [55] hatten bereits kritisiert, dass sich bei der Dichtegradientenzentrifugation DC und LSEC aufgrund derselben Zellgröße innerhalb einer Schicht konzentrieren (Kapitel 4.3.2., Seite 64). Ebrahimkhani et al. veröffentlichten keine Zahlen zu Reinheitsgraden der Zellpopulationen oder Angaben, ob eine Prüfung hinsichtlich möglicher Kontaminationen nach der Aufreinigung erfolgt ist. Daher erscheint eine Verunreinigung von LSEC durch DC oder KC aufgrund der FACS-basierten Selektion über CD11b möglich. Das könnte den Nachweis von geringen Mengen IFN- γ bei CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch die Fraktion der LSEC erklären.

Die Aktivierung der OT-I CD8⁺ T-Zellen durch LSEC ohne nachfolgende Effektorfunktion könnte aber auch bedeuten, dass es *in vitro* zu einer gegenseitigen Inhibition oder AICD der OT-I CD8⁺ T-Zellen gekommen ist, wie bei den Untersuchungen von Rossum et al. [110] und den histologischen Untersuchungen von Fox et al. [134]. Um das aber bei den *in vitro* Untersuchungen in unserem TF-OVA-Modell zu differenzieren, hätten zusätzliche intrazelluläre Färbungen z. B. der Caspase 8 vorgenommen werden müssen. So bleibt aktuell ungeklärt, ob für eine effektive Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch LSEC nicht genügend Aktivierungssignale vorlagen (aufgrund des endogenen Ursprungs des Antigens) oder ob der AICD induziert wurde.

Durch die *in vivo* Untersuchungen an Knochenmark-Chimären im TF-OVA-Modell (β 2m^{-/-}→TF-OVA Chimären) wurde nachgewiesen, dass die effektive Aktivierung der naiven OT-I CD8⁺ T-Zellen durch APZ der Leber erfolgt, die vom Knochenmark abstammen [118]. Dieses Resultat wird durch die Zytokinmessungen aus den Überständen der Kokulturen mit LSEC bestätigt. Weiterhin konnte durch die hier vorliegenden Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen nun genauer differenziert werden, welche der hepatischen Knochenmark-abhängigen Zellen durch die Präsentation von Antigen des endogenen Ovalbuminproteins die effektive Aktivierung der naiven OT-I CD8⁺ T-Zellen induziert.

Grundsätzlich sind für KC sowohl inflammatorische als auch antiinflammatorische Effekte in der Literatur beschrieben [72,73,74,75]. Bei den Untersuchungen von Ebrahimkhani et al. resultierte bei der *in vitro* Testung mit verschiedenen APZ der Leber und CD8⁺ T-Zellen eine deutliche Proliferation der T-Zellen, wenn sie mit KC kokultiviert wurden [78]. Sie verwendeten ein Antigen hepatozellulären Ursprungs und konnten durch die intrazelluläre Färbung auch IFN- γ in den CD8⁺ T-Zellen und damit eine effektive Aktivierung durch KC nachweisen. Das stimmt mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Untersuchungen in unserem TF-OVA-Modell überein. Mittels ELISA konnten in den Überständen der Kokulturen von KC und CD8⁺ T-Zellen nach dreitägiger Inkubation geringe Mengen IFN- γ nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Einerseits beweist das, dass KC grundsätzlich zur Induktion einer zytotoxischen Effektorfunktion in naiven CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind. Andererseits erscheint die Menge des Effektorzytokin in Relation zu der hohen Proliferationsrate der OT-I CD8⁺ T-Zellen doch sehr gering: Im Vergleich

mit den OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit DC der Leber inkubiert waren, hatten die OT-I CD8⁺ T-Zellen aus den Kokulturen mit KC die höchste Proliferation und Expression von CD44, wiesen dabei aber die geringste Sekretion von IFN- γ auf. Besonders interessant erscheint hierbei, dass in den Überständen der Ansätze mit KC, die mit exogenem Ovalbuminprotein vorinkubiert waren, weniger IFN- γ enthalten war als in den Ansätzen mit ausschließlich endogenem Antigen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Vorliegen von zusätzlichem Antigen exogenen Ursprungs zu einer reduzierten Immunreaktion der CD8⁺ T-Zellen führt. Dieser Effekt erinnert an die *in vivo* Untersuchungen von Kuniyasu et al. [135]. Sie konnten an Mäusen zeigen, dass KC durch ihre Präsentation von exogenem Ovalbuminpeptid (SIINFEKL) in der Leber die Proliferation und Aktivierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen reduzieren. In CSF-1 defizienten Mäusen, die keine reifen KC aufweisen, war die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen in der Leber dagegen verstärkt. Ju et al. konnten ebenfalls in einem murinen Modell anhand von Depletionsversuchen *in vivo* den tolerogenen Effekt von KC nachweisen [136]. Sie untersuchten Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ und stellten fest, dass die Depletion von KC (durch i. v. applizierte Clodronat-Liposomen) zu einer verstärkten Sensitivitätsreaktion führte. Bei Traeger et al. zeigten sich innerhalb eines Untersuchungsansatzes die vielschichtigen bis widersprüchlichen Funktionen der KC bei Entzündungen [137]. In einem Mausmodell der polymikrobiellen Abdominalsepsis reduzierte die *in vivo* Depletion von KC einerseits die hepatische Inflammation und Apoptose. Aber andererseits sank auch die Konzentration von IL-10 in der Leber und im Plasma und auch die Überlebensrate der Mäuse sank.

Im TF-OVA-Modell könnte die hohe Proliferation der OT-I CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch KC möglicherweise aus ihrer vergleichsweise hohen Phagozytoseaktivität für Zellfragmente im Vergleich zu LSEC und DC resultieren. Die auffällig geringe Konzentration von IFN- γ in den Überständen der durch KC aktivierten CD8⁺ T-Zellen wäre dann den tolerogenen Eigenschaften der KC zuzuschreiben. Jedoch waren die Varianzen in den Konzentrationen von IFN- γ so groß, dass das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde – weder im Vergleich zwischen den APZ mit endogenem Antigen noch im Vergleich innerhalb einer Leberzellpopulation mit endogenem Antigen gegenüber zusätzlichem exogenem Antigen.

Vergleichbare *in vitro* Untersuchungen zur Antigenpräsentation durch murine KC wie in unserem TF-OVA-Modell mit einem endogenen Antigen finden sich aktuell nicht in der Literatur. Demgegenüber liegen aber Untersuchungen zu DC der Leber vor, die sich gut mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit vergleichen lassen: Die Arbeit von Pillarisetty et al. wurde bereits in den Kapiteln 4.3.1. (Seite 62) und 4.3.2. (Seite 66) diskutiert [87]. Die Autoren testeten ebenfalls *in vitro* die Reaktion von murinen T-Zellen auf durch DC der Leber präsentierte Antigene. Sie beobachteten nicht nur eine Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen sondern konnten auch IFN- γ in den Überständen der Kokulturen nachweisen. Die Konzentration des IFN- γ war in ihren Untersuchungen um ein Vielfaches geringer als in unseren Ansätzen, was a. e. durch die deutlich geringere Zahl von DC pro Kulturansatz bei Pillarisetty et al. bedingt ist.

