

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie,
Infektiologie und Rheumatologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

**Inflammatorisch aktivierte Lebersinusendothelzellen
induzieren einen tolerogenen Phänotyp in
naiven CD4⁺ T-Zellen unabhängig von B7-H1**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Enver Tahir
aus Shumen, Bulgarien

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die angeborene und erworbene Immunität	1
1.1.2	Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Lymphozyten	2
1.1.3	T-Zell-Toleranz	4
1.2	Die Leber	4
1.2.1	Mikroanatomie der Lebersinusoide	5
1.2.2	Die Leber als immunologisches Organ.....	7
1.2.3	Toleranzinduktion in der Leber.....	8
1.3	Sinusendothelzellen der Leber (LSEC)	8
2	Zielsetzung.....	10
3	Material und Methoden.....	11
3.1	Allgemeine Laborgeräte	11
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	12
3.3	Chemikalien, Reagenzien und Proteine.....	13
3.4	Medien und Puffer	14
3.5	Antikörper	15
3.6	Rekombinante Mauszytokine.....	16
3.7	Computerprogramme.....	16
3.8	Tiermodelle	16
3.9	Isolation und <i>in-vitro</i> -Kultur primärer Zellen	17
3.9.1	Prinzip der Magnet-aktivierten Zellsortierung.....	17
3.10	<i>Ex-vivo</i> -Isolation von Einzelzellen aus murinen Lymphknoten und Milz	18

3.10.1	<i>Ex-vivo</i> -Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen.....	18
3.10.2	<i>Ex-vivo</i> -Isolation von antigenpräsentierenden Zellen.....	19
3.10.3	<i>Ex-vivo</i> -Isolation naiver CD8 ⁺ T-Zellen.....	19
3.11	<i>Ex-vivo</i> -Isolation von Sinusendothelzellen aus muriner Leber	19
3.12	<i>In-vitro</i> -Kultur.....	21
3.12.1	<i>In-vitro</i> -Differenzierung von Th1-Zellen	21
3.12.2	<i>In-vitro</i> -LSEC-Kultur unter inflammatorischen Bedingungen	22
3.12.3	<i>In-vitro</i> -Kokultur von LSEC und naiven T-Zellen	22
3.13	Durchflusszytometrie	23
3.13.1	Analyse von Zellpopulationen	23
3.13.2	Markierung und Nachweis von Oberflächenmolekülen	24
3.13.3	T-Zell-Restimulierung und intrazelluläre IFN- γ -Markierung.....	25
3.13.4	Analyse der Proliferation von T-Zellen.....	26
3.13.5	Analyse <i>in vitro</i> polarisierter Th1-Zellen	27
3.14	Statistische Analyse.....	28
4	Ergebnisse	29
4.1	<i>In vitro</i> aktivierte LSEC	29
4.1.1	LSEC-Phänotyp nach 24-stündiger <i>in-vitro</i> -Aktivierung	29
4.1.1.1	Prozentuale Expression der Oberflächenproteine.....	29
4.1.1.2	Expressionsstärke der Oberflächenproteine.....	31
4.1.2	LSEC-Phänotyp nach 48-stündiger <i>in-vitro</i> -Aktivierung	33
4.2	CD4 ⁺ T-Zell-Phänotyp nach <i>Priming</i> durch aktivierte LSEC	35
4.2.1	Proliferation und Aktivierung der CD4 ⁺ T-Zellen.....	35
4.2.2	IFN- γ -Expression der CD4 ⁺ T-Zellen.....	37
4.2.3	Ausgrenzung der kontaminierenden Th1-Zellen	39

4.2.4	T-Zell-Merkmale nach Ausgrenzung der Th1-Zellen	41
4.3	Einfluss des B7-H1-Mechanismus auf die Toleranzinduktion in CD4 ⁺ T-Zellen.....	43
4.3.1	Proliferation und Aktivierung der CD4 ⁺ T-Zellen.....	43
4.3.2	IFN- γ -Expression	46
4.4	CD8 ⁺ T-Zell-Phänotyp nach <i>Priming</i> durch aktivierte LSEC und Einfluss des B7-H1-Mechanismus auf die T-Zell-Toleranz	47
4.4.1	Proliferation und Aktivierung der CD8 ⁺ Zellen.....	47
4.4.2	IFN- γ -Expression der CD8 ⁺ Zellen.....	49
5	Diskussion.....	51
5.1	<i>In-vitro</i> -Modell für die hepatische Inflammation	51
5.2	<i>In-vitro-Priming</i> naiver CD4 ⁺ T-Zellen durch aktivierte LSEC.....	54
5.3	<i>In-vitro-Priming</i> naiver CD8 ⁺ T-Zellen durch aktivierte LSEC.....	57
5.4	Die Rolle der PD-1/B7-H1-Interaktion für die Toleranzinduktion durch LSEC	59
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick	60
6	Literaturverzeichnis.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makro- und Mikroanatomie der Leber.	6
Abbildung 2: Prinzip der magnetischen Zellsortierung.	17
Abbildung 3: Identifikation der zu analysierenden Zellpopulationen im <i>Dotplot</i>	25
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse einer T-Zell-Proliferation.	27
Abbildung 5: Intrazelluläre Markierung der Th1-Kulturzellen.	28
Abbildung 6: Expression von ICAM-1, VCAM-1 und B7-H1 durch LSEC nach 24-stündiger, inflammatorischer Aktivierung.	30
Abbildung 7: Expression von MHC-II durch LSEC nach 24-stündiger, inflammatorischer Aktivierung.	31
Abbildung 8: Expressionsstärke von ICAM-1, VCAM-1, B7-H1 und MHC-II durch LSEC nach 24-stündiger Aktivierung.	33
Abbildung 9: Expressionsstärke von ICAM-1, VCAM-1, B7-H1 und prozentuale Expression von MHC-II durch LSEC nach 48-stündiger Aktivierung.	34
Abbildung 10: CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation nach Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC.	36
Abbildung 11: Aktivierung der CD4 ⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC.	37
Abbildung 12: IFN- γ -Expression von CD4 ⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC.	38
Abbildung 13: Proliferation und Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch Th1/OVA-aktivierte LSEC und Ausgrenzung der kontaminierenden Th1-Zellen.	40
Abbildung 14: IFN- γ -Expression von CD4 ⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation auf Th1/OVA-aktivierten LSEC und Ausgrenzung der kontaminierenden Th1-Zellen.	41
Abbildung 15: Statistische Analyse der Proliferation, CD25- und IFN- γ -Expression durch LSEC-geprimte CD4 ⁺ T-Zellen.	42
Abbildung 16: Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC.	44

Abbildung 17: Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mittels Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC. 45

Abbildung 18: IFN- γ -Expression von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC. 46

Abbildung 19: CD8⁺ T-Zell-Proliferation nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC. 48

Abbildung 20: Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC. 49

Abbildung 21: IFN- γ -Expression von CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC. 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Laborgeräte	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Proteine	13
Tabelle 4: Medien und Puffer.....	14
Tabelle 5: Antikörper.....	15
Tabelle 6: Rekombinante Mauszytokine	16
Tabelle 7: Computerprogramme	16
Tabelle 8: Verwendete Fluorochrome	24

Zusammenfassung

Die Leber ist ein für ihr tolerogenes Potential bekanntes Organ, wobei die zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen nicht endgültig geklärt sind. Eine Schlüsselfunktion für die hepatische Toleranz scheinen die verschiedenen intrahepatischen Zellpopulationen und das einzigartige Mikromilieu der Leber zu haben. Insbesondere antigenpräsentierenden Zellen wie den Lebersinusendothelzellen (LSEC) wird tolerogenes Potential zugeschrieben. LSEC kommen in Kontakt mit T-Zellen und können mittels Antigenpräsentation diese tolerogen modulieren. Leberkrankheiten wie die Virushepatitiden und die Autoimmunhepatitis (AIH) gehen mit einer Inflammation einher und ob die tolerogenen Eigenschaften der LSEC dabei erhalten bleiben ist nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Inflammation auf die Fähigkeit von LSEC untersucht, Toleranz in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu induzieren.

In der *in-vitro*-Kultur führte die inflammatorische Aktivierung von LSEC aus Wildtyp-Mäusen zur Hochregulation folgender Oberflächenproteine: MHC-II, ICAM-1, VCAM-1 und B7-H1 (PD-L1). Die aktivierten ICAM-1^{high}VCAM-1^{high}B7-H1^{high} LSEC induzierten in Anwesenheit eines spezifischen Antigens eine geringere Proliferation und IFN- γ -Expression in naiven CD4⁺ T-Zellen als ruhende LSEC, während die Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 unverändert niedrig blieb. Eine Antigenpräsentation an TCR-transgenen naiven CD8⁺ T-Zellen führte dagegen zu einer stärkeren Proliferation und erhöhten IFN- γ -Expression, wobei sich die CD25-Expression nicht änderte. Anschließend zeigten Blockierungs-Experimente, dass der PD-1/B7-H1-Mechanismus keinen Einfluss auf den LSEC-modulierten Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen hat. Im Gegensatz dazu wurde in CD8⁺ T-Zellen eine stärkere Proliferation sowie eine Hochregulation der IFN- γ - und CD25-Expression induziert.

Zusammenfassend führte die *in vitro* inflammatorische Aktivierung von LSEC zu einer deutlichen Phänotypänderung mit Expressionssteigerung von Oberflächenproteinen. Aktivierte LSEC konnten unverändert eine Toleranz in CD4⁺ T-Zellen induzieren. Im CD8⁺ T-Zell-Kontext kam es dagegen zur Aufhebung der Toleranz. Der koinhibitorische PD-1/B7-H1-Mechanismus war entscheidend für die tolerogene Modulierung von naiven CD8⁺ T-Zellen durch LSEC, aber nicht von naiven CD4⁺ T-Zellen. Ob diese Ergebnisse Erklärungsansätze für die Chronifizierung von viralen Hepatitiden oder die Genese von AIH liefern können, muss durch weitere Untersuchungen im murinen und humanen System geklärt werden.

Abstract

The liver is an organ known for its tolerogenic potential. The cellular and molecular mechanisms involved in this process have not yet been elucidated. A key role is attributed to the different intrahepatic cell populations and the unique hepatic microenvironment. Especially, antigen presenting cells such as the liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), which are in close contact to circulating T cells, are regarded as having a tolerogenic potential. LSEC can present antigens to T cells and thereby modulate them towards tolerance. Common liver diseases such as viral hepatitis and autoimmune hepatitis are associated with organ inflammation and may change the features of hepatic cell populations. The current study investigates the influence of inflammation on the ability of LSEC to induce tolerance in CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Activating LSEC from wildtype mice in *in vitro* cultures resulted in upregulation of the following proteins: MHC-II, ICAM-1, VCAM-1 and B7-H1 (PD-L1). In the presence of a specific antigen activated ICAM-1^{high}VCAM-1^{high}B7-H1^{high} LSEC induced lower proliferation and IFN- γ expression in naïve CD4⁺ T cells compared to resting LSEC. At the same time the expression of the T cell activation marker CD25 remained low. Antigen presentation to naïve CD8⁺ by activated LSEC lead to a stronger proliferation, higher IFN- γ and unchanged CD25 expression. Blocking the interaction between B7-H1 on LSEC and its ligand PD-1 on T cells did not change the phenotype of CD4⁺ T cells. In contrast, CD8⁺ T cells proliferated stronger and upregulated their IFN- γ and CD25 expression levels.

In conclusion, the inflammatory activation of LSEC induced a distinct phenotype change with increased expression of surface proteins. Activated LSEC were still able to induce tolerance in CD4⁺ T cells, but not in CD8⁺ T cells. The co-inhibitory PD-1/B7-H1 signaling pathway was crucial in the tolerogenic modulation of naïve CD8⁺ T cells via LSEC, but not in naïve CD4⁺ T cells. Whether these results can provide explanations for the pathogenesis of chronic viral hepatitis or autoimmune hepatitis has to be further investigated in both animal and human studies.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIH	Autoimmunhepatitis
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin, Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigenpresenting cell</i>)
BD	Beckton Dickinson
BSA	Bovines Serum-Albumin
B7-H1 (PD-L1)	<i>B7 homolog 1 (programmed cell death protein 1)</i>
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDMEM	Komplett-DMEM
CFSE	5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
cRPMI	Komplett-RPMI
Cy5	Indodicarbocyanin
DC	Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
DNase	Desoxyribonuklease
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward light scatter</i>)
GALT	Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GMFI	geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität
h	Stunde
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (<i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IFN- γ	Interferon-gamma

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2-R	Interleukin-2-Rezeptor
IM	Ionomycin
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	Lebersinusendothelzellen (<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>)
M	Molar
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MALT	mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHC-I, MHC-II	MHC-Klasse I, MHC-Klasse II
Min	Minute
MW	Mittelwert
mLN	mesenteriale Lymphknoten
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non essential amino acids</i>)
NK	natürliche Killer
NPC	nicht-parenchymatische Zellen
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweißalbumin)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
rest.	restimuliert
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium

RT	Raumtemperatur
SAPC	<i>spleen-derived antigen presenting cells</i>
Sek.	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward light scatter</i>)
Std.	Stunde
TCR	T-Zell-Rezeptor
TF-OVA	Transferrin-Ovalbumin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta (<i>transforming growth factor-beta</i>)
Th1	T-Helfer-Zelle 1
Th2	T-Helfer-Zelle 2
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{SAPC}	SAPC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen
U	Internationale Enzymeinheit (<i>unit</i>)
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül (<i>vascular adhesion molecule</i>)
WM	Waschmedium