Wie bereits beschrieben, war im TF-OVA-Modell auffällig, dass OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit DC der Leber inkubiert waren, im gleichen Versuchszeitraum eine geringere Proliferation aufwiesen, als OT-I CD8⁺ T-Zellen, die mit KC inkubiert waren. Demgegenüber war aber die Konzentration des Effektorzytokins IFN- γ bei den Kokulturen mit DC höher als bei den Kokulturen mit KC. Durch die Zugabe des Ovalbuminproteins in die entsprechenden Kulturansätze mit DC der Leber stieg die Konzentration des IFN- γ noch um ein Vielfaches an. Diese Steigerung der Effektorfunktion durch ein exogenes Antigen ist gut mit einer dadurch induzierten Reifung der DC zu erklären. Eine solche Zunahme des Reifestatus von DC wurde bereits von Abe et al. mit der durchflusszytometrischen Analyse des kostimulatorischen Moleküls CD86 und auch der Expression der MHC-II-Moleküle beschrieben [131].

Auch die Untersuchungsergebnisse von Plitas et al. an murinen DC stimmen mit den hier vorgelegten *in vitro* Ergebnissen im TF-OVA-Modell überein. Die Arbeitsgruppe hatte nachgewiesen, dass DC der Leber die entscheidende Zellpopulation unter den NPZ repräsentieren, um eine effektive Immunantwort bei CD8⁺ T-Zellen zu induzieren [130]. Ebenfalls mit Hilfe des Modellantigens Ovalbumin konnten sie nach der *in vitro* Prägung von naiven OT-I CD8⁺ T-Zellen durch DC der Leber eine antigenspezifische Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen nachweisen. Darüber hinaus konnten sie diesen Effekt auch *in vivo* zeigen: Nach der Depletion von CD11c⁺ DC (durch Diphtherie-Toxin in CD11c-DTR-Mäusen) resultierte nur noch ein minimaler Prozentsatz an IFN- γ positiven CD8⁺ T-Zellen in der Leber. Die T-Zellen waren den Mäusen i. v. vor dem Ovalbumin appliziert worden und nach drei Tagen aus der Leber reisoliert und mittels intrazellulärer Färbung auf IFN- γ untersucht worden. Damit scheint unabhängig von der Antigenquelle (endogen oder exogen), die Fähigkeit von DC der Leber zur Induktion von antigenspezifischen Immunreaktionen bei CD8⁺ T-Zellen, zumindest im murinen Modell, bewiesen.

4.3.4. Dendritische Zellen der Leber induzieren geringere T-Zellaktivierungen als Dendritische Zellen der Milz

Um die AGP durch die NPZ der Leber genauer zu charakterisieren, sollten DC der Leber mit DC anderer Organe verglichen werden. Dazu nutzten wir die Migrationseigenschaften dieser Zellpopulation, die aus der Leber auch in die Milz migriert. In diesem lymphatischen Organ treffen DC aus verschiedenen Ursprungsorganen zusammen und können dort ihr Antigen präsentieren [40].

Anhand der Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen im TF-OVA-Modell konnte auch *in vitro* nachvollzogen werden, dass ein Teil DC der Leber nach der Aufnahme des hepatozellulären, transgenen Ovalbuminproteins in die Milz zirkuliert ist. Alternativ könnte das Antigen auch in löslicher Form in die Milz gelangt und dort von ortsständigen DC aufgenommen und prozessiert worden sein. DC wurden aus den Milzen der TF-OVA-Mäuse ebenfalls über die Anfärbung ihres Oberflächenmarkers CD11c mittels FACS isoliert (Kapitel 2.2.2.2. und 3.2.4.). Die Untersuchungsbedingungen waren äquivalent zu denen APZ der Leber: Nach dreitägiger Kokultur mit antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen wurde deren Proliferation

anhand der Intensität von CFSE und deren Aktivierung anhand der Expression von CD44 durchflusszytometrisch analysiert.

Besonders auffällig war, dass DC der Milz aus TF-OVA-Mäusen auch eine Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen induzierten (Abbildung 3.10, Kapitel 3.6.3.). Das stimmt mit den *in vivo* Ergebnissen im TF-OVA-Modell überein [101,118]. Die Auffälligkeit bei den Kulturergebnissen lag dabei in der Höhe der Proliferation vor allem unter dem Aspekt, dass in der Gesamtheit von DC der Milz eine wesentlich geringere Zahl das Antigen aus dem transgenen Ovalbuminprotein präsentieren dürfte, weil viele DC aus anderen Organen stammen und andere Antigene präsentieren. Das heißt, dass bei der gleichen Zahl inkubierter DC der Milz die effektive Zahl von MHC-II-Molekülen mit spezifischer Peptidsequenz aus dem Ovalbuminprotein wesentlich geringer sein dürfte als bei der gleichen Zahl inkubierter KC oder DC der Leber. Die resultierende Proliferation und Expression von CD44 der OT-II CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit DC der Milz aus TF-OVA-Mäusen ist somit noch deutlich höher zu bewerten.

Der Anteil MHC-II^{med./high} DC in der Milzpopulation unterschied sich nur geringfügig vom Anteil MHC-II^{med./high} DC in der Leberpopulation (siehe Kapitel 3.2.4. und 4.3.1.). Die Proliferationsrate der OT-II CD4⁺ T-Zellen aus den Kokulturen mit DC der Milz war aber mehr als viermal höher als die Rate der OT-II CD4⁺ T-Zellen, die mit DC der Leber inkubiert waren. Das könnte darauf hindeuten, dass die höhere Proliferation und höhere Expression von CD44 der T-Zellen nicht so sehr durch den Reifegrad der DC als vielmehr durch das sie umgebende Zytokinmilieu verursacht ist bzw., dass die Dichte der Expression von MHC-II den Reifegrad von DC nur unvollständig widerspiegelt.

Bei den OT-I CD8⁺ T-Zellen zeigte sich beim Vergleich von DC der Leber mit DC der Milz kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der induzierten Proliferation. Dennoch war die Konzentration von IFN- γ in den Überständen von DC der Milz fast doppelt so hoch wie in den Überständen von DC der Leber. Pillarisetty et al. untersuchten ebenfalls diese beiden Subpopulationen von DC und kamen zum gleichen Ergebnis: In den Überständen der Kokulturen von DC der Leber mit T-Zellen fand sich ca. ein Fünftel weniger IFN- γ als in den Überständen der Kokulturen mit DC der Milz [87]. Ebenso war die Proliferationsrate der T-Zellen um ein Drittel niedriger als mit DC der Milz. Die Autoren analysierten zusätzlich die Phänotypen der DC: Die plasmazytoiden DC, gekennzeichnet durch die Expression von B220⁺ und Sekretion von IFN- α , machten innerhalb der DC-Population der Leber 19 % aus, innerhalb der DC-Population der Milz dagegen nur 5 %. Eine solche Phänotypenanalyse zur weiteren Differenzierung der APZ und der unterschiedlichen T-Zellaktivierungen ist in der hier vorliegenden Arbeit nicht erfolgt.