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Im Zuge der Evolution entwickelte sich das Immunsystem in den meisten Vielzellern als ein Netzwerk aus Organen, Zellen und Molekülen, das den Organismus effektiv vor Pathogenen schützt. Maßgebend für die Erfüllung dieser Aufgabe ist neben der „Selbst-Fremd-Unterscheidung“ auch das Vermögen auf einen bestimmten Stimulus mit „Immunität“ oder „Toleranz“ zu reagieren. So werden krankheitserregende Bakterien, Viren und Parasiten, aber auch entartete Tumorzellen als gefährlich erkannt und eliminiert. Gesunde, körpereigene Zellen sowie harmlose Antigene müssen dagegen toleriert werden. Wenn diese Mechanismen ungenügend sind oder sogar versagen, können sich Infektionskrankheiten wie z.B. die viralen Hepatitiden oder Überempfindlichekeitsreaktionen bzw. Autoimmunkrankheiten wie die allergische Rhinitis und Autoimmunhepatitis (AIH) entwickeln.

1.1.1 Die angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem besteht aus zwei großen Säulen: der angeborenen und der erworbenen Immunität. Sie müssen jederzeit vier Hauptaufgaben bewältigen können: immunologische Erkennung, Auslösung von Immuneffektorfunktionen, Immunregulation und immunologisches Gedächtnis (Murphy et al., 2009).

Das angeborene (unspezifische) Immunsystem hat sich sehr früh in der Evolution von vielzelligen Organismen entwickelt und ist vom Lebensbeginn an in ihrer endgültigen Form vorhanden. Es kommt jedoch erst dann zum Tragen, wenn die natürlichen physiko-chemischen Barrieren der äußeren und inneren Oberfläche des Körpers durch Pathogene überwunden werden. Zunächst wird die zelluläre Komponente aktiviert, die aus Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen, Mast- und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) besteht. Erst dann folgt die humorale Immunantwort (Schütt und Bröker 2011).

Die angeborene Immunantwort beseitigt das Pathogen entweder vollständig oder begrenzt seine Ausbreitung so lange, bis die entwicklungsgeschichtlich neuere, erworbene (spezifische) Immunität in Gang gesetzt wird. Diese kommt nur in Vertebraten vor und wird durch die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisiert, das bei einer erneuten Infektion mit „bekannten“ Pathogenen einen Krankheitsausbruch nicht zulässt. Ihre

antigenspezifischen Abwehrmechanismen sind die zelluläre auf T-Lymphozyten und die humorale auf B-Lymphozyten basierende Immunantwort (Murphy et al., 2009).

B-Zellen bilden die zelluläre Komponente der humoralen Immunantwort des erworbenen Immunsystems. Ihre Effektorform ist die Plasmazelle, die einen B-Zell-Rezeptor (BCR) besitzt und als einzige Körperzelle antigenspezifische Antikörper produziert (Abbas und Lichtman 2006).

Die T-Lymphozyten haben ihren Ursprung im Knochenmark und reifen beim Menschen im Thymus (primäres lymphatisches Organ) zu naiven (antigenunerfahrenen) T-Zellen heran, wo sie ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) bekommen. Werden Peptid/Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC)-Epitope durch diesen TCR erkannt, bekommt die T-Zelle ein Überlebenssignal (positive Selektion), während alle nicht derart selektierten Zellen absterben (Singer et al., 2008). Hierbei favorisiert ein MHC-II-restringiertes TCR-Signal einen $CD4^+$ Phänotyp, während $CD8^+$ T-Zellen MHC-I-restringiert entstehen (Teh et al., 1988). Schließlich wandern naive T-Lymphozyten als $CD4^+$ Helfer-T-Zellen (Th-Zellen) oder zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen (CTL) in die sekundären lymphatischen Organe ein und entwickeln sich nach spezifischem Antigenkontakt zu Effektorlymphozyten.

1.1.2 Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Lymphozyten

Eine Voraussetzung für die Teilnahme der naiven T-Lymphozyten an der Immunantwort ist die Präsentation von spezifischem Antigen durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Beispiele dafür sind die Makrophagen, B-Zellen und insbesondere Dendritische Zellen (DC). Die Antigenpräsentation erfolgt v.a. in den sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten, der Milz und dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) in Form einer MHC-gebundenen Antigenpräsentation. Daraufhin erfahren die naiven T-Zellen in einem als *Priming* bezeichneten Prozess eine Aktivierung und klonale Expansion, wobei wesentliche Unterschiede im $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zell-Kontext bestehen (Murphy et al., 2009).

$CD8^+$ T-Zellen erkennen nur MHC-Klasse-I gebundene Peptide, die in erster Linie aus endogenen zytosolischen Proteinen stammen. Das MHC-Klasse-I-Molekül ist auf der Zellmembran von allen kernhaltigen Zellen vorhanden und dient der Identifizierung und Eliminierung von Zellen, die körperfremde Proteine herstellen, wie z.B. virusinfizierte oder entartete Zellen (Zinkernagel 1997; Murphy et al., 2009). Unter bestimmten Bedingungen können mittels MHC-I auch exogene Peptide den $CD8^+$ T-Zellen präsentiert werden, was als Kreuzpräsentation bezeichnet wird (Reimann und Kaufmann 1997; den Haan et al., 2000). T-

Zellen, die den Korezeptor CD4 exprimieren (CD4⁺ T-Zellen), erkennen mit ihrem TCR dagegen nur MHC-Klasse-II gebundene Liganden. Diese werden ihnen durch APC in Form von MHC-II-Peptidkomplexen präsentiert, wobei die Antigene im Vorfeld vom Extrazellulärraum aufgenommen und im Zellinneren prozessiert werden müssen (Trombetta und Mellman 2005). Neben professionellen APC können auch Endothelzellen wie die LSEC CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen Antigene präsentieren (Limmer et al., 2005; Kruse et al., 2009).

Zur vollständigen Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Zellen sind drei Signale notwendig. Signal 1 ist die Antigenerkennung durch den TCR nach Interaktion mit dem MHC-Peptidkomplex. Signal 2 ist das kostimulatorische Signal, das über den CD28-Rezeptor naiver T-Zellen und die CD80/86-Moleküle der APC vermittelt wird (Smith-Garvin et al., 2009). Kostimulatorische Wirkungen werden auch den auf Immun- oder Endothelzellen exprimierten Molekülen ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) und VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) zugeschrieben (Van Seventer et al., 1990; Damle und Aruffo 1991). Außerdem brauchen T-Zellen zur Effektordifferenzierung weitere APC-Signale, die allgemein als das Signal 3 definiert und durch Mediatoren wie IL-12 und IL-1 vermittelt werden (Kalinski et al., 1999; Curtsinger und Mescher 2010).