Dennoch wird durch die *in vitro* Ergebnisse im TF-OVA-Modell ersichtlich, dass DC der Milz durch die Präsentation eines endogenen, Hepatozyten-spezifischen Antigens naive CD8⁺ T-Zellen effektiver aktivieren können als DC der Leber. Im Umkehrschluss wird damit deutlich, dass DC der Leber bei der AGP gegenüber T-Zellen weniger stark aktivierend wirken als DC der Milz.

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lassen all diese Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen am TF-OVA-Modell folgende Schlussfolgerungen zu, die zumindest im nicht inflammatorischen Kontext in der Maus gelten:

- (1) Ein endogenes Antigen wie das transgene Ovalbumin der Hepatozyten wird von LSEC, KC und DC der Leber phagozytiert, prozessiert, auf MHC-I geladen und für CD8⁺ T-Zellen präsentiert, was zur Proliferation der CD8⁺ T-Zellen führt.
- (2) Von den untersuchten Leberzellen induzierten nur KC und DC als professionelle APZ dabei eine Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen mit Sekretion von IFN- γ . LSEC vermochten dies nicht.
- (3) Ein endogenes Antigen wie das transgene Ovalbumin führt nach der Aufnahme und Prozessierung durch LSEC, KC oder DC der Leber NICHT zu einer nennenswerten Aktivierung von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen.
- (4) Das Ovalbuminprotein als exogenes, extrazelluläres Molekül wird dagegen nach der Phagozytose und Prozessierung durch LSEC, KC und DC der Leber sowohl auf MHC-I als auch auf MHC-II geladen. Die Präsentation gegenüber antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen sowie gegenüber antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen führt zur Proliferation dieser T-Zellen.

Damit haben die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zunächst mal die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen an diesem Tiermodell mit anderen Methoden bestätigt [118]: Nach dem adoptiven Transfer von naiven OT-I CD8⁺ T-Zellen in TF-OVA-Mäuse waren diese T-Zellen in die Leber migriert und dort aktiviert worden. Transferierte naive OT-II CD4⁺ T-Zellen waren dagegen hauptsächlich in die Milz migriert und dort aktiviert worden, jedoch nicht in der Leber. Die Aktivierung der antigenspezifischen OT-I CD8⁺ T-Zellen war nur dann effektiv, wenn Knochenmark-abhängige APZ der Leber das Antigen dargeboten haben. Welche der beiden Knochenmark-abhängigen Zelltypen, KC oder DC, für die effektive Aktivierung der OT-I CD8⁺ T-Zellen mit Bildung von ZTL verantwortlich ist, konnte jedoch *in vivo* nicht geklärt werden. Die jetzt vorliegenden Ergebnisse der einzeln getesteten Populationen deckten auf, dass sowohl KC als auch DC mit der Präsentation eines endogenen, hepatozellulären Antigens spezifisch und effektiv CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Dabei deutete sich eine Dominanz der DC bei der Induktion der Sekretion von IFN- γ an. Die Konzentration des IFN- γ in den Überständen der Kokulturen mit DC war jedoch nicht signifikant höher als in den Überständen der Kokulturen mit KC. Es stellt sich nun die Frage, wie sich die Effekte der AGP durch diese Leberzellen im inflammatorischen Kontext verändern. Möglicherweise sind auch die bekannten Subtypen von KC (M1 proinflammatorisch, M2 antiinflammatorisch, Kapitel 1.4.3.) und auch der DC (lymphoid, myeloid, plasmazytoid, Kapitel 1.4.4.) für konträre Effekte bei der AGP verantwortlich und möglicherweise verschieben sich Anteile der Subtypen unter inflammatorischen

Bedingungen. Ein inflammatorisches Umfeld könnte auch bewirken, dass sich der Differenzierungsstatus von LSEC verändert, was wiederum Konsequenzen für die Aktivierung von T-Zellen haben dürfte.

Daraus ergibt sich als möglicher Versuchsansatz, APZ aus TF-OVA-Mäusen zu isolieren und in Kokulturen zu testen, nachdem in den Mäusen durch adoptiven Transfer von OT-I CD8⁺ T-Zellen eine Hepatitis induziert wurde. Resultiert dann auch eine effektive Aktivierung von OT-I CD8⁺ T-Zellen durch LSEC oder sogar eine Aktivierung von OT-II CD4⁺ T-Zellen durch das endogene Antigen aus dem inflammatorischen Kontext? Dieser Kontext könnte im Rahmen von Zellkulturuntersuchungen auch durch die Zugabe von IFN- γ oder anderer proinflammatorischer Substanzen geschaffen werden. Durch Abe et al. wurde nachgewiesen, dass die Expression von MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen durch DC unter inflammatorischen Bedingungen erhöht ist [131]. Möglicherweise wird dann eine Aktivierungsschwelle für OT-II CD4⁺ T-Zellen überschritten und es folgt eine effektive Aktivierung. *In vivo* könnte das bedeuten, dass im Rahmen von Leberentzündungen durch die Aktivierung der APZ mit Erhöhung der Dichte von MHC-II-Molekülen, ein autologes Hepatozytenprotein nach der intrazellulären Prozessierung dann auch auf MHC-II präsentiert wird. Ein inflammatorisches Zytokinmilieu könnte dann zur antigenspezifischen, effektiven Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen führen. Das könnte, die immunologische Homöostase in Richtung Immunabwehr verschieben und zum Verlust der peripheren Toleranzmechanismen führen, die letztlich auch die Bildung von Autoantikörpern beinhalten.

Hepatozyten selbst und auch Ito-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit als APZ im TF-OVA-Modell noch nicht untersucht. Auch sie könnten anhand charakteristischer Zellmarker mit Hilfe des hier etablierten Isolationsverfahrens als Kombination aus MACS und FACS hochspezifisch isoliert und separat in Zellkulturen zusammen mit OT-I CD8⁺ T-Zellen und OT-II CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. In diesem Zusammenhang stellt sich als weitere Frage, was passiert, wenn naive oder bereits aktivierte CD8⁺ T-Zellen ihr spezifisches Antigen direkt auf Hepatozyten erkennen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass naive OT-I CD8⁺ T-Zellen durch endogenes, hepatozelluläres Antigen präsentiert durch KC und DC effektiv aktiviert werden können. Eine CD8⁺ Effektorzelle kann schon nach Erkennung ihres Antigens im MHC-I-Komplex ohne weitere Kostimulation ihre Effektorfunktion ausüben (Induktion von Apoptose durch ZTL, siehe Kapitel 1.5.6.). Damit kann ein Hepatozyt zum Ziel von autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen werden, auch wenn er ohne weitere Aktivierungssignale ein autologes Antigen präsentiert. Tierexperimentell könnte das am TF-OVA-Modell getestet werden, in dem isolierte Hepatozyten mit aktivierten OT-I CD8⁺ T-Zellen inkubiert werden.