Aktivierte antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen wandeln sich in CTL um, die intrazelluläre Krankheitserreger sehr effektiv bekämpfen können. Sie sind in der Lage, jede virusinfizierte Zelle zu lysieren. Hierzu werden Granzyme, Perforine oder das Fas-Ligand eingesetzt, die Poren in der Membran von Zielzellen bilden und ihren programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen können (Andersen et al., 2006). Zusätzlich bilden sie Zytokine wie IFN- γ (*Interferon-Gamma*), die einerseits die virale Replikation hemmen und andererseits die Präsentation von zytosolischen Antigenen auf MHC-I und die Makrophagenaktivierung verstärken (Smith-Garvin et al., 2009).

Im Rahmen des ersten Antigenkontakts und der darauf folgenden Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen kommt es zur Ausdifferenzierung in mehrere Effektorsubtypen, die als Th-Zellen bezeichnet werden. Dazu gehören u.a. die Th1- und Th2-Zellen. Maßgebend für die Entwicklung der Merkmale der jeweiligen Subgruppe sind die als Signal 3 wirkenden Zytokine. Erfolgt z.B. die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von Interleukin-12 (IL-12) und IFN- γ , entwickeln sich diese überwiegend zu Th1-Zellen. So rufen z.B. Viren und intrazelluläre Bakterien zunächst vornehmlich eine IFN- γ -Ausschüttung durch DC und Makrophagen sowie eine IL-12-Produktion durch NK-Zellen und CTL hervor, was eine Th1-getragene Immunantwort bei dieser Art von Infektionen bedingt. IL-4 und IL-6 fördern dagegen die Differenzierung aktivierter CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen (Weaver et al., 2006; Murphy et al., 2009).

Die Effektorfunktionen der reifen CD4⁺ Subgruppen sind vielfältig und werden wesentlich durch die von ihnen ausgeschütteten Zytokine bestimmt. Während die Th1-Zellen mit ihrer IFN- γ -, TNF- α - (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*) und IL-2-Produktion u.a. für die Makrophagenaktivierung ausschlaggebend sind, aktivieren Th2-Zellen mit Lymphokinen wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 höchst effektiv B-Zellen (Mosmann und Coffman 1989; Romagnani 1991). Die adaptive Immunantwort wird vorwiegend entweder von der zellvermittelten (Th1) oder von der humoralen Immunität (Th2) getragen.

1.1.3 T-Zell-Toleranz

Eine wichtige Funktion zum Schutz vor Autoimmunkrankheiten und vor überschießenden Reaktionen gegen harmlose Umweltantigene spielt die T-Zell-Toleranz, die in eine zentrale und eine periphere eingeteilt wird.

Der Thymus ist der Ort, an dem die zentrale T-Zell-Toleranz geprägt wird. Hierbei bekommen T-Lymphozyten, deren TCR eine hohe Affinität für die präsentierten Selbstpeptide aufweisen, ein Apoptosesignal. Dieser Prozess wird als Negativselektion bezeichnet (Neumann 2008). Manche dieser T-Lymphozyten werden jedoch nicht eliminiert, sondern differenzieren sich zu natürlichen regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), die eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz spielen (Neumann 2008; Curotto de Lafaille und Lafaille 2009).

Als periphere T-Zell-Toleranz wird die Gesamtheit der Mechanismen bezeichnet, die reife, in der Peripherie zirkulierende und potentiell autoreaktive T-Zellen neutralisiert (Xing und Hogquist 2012). Wenn z.B. Antigene ohne gleichzeitige Kostimulation präsentiert werden, resultiert das in einer dauerhaften Inaktivierung von T-Zellen (Medzhitov und Janeway 1997). Werden die T-Zellen durch kontinuierliche Antigenpräsentation wiederholt aktiviert, führt das zum induzierten Zelltod, was als Deletion bezeichnet wird (Neumann 2008).

1.2 Die Leber

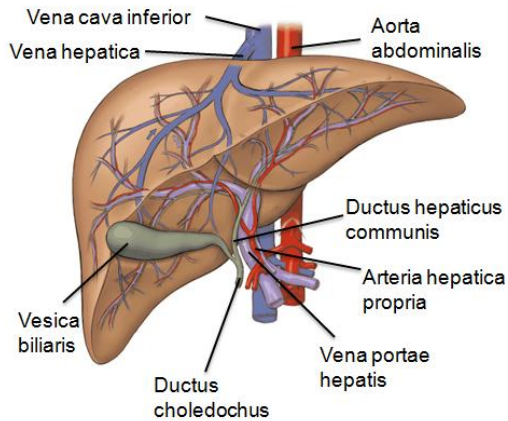
Die Leber erfüllt als zentrales Stoffwechselorgan von Wirbeltieren zahlreiche lebenswichtige Aufgaben im Organismus. Aufgrund ihrer Synthese- und Metabolisierungsfunktion spielt sie eine entscheidende Rolle im Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel. Die Leber ist die größte Drüse des Körpers und ihre metabolischen Produkte werden auf zwei Wegen sezerniert: direkt in die Blutbahn oder über die Gallenflüssigkeit. Außerdem nimmt sie während der Fetalperiode und auch bei schweren Anämien an der Blutbildung teil (Kirsch 2010; Galanello

und Origa 2010). Die Leber wird sowohl mit venösem (ca. 75 %) als auch mit arteriellem Blut (ca. 25 %) versorgt. Eine Mischung aus Nährstoffen, Toxinen und Pathogenen enthaltendes, venöses Blut erreicht das Organ über die Pfortader (*V. portae*), deren Zuflüsse aus den Kapillargebieten von Magen-Darm-Trakt, Pankreas und Milz stammen. Die arterielle Blutversorgung aus dem systemischen Kreislauf erfolgt über die Leberarterie (*A. hepatica propria*) (Abb. 1A). Beide Gefäße verzweigen sich in kleinere Äste und münden in die sogenannten Lebersinusoiden, die weitlumigen Kapillaren sind und die histologische Baueinheit der Leber, das Leberläppchen (*Lobulus*), durchziehen. Von hier wird das Blut durch die Zentralvenen im Inneren der Leberläppchen gesammelt und über die Lebervenen (*Vv. hepaticae*) der unteren Hohlvene (*V. cava inferior*) zugeführt (Lüllmann-Rauch 2009) (Abb. 1A und B).

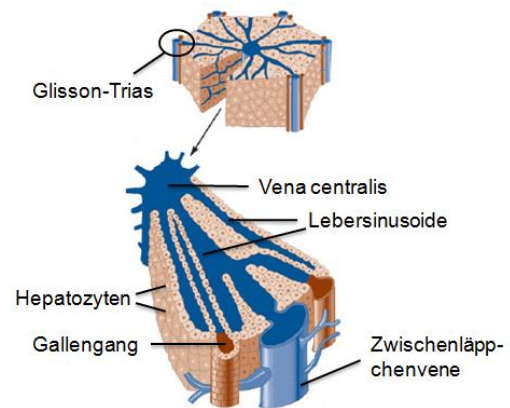
1.2.1 Mikroanatomie der Lebersinusoiden

Die Lebersinusoiden sind atypische Kapillaren, die sich vom Kapillarnetz in den meisten anderen Organen durch einige morphologische Charakteristika unterscheiden. Hier fließt das Blut von einer Vene zu einer anderen Vene („*Rete mirabile*“). Die Lebersinusoiden sind bis zu 15 µm weit und werden nicht durch eine Basalmembran vom Interstitium getrennt (Kühnel 2003). Sie sind nur durch Endothelzellen ausgekleidet, die das Sinusoidallumen vom ca. 0,5-2 µm breiten Disse-Raum abgrenzen (Lippert 2011) (Abb. 1C). Die Hepatozyten machen mit 78 % den größten Anteil des Lebergewebes aus und bilden das Organparenchym. Gleichzeitig gibt es die Gruppe der nicht-parenchymatischen Zellen (NPC), die aus LSEC, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen (Blouin et al., 1977), dendritischen Zellen (DC) (Crispe 2011) und Lymphozyten (Klugewitz et al., 2004b; Parker und Picut 2012) besteht. Die Ito-Zellen werden auch Fettspeicherzellen oder Sternzellen genannt, befinden sich im Disse-Raum und speichern Vitamin A. Im Rahmen einer Leberzirrhose differenzieren sie sich zu Myofibroblasten und werden für die erhöhte Bindegewebsbildung verantwortlich gemacht (Lee und Jeong 2012). Obwohl die Leber ein nicht-lymphatisches Organ ist, kann sie die immunologischen Prozesse im Organismus beeinflussen, und ein Großteil der oben genannten NPC sind wichtige Vermittler ihrer Funktion.

A) Leber



B) Lobulus



C) Lebersinusoid

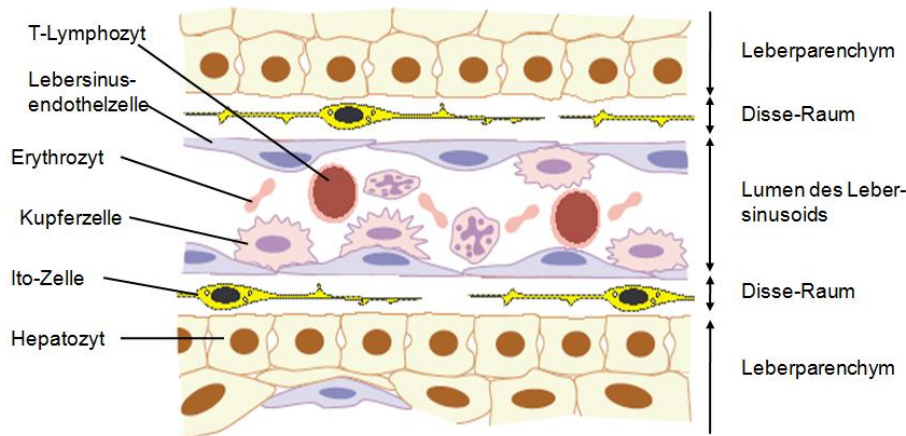


Abbildung 1: Makro- und Mikroanatomie der Leber.

A, Makroanatomische Darstellung der Leber und der großen Bauchgefäße. Die Pfortader (*V. portae hepatis*) und die Leberarterie (*A. hepatica propria*) treten an der Leberpforte (*Porta hepatis*) ins Organ ein, während der Lebergallengang (*D. hepaticus communis*) hier die Leber verlässt. Modifiziert nach http://www.arizonatransplant.com/images/liver_large_1.jpg. **B**, Darstellung der kleinsten Funktionseinheit der Leber: das Leberläppchen (*Lobulus*). Die zuführenden Blutgefäße und der Gallengang verlaufen an den Eckpunkten des meist sechseckigen Lobulus und werden als Glisson-Trias bezeichnet. Im Zentrum der Lobuli liegen die abführenden Blutgefäße (Zentralvenen oder *Vv. centrales*), die sich vereinigen und das Blut über Segmentvenen in die drei Lebervenen (*Vv. hepaticae*) und schließlich in die untere Hohlvene (*V. cava inferior*) führen. Zwischen den Glisson-Trias und Zentralvenen befinden sich die Lebersinusoiden, wo der Stoffaustausch zwischen dem Blut und den Hepatozyten stattfindet. Modifiziert nach Cunningham et al (Cunningham und Van Horn 2003). **C**, Mikroanatomische Darstellung der Lebersinusoiden. Das Lumen wird von LSEC eingegrenzt, die keine Basalmembran besitzen und fenestriert sind. Zwischen den LSEC und den Leberparenchymzellen befindet sich der Disse-Raum, in dem die Ito-Zellen zu finden sind. Zusätzlich sind verschiedene luminale Zellpopulationen abgebildet. Modifiziert nach Lalor und Adams (Lalor und Adams 2002).

1.2.2 Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber erfüllt wesentliche Aufgaben wie die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, die unspezifische Phagozytose sowie die Zelldeletion. Sie ist auch der Ort, an dem Prozesse wie die Eliminierung von aktivierten T-Zellen, die extrathymische T-Zell-Proliferation und die Beseitigung von Abfallmolekülen nach einer durchgemachten Entzündung stattfinden (Parker und Picut 2012). Somit ist die Leber an wichtigen immunologischen Funktionen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems beteiligt.

Kupffer-Zellen befinden sich hauptsächlich im Lumen der Lebersinusoide und machen die größte Population der Gewebsmakrophagen im Organismus aus (Naito et al., 2004). Sie leisten einen Beitrag zur unspezifischen Phagozytose, die den Körper gegen pathogene Organismen aus dem Darm abschirmt und im Blut enthaltene Antigene wie z.B. bakterielle Endotoxine, Zellabfälle und sterbende Zellen entfernt (Parker und Picut 2012). Hierbei setzen die Kupffer-Zellen ihre Fc-, Komplement-, CD14-, Scavenger-, Mannose- und Toll-Like-Rezeptoren (TLR4) ein (Murphy et al., 2009). Wenn eine Immunreaktion abklingt, verbleiben aktivierte T-Zellen und Moleküle, die potentiell schädlich für den Organismus sind. Diese werden in der Leber vom systemischen Kreislauf entfernt (Mehal et al., 1999). Es wird auch über eine extrathymische T-Zell-Proliferation in der Leber berichtet, bei der neue T-Zell-Populationen aus Vorläuferzellen hervorgehen (Sato et al., 1995; Sugahara et al., 1999).