Durch die Testung isolierter Einzelpopulationen im Zellkulturverfahren werden interzelluläre Interaktionen sowie parakrine Effekte durch Sekretion inflammatorischer oder antiinflammatorischer Zytokine als Einflussfaktoren ausgeschlossen. Die *in vitro* Ergebnisse haben nun gezeigt, dass die prozessierten Antigene eines endogenen, hepatozellulären Proteins durch die getesteten NPZ der Leber nicht oder nicht ausreichend auf MHC-II-Moleküle geladen wer-

den, um OT-II CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren. Demgegenüber kam es *in vitro* zu einer Proliferation und Expression von CD44 durch OT-II CD4⁺ T-Zellen, wenn den aus TF-OVA-Mäusen isolierten NPZ zuvor noch exogenes Ovalbuminprotein zugeführt wurde. Es wurde jedoch nicht untersucht, welchen Phänotyp diese CD4⁺ T-Zellen nach ihrer antigenspezifischen Aktivierung hatten, insbesondere ob sie möglicherweise einen regulatorischen Phänotyp aufweisen.

Die Identifizierung der beteiligten Organ- und Immunzellen und das wachsende Verständnis für die Abläufe, die zur Entstehung einer Autoimmunerkrankung beitragen, stellt die Grundlage zur Entwicklung spezifischer Therapien dar. Mit den hier vorliegenden Ergebnissen ist tierexperimentell nachgewiesen, dass die primäre Erkennung eines Antigens mit endogenem Ursprung im nicht inflammatorischen Kontext durch CD8⁺ T-Zellen, nicht aber durch CD4⁺ T-Zellen erfolgt. Aufgrund der vermuteten multifaktoriellen Genese der AIH und der vielfältigen Interaktionen, die eine Immunbalance oder einen Bruch der Toleranz zur Folge haben, bleibt das Ergebnis dieser Arbeit ein Baustein auf dem Weg zum umfassenden Verständnis der Pathogenese der AIH.

5. VERZEICHNISSE

5.1. Literaturverzeichnis

- 1 Malik TA, Saeed S. 2010. Autoimmune hepatitis: a review. *J Pak Med Assoc.* 60 (5); 381–387.
- 2 Jiménez-Rivera C, Ling SC, Ahmed N, Yap J, Aglipay M, Barrowman N et al. 2015. Incidence and Characteristics of Autoimmune Hepatitis. *Pediatrics.* 136 (5); 1237–1248.
- 3 Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D et al. 2010. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 51 (6); 2193–2213.
- 4 Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. 2010. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 34 (1); 7–14.
- 5 van Gerven NM, Verwer BJ, Witte BI, van Erpecum KJ, van Buuren HR, Bouma G. 2014. Epidemiology and clinical characteristics of autoimmune hepatitis in the Netherlands; Dutch Autoimmune hepatitis STUDY group. *Scand J Gastroenterol.* 49 (10); 1245–1254.
- 6 Werner M, Prytz H, Ohlsson B, Almer S, Björnsson E, Bergquist A et al. 2008. Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study. *Scand J Gastroenterol.* 43 (10); 1232–1240.
- 7 Czaja AJ, Manns MP. 2010. Advances in the Diagnosis, Pathogenesis, and Management of Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology.* 139; 58–72.
- 8 Wang P, Su H, Underhill J, Blackmore LJ, Longhi MS, Grammatikopoulos T et al. 2014. Autoantibody and human leukocyte antigen profiles in children with autoimmune liver disease and their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 58 (4); 457–462.
- 9 Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. 2010. Definition of human autoimmunity-autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 9 (5); A259–266.
- 10 Vuppalanchi R, Gould RJ, Wilson LA, Unalp-Arida A, Cummings OW, Chalasani N et al.. 2012. Clinical significance of serum autoantibodies in patients with NAFLD: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology Int.* 6 (1); 379–385.
- 11 Silveira MG, Talwalkar JA, Angulo P, Lindor KD. 2007. Overlap of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: long-term outcomes. *Am J Gastroenterol.* 102 (6); 1244–50.
- 12 Woynarowski M, Nemeth A, Baruch Y, Koletzko S, Melter M, Rodeck B et al. 2013. Budesonide versus prednisone with azathioprine for the treatment of autoimmune hepatitis in children and adolescents. *J Pediatr.* 163 (5); 1347–1353.
- 13 Béland K, Lapierre P, Alvarez F. 2009. Influence of genes, sex, age and environment on the onset of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 15 (9); 1025–1034.
- 14 Al-Chalabi T, Underhill JA, Portmann BC, McFarlane IG, Heneghan MA. 2008. Impact of gender on the long-term outcome and survival of patients with autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 48 (1); 140–147.
- 15 Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M et al. 1997. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology.* 25 (3); 541–547.
- 16 Czaja AJ, Carpenter HA. 2006. Distinctive clinical phenotype and treatment outcome of type 1 autoimmune hepatitis in the elderly. *Hepatology.* 43 (3); 532–538.
- 17 Boberg KM. 2002. Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis.* 6; 635–647.
- 18 Holdener M, Hintermann E, Bayer M, Rhode A, Rodrigo E, Hintereder G et al.. 2008. Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J Exp Med.* 205 (6); 1409–1422.
- 19 Björnsson E, Talwalkar J, Treeprasertsuk S, Kamath PS, Takahashi N, Sanderson S et al. 2010. Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. *Hepatology.* 51 (6); 2040–2048.

- 20 Abe M, Furukawa S, Takayama S, Michitaka K, Minami H, Yamamoto K et al. 2003. Drug-induced hepatitis with autoimmune features during minocycline therapy. *Intern Med.* 42 (1); 48–52.
- 21 Hydes T, Wright M, Jaynes E, Nash K. 2014. Nitrofurantoin immune-mediated drug-induced liver injury: a serious complication of a commonly prescribed medication. *BMJ Case Rep.* pii: bcr2013203136. doi: 10.1136/bcr-2013-203136.
- 22 Zhu JY, Han Y.. 2015. Autoimmune hepatitis: Unveiling faces. *J Dig Dis.* 16 (9); 483–488.
- 23 Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Marceau G, Beland K, Alvarez F. 2004. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity.* 37 (3); 217–222.
- 24 Rigopoulou EI, Mytilinaiou M, Romanidou O, Liaskos C, Dalekos GN. 2007. Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Autoimmune Dis.* 4; 2.
- 25 Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Selleri L, Volta U et al. 1990. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet.* 335 (8684); 258–259.
- 26 Marceau G, Lapierre P, Béland K, Soudeyns H, Alvarez F. 2005. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry? *Hepatology.* 42 (3); 675–682.
- 27 Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. 2012. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 42 (1); 102–111.
- 28 de Boer YS, van Nieuwkerk CM, Witte BI, Mulder CJ, Bouma G, Bloemena E. 2015. Assessment of the histopathological key features in autoimmune hepatitis. *Histopathology.* 66 (3); 351–362.
- 29 Miao Q, Bian Z, Tang R, Zhang H, Wang Q, Huang S et al. 2015. Emperipolesis mediated by CD8 T cells is a characteristic histopathologic feature of autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 48 (2–3); 226–235.
- 30 Kobayashi M, Kakuda Y, Harada K, Sato Y, Sasaki M, Ikeda H et al. 2014. Clinicopathological study of primary biliary cirrhosis with interface hepatitis compared to autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 20 (13); 3597–3608.
- 31 Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. 1992. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Arch Dis Child.* 67 (12); 1447–1453.
- 32 Crispe IN. 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol.* 27; 147–163.
- 33 You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. 2008. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology.* 48 (3); 978–990.
- 34 Bai L, Lu HY, Feng ZR, Yu M, Li WG, Gong WB et al. 2009. Detection and the production mechanism of antinuclear antibodies (ANA) and anti-liver/kidney microsomal type 1 antibodies (anti-LKM1) in patients with chronic hepatitis C. *Chin J Exp Clin Virol.* 23 (4); 278–281.
- 35 Schiebler TH, Korf HW. 2007. Verdauungsorgane. In: *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie.* 10te Auflage. Berlin: Steinkoff-Verlag; 366.
- 36 MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. 1992. Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol.* 263 (1 Pt 1); G17–23.
- 37 MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. 1995. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol.* 269 (5 Pt 1); G692–698.
- 38 Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P et al. 2006. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology.* 44 (5); 1182–1190.
- 39 Racanelli V, Rehermann B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 43 (2 Suppl 1); 54–62.
- 40 Murphey K, Travers P, Walport M. 2009. *Janeway Immunologie.* 7te Auflage, Heidelberg: Spektrum. 9–11, 18, 157–174, 229, 241, 421–430, 438, 550–551.
- 41 Le Bail B, Bioulac-Sage P, Senuita R, Quinton A, Saric J, Balabaud C. 1990. Fine structure of hepatic sinusoids and sinusoidal cells in disease. *J Electron Microscop Tech.* 14 (3); 257–282.

- 42 Berg M. 2007. Rolle und Mechanismen einer von sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) vermittelten oralen und tumorantigen- spezifischen CD8+ T-Zell Toleranz [Dissertation]. Bonn. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- 43 Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O et al. 1998. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol.* 28; 84–90.
- 44 Moradpour D, Lammert F, Matern S. 2006. Leber. In: Siegenthaler W, Blum HE, Hrsg. *Klinische Pathophysiologie*. 9te Auflage. Thieme Verlag KG. 860–862.
- 45 Franco A, Barnaba V, Natali P, Balsano C, Musca A, Balsano F. 1988. Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology.* 8 (3); 449–454.
- 46 *Transpl Int.* 1994;7 Suppl 1:S163-6. MHC antigen presentation on the surface of hepatocytes: modulation during and after hypoxic stress. Eisenberger CF, Viebahn R, Lauchart W, de Groot H, Becker HD.
- 47 Chen M, Tabaczewski P, Truscott SM, Van Kaer L, Stroynowski I. 2005. Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing and presentation pathway. *J Immunol.* 175 (2); 1047–1055.
- 48 Bertolino P, Trescol-Biémont MC, Rabourdin-Combe C. 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol.* 28 (1); 221–236.
- 49 Burghardt S, Claass B, Erhardt A, Karimi K, Tiegs G. 2014. Hepatocytes induce Foxp3+ regulatory T cells by Notch signaling. *J Leukoc Biol.* 96 (4); 571–577.
- 50 Wuensch SA, Pierce RH, Crispe IN. 2006. Local intrahepatic CD8+ T cell activation by a non-self-antigen results in full functional differentiation. *J Immunol.* 177 (3); 1689–1697.
- 51 Limmer A, Ohl J, Wingender G, Berg M, Jüngerkes F, Schumak B et al. 2005. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol.* 35 (10); 2970–2981.
- 52 Li R, Oteiza A, Sørensen KK, McCourt P, Olsen R, Smedsrød B et al. 2011. Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300 (1); G71-81.
- 53 Nedredal GI, Elvevold KH, Ytrebø LM, Olsen R, Revhaug A, Smedsrød B. 2003. Liver sinusoidal endothelial cells represents an important blood clearance system in pigs. *Comp Hepatol.* 2 (1):1.
- 54 Wisse E, De Zanger RB, Charels K, Van Der Smissen P, McCuskey RS. 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology.* 5 (4); 683–692.
- 55 Katz SC, Pillarisetty VG, Bleier JI, Shah AB, DeMatteo RP. 2004. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J Immunol.* 173 (1); 230–235.
- 56 Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M et al. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med.* 6 (12); 1348–1354.
- 57 von Oppen N, Schurich A, Hegenbarth S, Stabenow D, Tolba R, Weiskirchen R et al. 2009. Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology.* 49 (5); 1664–1672.
- 58 Kruse N, Neumann K, Schrage A, Derkow K, Schott E, Erben U et al. 2009. Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 50 (6); 1904–1913.
- 59 Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, Löser E, Schmitt E, Gerken G et al.. 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. *Clin Exp Immunol.* 114 (3); 427–433.

- 60 Uhrig A, Banafsche R, Kremer M, Hegenbarth S, Hamann A, Neurath M et al. 2005. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol.* 77 (5); 626–633.
- 61 Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S et al. 1999. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol.* 162 (3); 1401–1407.
- 62 Carambia A, Frenzel C, Bruns OT, Schwinge D, Reimer R, Hohenberg H et al. 2013. Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol.* 58 (1); 112–118.
- 63 Gale RP, Sparkes RS, Golde DW. 1978. Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science.* 201 (4359); 937–938.
- 64 Toth CA, Thomas P. 1992. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology.* 16 (1); 255–266.
- 65 Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. 1986. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology.* 6 (4); 718–722.
- 66 Kaneda K, Teramoto K, Yamamoto H, Wake K, Kamada N. 1991. Localization and ultrastructure of the Kupffer cells in orthotopically transplanted liver grafts in the rat. *Transpl Int.* 4 (4); 205–209.
- 67 Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ et al. 2007. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood.* 110 (12); 4077–4085.
- 68 Zigmond E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z et al. 2014. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J Immunol.* 193 (1); 344–353.
- 69 Liu C, Tao Q, Sun M, Wu JZ, Yang W, Jian P et al. 2010. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest.* 90 (12); 1805–1816.
- 70 Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF et al. 2003. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology.* 38 (5); 1188–1198.
- 71 Akai S, Uematsu Y, Tsuneyama K, Oda S, Yokoi T. 2015. Kupffer cell-mediated exacerbation of methimazole-induced acute liver injury in rats. *J Appl Toxicol.* 36 (5); 702–715.
- 72 Polakos NK, Cornejo JC, Murray DA, Wright KO, Treanor JJ, Crispe IN et al. 2006. Kupffer cell-dependent hepatitis occurs during influenza infection. *Am J Pathol.* 168 (4); 1169–1178.
- 73 Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. 1995. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol.* 22 (2); 226–229.
- 74 Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, 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.* 50 (2); 612–621.
- 75 Ellett JD, Atkinson C, Evans ZP, Amani Z, Balish E, Schmidt MG et al. 2010. Murine Kupffer cells are protective in total hepatic ischemia/reperfusion injury with bowel congestion through IL-10. *J Immunol.* 184 (10); 5849–5858.
- 76 Yan J, Vetvicka V, Xia Y, Hanikýrová M, Mayadas TN, Ross G D. 2000. Critical role of Kupffer cell CR3 (CD11b/CD18) in the clearance of IgM-opsonized erythrocytes or soluble beta-glucan. *Immunopharmacology.* 46 (1); 39–54.
- 77 Shi J, Fujieda H, Kokubo Y, Wake K. 1996. Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology.* 24 (5); 1256–1263.
- 78 Ebrahimkhani MR, Mohar I, Crispe IN. 2011. Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells. *Hepatology.* 54 (4); 1379–1387.
- 79 Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemiets P et al. 2015. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology.* 62 (1); 279–291.
- 80 Burgio VL, Ballardini G, Artini M, Caratozzolo M, Bianchi FB, Levrero M. 1998. Expression of co-stimulatory molecules by Kupffer cells in chronic hepatitis of hepatitis C virus etiology. *Hepatology.* 27 (6); 1600–1606.