Als weitere Gruppe von NPC sind die leberresidenten DC in die immunologische Funktion dieses Organs involviert. Sie befinden sich v.a. im Bereich der Glisson-Trias (Prickett et al., 1988) und sind in der Lage Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und in regionale lymphatische Organe zu transportieren. T-Zellen, die durch hepatische DC *geprimt* werden, werden tolerogen und zeigen eine mangelnde Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Khanna et al., 2000). Die Gruppe der hepatischen Lymphozyten wird aus T-Zellen, B-Zellen, NK- und Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) gebildet. Eine Besonderheit der Leber ist, dass sie im Vergleich zu allen anderen Organen den prozentual größten Anteil an NK-Zellen enthält (Klugewitz et al., 2004a). Dies sind zytotoxische Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, die virusinfizierte und entartete Zellen lysieren (Winnock et al., 1993). Die hepatischen Sinusendothelzellen (LSEC) erfüllen für gewöhnliches Gefäßendothel untypische Aufgaben wie die Entsorgung zirkulierender Makromoleküle und die Antigenpräsentation an T-Lymphozyten (Limmer und Knolle 2001; Seternes et al., 2002). Die LSEC haben auch einen ausschlaggebenden Einfluss auf das immunologische Mikromilieu in den Sinusoiden (Limmer und Knolle 2001).

1.2.3 Toleranzinduktion in der Leber

Die Leber ist ein Organ, dem tolerogene Eigenschaften zugeschrieben werden. Zahlreiche, körperfremde, oral aufgenommene Antigene, die u.a. aus kommensalen Bakterien stammen, werden über die *V. portae* in die Leber eingeschwemmt und lösen anschließend keine Immunreaktion im Organismus aus. Dieses Phänomen der sich Nahrungsantigenen gegenüber entwickelnden systemischen Immuntoleranz wird als orale Toleranz bezeichnet und ist von der Leber entscheidend beeinflusst (Chase 1946; Cantor und Dumont 1967; Wu und Weiner 2003). Diese wichtige Rolle der Leber wurde in verschiedenen Tiermodellen gezeigt. Durch Anlegen eines portosystemischen Shunts wurde die Blutzufuhr der Leber über die Pfortader unterbunden, was in Aufhebung der davor bestehenden Immuntoleranz gegenüber einem oral verabreichten Antigen resultierte (Cantor und Dumont 1967; Callery et al., 1989; Yang et al., 1994).

Allogene Lebertransplantate werden bei manchen Tierarten auch ohne Immunsuppression toleriert (Calne et al., 1969; Kamada et al., 1988). Lebertransplantate können durch Induktion einer antigenspezifischen Toleranz die Abstoßung von weiteren parenchymatösen Organen aus demselben Donor verhindern, was bei Transplantaten aus anderen Spendertieren nicht der Fall ist (Calne et al., 1969; Kamada et al., 1981). Eine Graft-versus-Host-Reaktion konnte durch ähnliche Experimente unterdrückt werden (Kobayashi et al., 1994). Es existieren Pathogene wie manche Hepatitis-Viren (B und C), verschiedene Protozoen und Bakterien, die möglicherweise diese Toleranzinduktion durch die Leber ausnutzen, um dem Immunsystem zu entkommen und im Körper zu persistieren (Crispe et al., 2000; Crispe 2011).

1.3 Sinusendothelzellen der Leber (LSEC)

Die LSEC machen mit ca. 45-50 % die größte Population an Leber-NPC aus (De Leeuw et al., 1990). Sie unterscheiden sich in ihrer Mikrostruktur von den Endothelzellen der großen Blutgefäße sowie von anderen Kapillarendothelien. Sie haben keine Basalmembran und elektronenmikroskopisch können offene Poren in ihrem Zellkörper (sog. *Fenestrae*) dargestellt werden, die ca. 0,17 µm breit sind und etwa 5-10 % der Zelloberfläche perforieren (Wisse 1970; Le Couteur et al., 2008). LSEC stellen eine funktionstüchtige Barriere zwischen dem Sinusoidallumen und den Leberparenchymzellen dar (Abb. 1C), die nur von Flüssigkeiten, gelösten Substanzen und kleinen Partikeln passiert werden kann (Wisse et al., 1996). Alle Stoffe mit einem Durchmesser größer als 12 nm werden durch die *Fenestrae* zurückgehalten (Kempka und Kolb-Bachofen 1988). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Leberparenchymzellen und

intrasinusoidale Lymphozyten mittels zytoplasmatische Ausläufer über die LSEC-*Fenestrae* in Kontakt treten können (Warren et al., 2006).

Die LSEC weisen im Vergleich zu makro- und mikrovaskulären Endothelien anderer Organe einen besonderen Phänotyp auf, da sie einzigartige Expressionsmuster für eine Reihe von Membranproteinen besitzen (Limmer und Knolle 2001). So werden MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40, ICAM-1 und VCAM-1 konstitutiv durch die LSEC exprimiert (Lohse et al., 1996; Knolle und Gerken 2000). Die Endozytose von Antigenen ist eine der Aufgaben von LSEC und wird in erster Linie durch Mannose-, Scavenger-, Fc- und Kollagenrezeptoren gewährleistet (Muro et al., 1987; Stang et al., 1990; Smedsrod 2004). Durch ihre Oberflächenmoleküle sind LSEC in der Lage sowohl T-Zellen zu rekrutieren als auch diesen prozessierte Antigene zu präsentieren, was für organständige Zellen aus nicht-lymphatischem Gewebe untypisch ist (Limmer und Knolle 2001; John und Crispe 2004). Einen entscheidenden Beitrag zur konstitutiven Interaktion zwischen LSEC und intraluminalen Lymphozyten leistet die Mikrozirkulation in den Lebersinusoiden, die diskontinuierlich ist und eine sehr geringe Flussgeschwindigkeit aufweist (McCuskey und Reilly 1993; MacPhee et al., 1995). Die Sinusendothelzellen haben niedrigere Expressionsniveaus der zur Antigenpräsentation gebrauchten Proteine als andere APC wie DC und Makrophagen und werden als nicht-professionelle APC angesehen (Limmer und Knolle 2001). Eine Exposition gegenüber inflammatorischen Zytokinen führt bei makrovaskulären Endothelzellen zur Induktion von Oberflächenproteinen und Änderung des Phänotyps (Mantovani et al., 1992; Hauser et al., 1993). Wenn z.B. an einem Infektionsherd TNF- α und IFN- γ lokal durch aktivierte T-Zellen ausgeschüttet werden, ruft das eine gesteigerte Expression der Liganden ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen hervor (Murphy et al., 2009).

Die MHC-I-restringierte Präsentation von exogenen Antigenen durch LSEC wird als Kreuzpräsentation bezeichnet und induziert einen tolerogenen Phänotyp in CD8⁺ T-Zellen (Limmer et al., 2000). Diese CD8⁺ T-Zell-Toleranz wird wesentlich über das B7-H1-Molekül der LSEC-Membran vermittelt (Diehl et al., 2008). Auch die MHC-II-restringierte Antigenpräsentation im CD4⁺ T-Zell-Kontext führt zur Induktion von Toleranz. Ferner können die Sinusendothelzellen der Leber im Gegensatz zu professionellen APC, naive CD4⁺ T-Zellen nicht zum Th1-Phänotyp polarisieren (Knolle et al., 1999b). Vielmehr zeigen LSEC-*geprimte* CD4⁺ T-Zellen Eigenschaften, die für regulatorische T-Zellen typisch sind, obwohl sie den Transkriptionsfaktor FoxP3 klassischer T_{regs} nicht exprimieren und niedrige Expressionsniveaus für CD25 aufweisen (Kruse et al., 2009).