- 81 Singh-Jasuja H, Thiolat A, Ribon M, Boissier MC, Bessis N, Rammensee HG et al. 2013. The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology*. 218 (1); 28–39.
- 82 Thomson AW, O'Connell PJ, Steptoe RJ, Lu L. 2002. Immunobiology of liver dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 80 (1); 65–73.
- 83 Steptoe RJ, Patel RK, Subbotin VM, Thomson AW. 2000. Comparative analysis of dendritic cell density and total number in commonly transplanted organs: morphometric estimation in normal mice. *Transpl Immunol*. 8 (1); 49–56.
- 84 Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. 1988. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation*. 46 (5); 754–761.
- 85 Schmitt S, Bröker B. 2011. *Grundwissen Immunologie*. 3te Auflage, Heidelberg: Spektrum. 2–16,22–32,34–39,46–47,51–79,88–90,97–117.
- 86 Rink L, Kruse A, Haase H. 2012. *Immunologie für Einsteiger*. Heidelberg: Spektrum. 76–77, 79–84, 101–102.
- 87 Pillarisetty VG, Shah AB, Miller G, Bleier JI, DeMatteo RP. 2004. Liver Dendritic Cells Are Less Immunogenic Than Spleen Dendritic Cells because of Differences in Subtype Composition. *J Immunol*. 172 (2); 1009–1017.
- 88 Abe M, Tokita D, Raimondi G, Thomson AW. 2006. Endotoxin modulates the capacity of CpG-activated liver myeloid DC to direct Th1-type responses. *Eur J Immunol*. 36 (9); 2483–2493.
- 89 Bamboat ZM, Stableford JA, Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Welles AP et al. 2009. Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J Immunol*. 182 (4); 1901–1911.
- 90 Strauss O, Dunbar PR, Bartlett A, Phillips A. 2015. The immunophenotype of antigen presenting cells of the mononuclear phagocyte system in normal human liver--a systematic review. *J Hepatol*. 62 (2); 458–468.
- 91 O'Connell PJ, Morelli AE, Logar AJ, Thomson AW. 2000. Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 alpha+ lymphoid-related dendritic cells. *J Immunol*. 165 (2); 795–803.
- 92 Lian ZX, Okada T, He XS, Kita H, Liu YJ, Ansari AA et al. 2003. Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J Immunol*. 170 (5); 2323–2330.
- 93 Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA et al. 2007. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity*. 26 (1); 117–129.
- 94 Kern M, Popov A, Kurts C, Schultze J L, Knolle PA. 2010. Taking off the brakes: T cell immunity in the liver. *Trends Immunol*. 31 (8); 311–317.
- 95 Denk H, Düllmann J, Fischer HP, Klinge O, Lierse W, Meyer zum Büschenfelde KH et al. 2000. *Pathologie der Leber und Gallengallenwege. Sonderausgabe Spezielle pathologische Anatomie*. 2te Auflage. Berlin: Springer. 10.
- 96 Barnes BH, Tucker RM, Wehrmann F, Mack DG, Ueno Y, Mack CL. 2009. Cholangiocytes as immune modulators in rotavirus-induced murine biliary atresia. *Liver Int*. 29 (8); 1253–1261.
- 97 Glaser SS, Gaudio E, Rao A, Pierce LM, Onori P, Franchitto A et al. 2009. Morphological and functional heterogeneity of the mouse intrahepatic biliary epithelium. *Lab Invest*. 89 (4); 456–469.
- 98 Sprengers D, Sillé FC, Derkow K, Besra GS, Janssen HL, Schott E et al. 2008. Critical role for CD1d-restricted invariant NKT cells in stimulating intrahepatic CD8 T-cell responses to liver antigen. *Gastroenterology*. 134 (7); 2132–2143.
- 99 Ikeda A, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R et al. 2014. Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. *Hepatology*. 60 (1); 224–236.
- 100 Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY et al. 2014. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111 (36); 13139–13144.

- 101 Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T et al. Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. 2007. *Hepatology*. 46 (4); 1155–1165.
- 102 Dick T, Reichmann G, Ebnet K, Simon MM, Dienes HP, Echternacher B et al. 1993. An ovalbumin peptide-specific cytotoxic T cell clone with antigen self-presentation capacity uses two distinct mechanisms to kill target cells. *Cell Immunol*. 152 (2); 333–347.
- 103 Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 8 (8); 607–618.
- 104 Burgdorf S, Schölz C, Kautz A, Tampé R, Kurts C. 2008. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol*. 9 (5); 558–566.
- 105 Bevan MJ. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*. 143 (5); 1283–1288.
- 106 Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T et al. 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 17 (2); 211–220.
- 107 Malmgaard L. 2004. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res*. 24 (8); 439–54.
- 108 Chung CYJ, Ysebaert D, Berneman NZ, Cools N. 2013. Dendritic Cells: Cellular Mediators for Immunological Tolerance. *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2013; 1–8.
- 109 Kayser FH, Böttger EC, Haller O, Deplazes P, Roers A. 2014. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. 13te Auflage, Thieme Verlag KG. 142–150.
- 110 Rossum von A, Krall R, Krall N, Choy E, Choy JC. 2011. Inflammatory Cytokines Determine the Susceptibility of Human CD8 T Cells to Fas-mediated Activation-induced Cell Death through Modulation of FasL and c-FLIPs Expression. *J. Biol. Chem*. 286; 21137–21144.
- 111 Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B. 2001. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol*. 166 (9); 5430–5438.
- 112 Wuensch SA, Spahn J, Crispe IN. 2010. Direct, help-independent priming of CD8+ T cells by adeno-associated virus-transduced hepatocytes. *Hepatology*. 52 (3); 1068–1077.
- 113 Calne RY, White HJ, Binns RM, Herbertson BM, Millard PR, Pena J et al. 1969. Immunosuppressive effects of the orthotopically transplanted porcine liver. *Transplant Proc*. 1 (1); 321–324.
- 114 Maggiore G, De Benedetti F, Massa M, Pignatti P, Martini A. 1995. Circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in children with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 20 (1); 23–7.
- 115 Zhao L, Tang Y, You Z, Wang Q, Liang S, Han X et al. 2011. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One*. 6 (4); e18909.
- 116 Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. 2004. Impairment of CD4(+) CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol*. 41 (1); 31–37.
- 117 Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D et al. 2006. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol*. 176 (7); 4484–4491.
- 118 Derkow K. 2011. Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen in der Leber [Dissertation]. Berlin. Humboldt-Universität zu Berlin.
- 119 Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*. 26 (3); 136–140.
- 120 Radulovic K, Rossini V, Manta C, Holzmann K, Kestler HA, Niess JH. 2013. The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine. *PLoS One*. 8 (6); e65413.
- 121 Nakano K, Saito K, Mine S, Matsushita S, Tanaka Y. 2007. Engagement of CD44 up-regulates Fas ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis*. 12 (1); 45–54.

- 122 Tan JK, O'Neill HC. 2005. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol.* 78 (2); 319–324.
- 123 Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S et al. 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); 1428–1440.
- Alternativer Titel in den Referenzen:
Liver sinusoidal endothelial cells can prime naive CD4+ T cells in the absence of IL-12 and induce IL-4 production in primed CD4+ T cells: implications for tolerance induction in the liver. *Gastroenterology.* 116 (6); 1428–1440.
- 124 Woo J, Lu L, Rao AS, Li Y, Subbotin V, Starzl TE et al. 1994. Isolation, phenotype, and allostimulatory activity of mouse liver dendritic cells. *Transplantation.* 58 (4); 484–491.
- 125 Schurich A, Böttcher JP, Burgdorf S, Penzler P, Hegenbarth S, Kern M et al. 2009. Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology.* 50 (3); 909–919.
- 126 Schurich A, Berg M, Stabenow D, Böttcher J, Kern M, Schild HJ et al. 2010. Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol.* 184 (8); 4107–4114.
- 127 Robinson RT, Wang J, Cripps JG, Milks MW, English KA, Pearson TA et al. 2009. End-organ damage in a mouse model of fulminant liver inflammation requires CD4+ T cell production of IFN-gamma but is independent of Fas. *J Immunol.* 182 (5); 3278–3284.
- 128 Seternes T, Sørensen K, Smedsrød B. 2002. Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99 (11); 7594–7597.
- 129 Berg M, Wingender G, Djandji D, Hegenbarth S, Momburg F, Hämmerling G et al. 2006. Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance. *Eur J Immunol.* 36 (11); 2960–2970.
- 130 Plitas G, Burt BM, Stableford JA, Nguyen HM, Welles AP, DeMatteo RP. 2008. Dendritic cells are required for effective cross-presentation in the murine liver. *Hepatology.* 47 (4); 1343–1351.
- 131 Abe M, Akbar SM, Horiike N, Onji M. 2001. Induction of cytokine production and proliferation of memory lymphocytes by murine liver dendritic cell progenitors: role of these progenitors as immunogenic resident antigen-presenting cells in the liver. *J Hepatol.* 34 (1); 61–67.
- 132 Rubenstein D, Roska AK, Lipsky PE. 1986. Liver sinusoidal lining cells express class II Major histocompatibility Antigens but poor stimulators of fresh allogeneic T lymphocytes. *Journal of Immunology.* 137; 1803–1810.
- 133 Scoazec JY, Feldmann G. 1991. In situ immunophenotyping study of endothelial cells of the human hepatic sinusoid: results and functional implications. *Hepatology.* 14 (5); 789–797.
- 134 Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, Martinez OM, Krams SM. 2001. Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver.* 21 (4); 272–279.
- 135 Kuniyasu Y, Marfani SM, Inayat IB, Sheikh SZ, Mehal WZ. 2004. Kupffer cells required for high affinity peptide-induced deletion, not retention, of activated CD8+ T cells by mouse liver. *Hepatology.* 39 (4); 1017–1027.
- 136 Ju C, McCoy JP, Chung CJ, Graf ML, Pohl LR. 2003. Tolerogenic role of Kupffer cells in allergic reactions. *Chem Res Toxicol.* 16 (12); 1514–1519.
- 137 Traeger T, Mikulcak M, Eipel C, Abshagen K, Diedrich S, Heidecke CD et al. 2010. Kupffer cell depletion reduces hepatic inflammation and apoptosis but decreases survival in abdominal sepsis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 22 (9); 1039–1049.
- 138 Schott E, Bertho N, Ge Q, Maurice MM, Ploegh HL. 2002. Class I negative CD8 T cells reveal the confounding role of peptide-transfer onto CD8 T cells stimulated with soluble H2-Kb molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (21); 13735–13740.

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schema eines Sinusoids (A), Überblick über die Anatomie der Leber (B) (A) modifiziert nach Racanelli V, Rehermann B. 2006. The liver as an immunological organ. Hepatology. 43 (2 Suppl 1); 54–62. (B) modifiziert nach Fritsch H., Kühnel W. 2001. Taschenatlas der Anatomie. 7te Auflage, Band 2, Thieme Verlag. 213, 217.	5
Abb. 1.2	Morphologie von LSEC © Institut für Anatomie, Universität Bern http://e-learning.studmed.unibe.ch/morphomed/htmls/slide.html?morphomed histo temimages temcollection 28	7
Abb. 1.3	Morphologie von KC © H.Jastrow, Universität Mainz www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/eigeneEM/Leber/Le95Ku.jpg	8
Abb. 1.4	Morphologie von DC © Deutsches Krebsforschungszentrum www.gesundheitsindustrie-bw.de/de/fachbeitrag/dossier/zell-und-gentherapien-aus-der-forschung-in-die-klinik/	9
Abb. 1.5	Schema der Antigenprozessierung und -präsentation Modifiziert nach [40,85,86]	13
Abb. 2.1	Schema des DNA-Konstrukts des TF-OVA-Stammes	23
Abb. 2.2	Isolationsschema für Antigen-präsentierende Zellen der Leber	26
Abb. 3.1	Zeitlicher Verlauf der <i>in vitro</i> T-Zellproliferation und Expression der Aktivierungsmarker	35
Abb. 3.2	Isolation der Antigen-präsentierenden Zellen der Leber aus TF-OVA-Mäusen (Durchflusszytometrie)	37
Abb. 3.3	Isolation reifer DC aus DTR-BI.6×TF-OVA-Mäusen (Durchflusszytometrie)	39
Abb. 3.4	Mikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen	41
Abb. 3.5	Nachweis der Antigen-spezifität der T-Zellaktivierung unter den gegebenen Kulturbedingungen	42
Abb. 3.6	Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit LSEC aus TF-OVA-Mäusen	45
Abb. 3.7	Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit KC aus TF-OVA-Mäusen	47
Abb. 3.8	Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit DC der Leber aus TF-OVA-Mäusen.	49
Abb. 3.9	Vergleich der Reaktion der OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach Kultivierung mit reifen DC der Leber gegenüber der Gesamtpopulation DC	51
Abb. 3.10	Kultivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit DC der Milz aus TF-OVA-Mäusen	53
Abb. 3.11	Vergleich der Potentiale zur effektiven Antigenpräsentation mit endogenem oder exogenem Antigen	56