2 Zielsetzung

Die Leber erfüllt neben wichtigen metabolischen Aufgaben auch immunologische Funktionen. Einerseits muss die Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen wie den oralen Nahrungsmittelantigenen erhalten bleiben. Andererseits ist eine Immunantwort gegen Pathogene sehr wichtig. In diesem Organ enden Infektionen mit Krankheitserregern wie z.B. die Hepatitisviren oft nicht mit einer Rekonvaleszenz, sondern mit einer Chronifizierung. Den verschiedenen hepatischen Zellpopulationen und insbesondere dem Lebersinusendothel werden Fähigkeiten zur Toleranzinduktion zugeschrieben. LSEC induzieren unter homöostatischen Bedingungen einen tolerogenen Phänotyp in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Es ist aber nicht bekannt, ob diese LSEC-induzierte Toleranz auch in der inflammatorischen Situation erhalten bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss einer Inflammation auf die toleranzinduzierenden Eigenschaften der LSEC gegenüber T-Zellen untersucht werden. Folgende Fragestellungen wurden dabei näher betrachtet:

- 1) Welche Phänotypänderungen erfahren LSEC unter inflammatorischen Bedingungen?

Der Phänotyp von LSEC wurde nach *in-vitro*-Kultur mit Th1-Zellen in An- und Abwesenheit eines spezifischen Antigens oder mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ ermittelt.

- 2) Können inflammatorisch aktivierte LSEC einen tolerogenen Phänotyp in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induzieren?

Die Proliferationsstärke, der Aktivierungsgrad und die Zytokinproduktion antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden nach *in-vitro*-Kultur mit inflammatorisch aktivierten LSEC analysiert.

- 3) Welche Rolle spielt der PD-1/B7-H1-Mechanismus im *Priming* von CD4⁺ T-Zellen durch inflammatorisch aktivierte LSEC?

In *in-vitro*-Kulturen wurde der Einfluss einer B7-H1-Blockierung auf den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen untersucht, denen ein spezifisches Antigen durch inflammatorisch aktivierte LSEC präsentiert wurde.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Laborgeräte

Tabelle 1: Allgemeine Laborgeräte

Geräte	Modell (Firma, Ort, Land)
Absaugpumpe	AF 20x (Haep Labor Consult, Bovenden, DE)
Bechergläser	50 ml, 250 ml, 400 ml (Duranglas, Mainz, DE)
Brutschränke	CB 150 (Binder, Tuttlingen, DE) B 6200 (Thermo Scientific Heraeus, Osterode, DE)
Deckgläschen	MENZEL - Deckgläser 20 x 26 mm (Gerhard Menzel, Braunschweig, DE)
Durchflusszytometer	FACSCanto II (Becton Dickinson (BD), Heidelberg, DE)
MACS-Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
MACS-Ständer	MACS® MultiStand Station (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE)
Magnetrührer	IKAMAG REO (IKA-Labortechnik, Staufen, DE)
Mikroskop	AE20 (Motic Deutschland, Wetzlar, DE)
Pipetten	1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE)
Pipettierhilfen	Pipetboy acu (Integra Bioscience, München, DE) Accu-jet pro (Brand, Wertheim, DE)
Reinstwasseranlage	Milli-Q RG (Millipore, Schwalbach/Ts., DE)
Schüttler, horizontal	KS10 DIGI (Edmund Bühler, Hechingen, DE)
Siebe, Metall-	Ø 12 cm (GEFU, Eslohe, DE) Rotilabo®-Rundsieb (Carl Roth, Karlsruhe, DE)
Vortexer	Vortex Mixer SA8 (Bibby Scientific, Staffordshire, GB) Vortex Mixer VM-300 (Gemmy Industrial, Taipei, TW)
Wasserbad	U3 (Julabo, Seelbach, DE)
Werkbank, steril	Herasafe HS 18 (Kendro, Langenselbold, DE) MSC-Advantage 1.8 (Thermo Scientific, Langenselbold, DE)
Zählkammer	Neubauer improved (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen,

	DE)
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 2.0R (Thermo Scientific, Osterode, DE) Heraeus Multifuge 1S-R (Thermo Scientific, Osterode, DE) Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific, Osterode, DE)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Modell (Firma, Ort, Land)
Einmalpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml (BD Falcon™, Berlin, DE)
Einmalröhrchen	5 ml Rundbodenröhrchen (BD Falcon™, Berlin, DE)
Filtersystem	Steritop-GP, 0,22 µl (Merck Millipore, Billerica, US)
Kanülen	Microlance 27G 3/4 0,4x19 mm (Becton Dickinson, Heidelberg, DE)
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Parafilm	Parafilm M (Bemis Flexible Packaging, Oshkosh, US)
Petrischalen	Ø 100 mm (Carl Roth, Karlsruhe, DE)
Pipettenspitzen	1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE) 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Sarstedt, Nümbrecht, DE) 100-1000 µl mit Filter (Nerbe Plus, Winsen/Luhe, DE)
Präseparationsfilter	30 µl (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DE)
Reaktionsgefäße	1,5 ml Safe-Lock (Sarstedt, Nümbrecht, DE)
Spritzen	10 ml, 20 ml (Becton Dickinson, Heidelberg, DE)
Zellkulturplatten	6-, 24-Loch (Corning Incorporated Costar, Lowell, Massachusetts, US)
Zellkulturröhrchen	PS-Röhrchen, 12 ml, steril, (Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE)
Zellsiebe	100 µm „Cell strainer“ (BD Falcon™, Berlin, DE)
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml konische Röhrchen (BD Falcon™, Berlin, DE)

3.3 Chemikalien, Reagenzien und Proteine

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Proteine

Substanz	Firma, Ort, Land
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, DE
Accutase	PAA Laboratories, Pasching, AT
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Carboxyfluoreszein-Succinimidylester (CFSE)	MoBiTec, Göttingen, DE
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 4,5 g/l Glucose, + L-Glutamine	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, DE
Ethanol (70 %)	J.T.Baker, Mallinckrodt-Deventer, NL
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	Linaris, Wertheim, DE
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Hühnereiweißalbumin (OVA), Grad V	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Ionomycin Calcium Salt (IM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Kollagenase Typ IV	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
MACS MicroBeads: anti-FITC, -PE, -Cy5, - Maus-CD62L	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
MultisortBeads (anti-FITC) und MultiSort Release Reagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin, DE
Nycodenz	NycoPrep™ Universal (Nycodenz 60 %), Axia-Shield, Oslo, NO
Ovalbuminpeptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid) mit der Sequenz ISQAVHAAHAEINEAGR	Institut für Biochemie, Humboldt-Universität zu Berlin, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, DE
Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, DE
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Release Reagent (35 µl/ml Zellsuspension)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DE
Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640, + L-Glutamine, + HEPES	PAA Laboratories, Pasching, AT
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