5.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Merkmale und Diagnosekriterien von Typ 1 und Typ 2 der AIH	2
Tab. 2.1	Übersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
Tab. 2.2	Übersicht der verwendeten Reagenzien und Chemikalien	20
Tab. 2.3	Übersicht der verwendeten Medien und Puffer	21
Tab. 2.4	Übersicht der verwendeten synthetischen Oligonukleotide	21
Tab. 2.5	Übersicht der für Durchflusszytometrie und FACS verwendeten Antikörper	22
Tab. 2.6	Übersicht der für ELISA verwendeten Antikörper	22
Tab. 2.7	Übersicht der verwendeten Mikrobeads	22
Tab. 2.8	Übersicht der Versuchstiere	23
Tab. 2.9	Übersicht der verwendeten Programme für die PCR der verschiedenen Mausstämme	24
Tab. 3.1	Oberflächenmarker der untersuchten Zellen	36
Tab. 3.2	Übersicht der untersuchten Zellkulturen	43
Tab. 3.3	Übersicht der Proliferationen der Ovalbumin-spezifischen T-Zellen nach Kokulturen mit DC der Leber oder DC der Milz	52

5.4. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
a. e.	am ehesten
AGP	Antigenpräsentation
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod („activation induced cell death“)
AIH	Autoimmunhepatitis
AK	Antikörper
AMA	Anti-Mitochondriale Antikörper
ANA	Anti-Nukleäre Antikörper
Anti-dc-DNS	Antikörper gegen doppelsträngige DNS
Anti-LKM-1, -2, -3	Antikörper gegen Leber-Nieren-Mikrosomen Type-1, -2, -3 („anti-liver-kidney microsome“)
Anti-LM	Antikörper gegen Leber-Membranbestandteile
Anti-SLA/ LP	Antikörper gegen lösliches („soluble“) Leber-Antigen/ Leber-Pankreas
APC	Allo-Phyco-Cyanin, Fluoreszenzfarbstoff
APZ	Antigen-präsentierende Zelle/n
ATP	Adenosintripphosphat, energiereiches Molekül
β-ME	β-Mercaptoethanol
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
BZ	B-Zelle/n
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
CD	Unterscheidungsgruppen anhand zellulärer Oberflächenmarker („Cluster of Differentiation“)
CFDA-SE/ CFSE	Carboxyfluoreszein-(diacetat-) Succinimidyl Ester
CMV	Cytomegalievirus
CpG-DNS	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-DNS
CSF/ CSFR	Kolonie stimulierender Faktor/-Rezeptor („colony stimulating factor receptor“)
CTLA-4	„cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4“
d	Tag/ Tage
DC	Dendritische Zelle/n („Dendritic cell/s“)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribo-Nuklein-Säure
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
ds-DNS	Doppelstrang-DNS
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immun-Sorptions-Essay („enzyme linked immunosorbent assay“)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
exoOVA	Exogen Ovalbumin (in Kulturen als SIINFEKL oder Protein zugeführt)
EZ	Endothelzelle/n

FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung/-Sorter („fluorescence activated cell sorting/ sorter“)
Fas/FasL	Rezeptor der TNF-Familie/Ligand des Fas-Rezeptor
Fc	Konstante Region eines Antikörpers, bestehend aus zwei schweren Ketten
FCS	Fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate, Fluoreszenzfarbstoff
FoxP3	Protein des Transkriptionsfaktors Forkhead box P3
GFP	Grün fluoreszierendes Protein („green fluorescence protein“)
Ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B Virus/ Viren
HCV	Hepatitis-C Virus/ Viren
HLA	Humane Leukozyten-Antigene („human leukocyte antigens“)
HRP	Meerrettichperoxidase („horse-radish-peroxidase“)
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül („intercellular adhesion molecule“)
IFN- γ	Interferon gamma
IFNGR	Rezeptor/ en des IFN- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Ionomycin
iTreg	Induzierte, regulatorische T-Zelle/n
i. v.	intravenös
KC	Kupferzelle/n („Kupffer cell/s“)
KK	Kammerkonstante
L-DC	Dendritische Zelle/n der Leber („Dendritic cell/s“)
LDL	Lipoprotein geringer Dichte („low density lipoprotein“)
LFA-1	Leukozytenfunktion assoziiertes Antigen („lymphocyte function-associated antigen“)
LSEC	Sinusoidale Leberendothelzelle/n („liver sinusoidal endothel cell/s“)
M-DC	Dendritische Zelle/n der Milz
MACS	Magnetische Zellseparation („magnetic cell separation“)
MDP	Makrophagen-DC-Vorläuferzelle/n („macrophages-DC-progenitor“)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
Min.	Minute/n
Mm/ μ l/ml/mM/ng	Mikrometer/Mikroliter/Milliliter/Milimol/Nanogramm
MyD88	Adapterprotein („myeloid differentiation primary response gene 88“)
NK	Natürliche Killerzelle/n
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle
NPZ	Nicht-Parenchymale Zelle/n
nTreg	Natürliche, regulatorische T-Zelle/n
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweiß)

PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster („pathogen associated molecular patter“)
pANCA	perinukleäre Anti-Neutrophile Cytoplasma-Antikörper
PBC	Primär biliäre Cirrhose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
PerCP	Peridinin Chlorophyll-Protein, Fluoreszenzfarbstoff
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
p. o.	per os
PPD	„purified protein derivate“
PRR	Muster-Erkennungsrezeptoren („pattern recognition receptor“)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute medium“
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RαM	Ratte-anti-Maus
SA	Streptavidin
Sek.	Sekunde/n
SEM	Standardfehler des Mittels („standard error of mean“)
SLA/ LP	Lösliches Leberantigen („soluble liver-antigen“) / Leber-Pankreas
T	Tausend
TAP	Antigen-Peptid-Transporter („transporter associated with antigen processing“)
Tbc	Tuberculose
Temp.	Temperatur
TF/ R	Transferrin/-Rezeptor
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor („transforming growth factor“)
Th	T-Helferzelle
TIRAP	Adapterprotein („toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein“)
TLR	Rezeptor des angeborenen Immunsystems, („toll-like receptor“)
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRAIL	„TNF-related apoptosis-inducing ligand“
Treg	Regulatorische T-Zelle/n
TZ	T-Zelle/n
TZR	T-Zellrezeptor
u. a.	unter anderem
V.	Vene
v. a.	vor allem
Vα2	Domäne des T-Zellrezeptors mit Spezifität für Ovalbumin
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül („vascular cell adhesion molecule“)
VF	Verdünnungsfaktor
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
ZTL	Zytotoxische T-Zelle/ T-Lymphozyt

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

»Ich, Anja Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: »Aktivierung von T-Zellen durch professionelle und nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen der Leber im Mausmodell der Autoimmunhepatitis« 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 Betreuer, 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

ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Anja Müller hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Derkow K, Müller A, Eickmeier I, Seidel D, Moreira MVR, Kruse N et al. Failure of CD4 T-cells to respond to liver-derived antigen and to provide help to CD8 T-Cells. PLoS One. 2011. 6 (7); e21847.

Beitrag im Einzelnen:

Planung und Durchführung der *in vitro* Untersuchungen mit Aufarbeitung der Leber- und Immunzellen, Auswertung und Darstellung der Daten, Mitarbeit an entsprechenden Ausführungen des Methodenteils

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

Derkow K, Müller A, Eickmeier I, Seidel D, Moreira MVR, Kruse N et al. Failure of CD4 T-cells to respond to liver-derived antigen and to provide help to CD8 T-Cells. PLoS One. 2011. 6 (7); e21847.