3.4 Medien und Puffer

Tabelle 4: Medien und Puffer

Medien und Lösungen	Bestandteile
Erylyse-Puffer (pH 7,5)	10 mM KHCO ₃ , 155 mM NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA, Millipore-Wasser
Fixierungslösung	PBS, 2 g/l PFA
Gelatine	PBS, 0,2 % Gelatine
Komplett-DMEM (cDMEM)	DMEM Gibco®, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA, 100 U/ml Penicillin und Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol
Komplett-RPMI (cRPMI)	RPMI 1640, 10 % FCS, 1 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol
Nycodenz-Lösung (17 % ig)	26 % RPMI 1640 farblos, 17 % Nycoprep™ Universal (60 % ige Lösung), 10 % FCS, 36 % Aqua dest.
Nycodenz-Lösung (30 % ig)	50 % Nycoprep™ Universal, 50 % Aqua dest.
Phosphate buffered saline (PBS)	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,4 g/l Na ₂ HPO ₄ H ₂ O
PBS/BSA	PBS, 2 g/l BSA
Saponin-Puffer	PBS, 5 g/l Saponin, 2 g/l BSA

Th1-polarisierendes Medium	cRPMI, 20 ng/ml IFN- γ , 10 ng/ml IL-12,
Verdaumedium	5 μ g/ml anti-IL-4, 5 μ g/ml OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid RPMI 1640, 5 % FCS, 0,5 mg/ml Kollagenase Typ IV, 0,02 mg/ml DNase I
Waschmedium	RPMI 1640, 5 % FCS, 1 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und Streptomycin, 50 μ M β - Mercaptoethanol

3.5 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Verwendete AntikörperAntigen	Fluoro-chrom	Spezies	Isotyp	Klon	Hersteller
CD4	FITC	Ratte-anti-Maus (R α M)	IgG2a	RM4-5	BD
CD8a	FITC	R α M	IgG2a	53-6.7	BD
	PE	R α M	IgG2a	53-6.7	BD
CD25	APC	R α M	IgG1	PC61	BD
CD44	PE	R α M	IgG2b	IM7	BD
CD54 (ICAM-1)	PE	Armenischer Hamster-anti-Maus	IgG1	3E2	BD
CD90.1	PE	Maus-anti-Maus	IgG1	OX-7	BD
CD90.2	PE	R α M	IgG2a	53-2.1	BD
CD106 (VCAM-1)	Cy5	R α M	IgG2a	6C71	DRFZ
CD 146	FITC	R α M	IgG2a	ME-9F1	DRFZ
	PE	R α M	IgG2a	ME-9F1	BioLegend
CD 274 (B7-H1, PD-L1)	PE unkonjugiert	R α M	IgG2a	MIH5	BD
MCH-II	Cy5	R α M	IgG2a	M5/114	DRFZ
IFN- γ	APC	R α M	IgG1	XMG1.2	BD
IL-4	unkonjugiert	R α M	IgG1	11B11	DRFZ

Fc γ -Rezeptor II/III	unkonjugiert	R α M	IgG2b	2.4G2/75	DRFZ
Fc γ -Rezeptor II/III	unkonjugiert	R α M	IgG2b	2.4G2	eBioscience

3.6 Rekombinante Mauszytokine

Tabelle 6: Rekombinante Mauszytokine

Zytokin	Konzentration (μ g/ml)	Hersteller
IFN- γ	20	BD PharMingen, Heidelberg, DE
IL-12	5	BD PharMingen, Heidelberg, DE
TNF- α	10	Immunotools, Friesoythe, DE

3.7 Computerprogramme

Tabelle 7: Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FlowJo Version 8.4.5	Tree Star, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

3.8 Tiermodelle

Zur Durchführung der Experimente wurden Organe aus zuvor getöteten Wildtypstamm-Mäusen (C57BL/6 (H-2^b)) entnommen, die von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin, Berlin bezogen wurden. Zusätzlich wurden Tiere aus OVA-TCR-transgenen Mausstämmen (Bundesamt für Risikobewertung, Berlin) zur Organentnahme getötet: CD90.1⁺ OT-I (Hogquist et al., 1994) und CD90.1⁺ bzw. CD90.2⁺ OT-II (Barnden et al., 1998). Die CD8⁺ T-Zellen der OT-I Mäuse exprimieren einen OVA-spezifischen TCR, der das auf MHC-I (Molekül H-2K^b) präsentierte Albumin aus Hühnereiweiß (OVA), Grad V erkennt. Die CD4⁺ T-Zellen der OT-II Tiere exprimieren einen OVA-spezifischen TCR, der das auf MHC-II (Molekül I-A^b) präsentierte OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid erkennt (Robertson et al., 2000).

Alle Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen entsprechend nationaler Richtlinien gehalten. Die Tiere wurden vor der Organentnahme (Leber, Milz und Lymphknoten) durch zervikale Dislokation getötet. Die Tötungen wurden nach entsprechender Genehmigung

vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (Berlin) unter der Tötungsnummer T 0183/07 durchgeführt.

3.9 Isolation und *in-vitro*-Kultur primärer Zellen

3.9.1 Prinzip der Magnet-aktivierten Zellsortierung

Die Isolation von Zellpopulationen wurde mittels magnetischer Zellsortierung (*magnetic cell sorting*, MACS) durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht die hochspezifische Sortierung verschiedener Zellpopulationen. Zuerst werden die Zellen mit Hilfe eines feinen Zellfilters voneinander getrennt, so dass eine Einzelzellsuspension entsteht. Anschließend werden die zu isolierenden Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert, welche gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet und an magnetischen Beads gekoppelt sind. Alternativ können die Zellantigene zuerst mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Primär-Antikörper markiert werden. Dann wird dieser Farbstoff von einem Bead-konjugierten monoklonalen Sekundär-Antikörper gebunden (Abb. 2). Die Gesamtzellsuspension wird auf eine MACS-Säule gegeben und ein starkes Magnetfeld angelegt. Somit wird die mit Beads markierte Zellpopulation als Positivfraktion in der Säule zurückgehalten, während die Negativfraktion durch mehrmaliges Spülen mit Medium eliminiert wird. Nach Entfernung des Magnetfeldes wird die gewünschte Zellpopulation aus der Positivfraktion mit Puffer eluiert. Die Beads bleiben auf den Zellen haften, ohne vor einer nachfolgenden Kultur entfernt werden zu müssen.

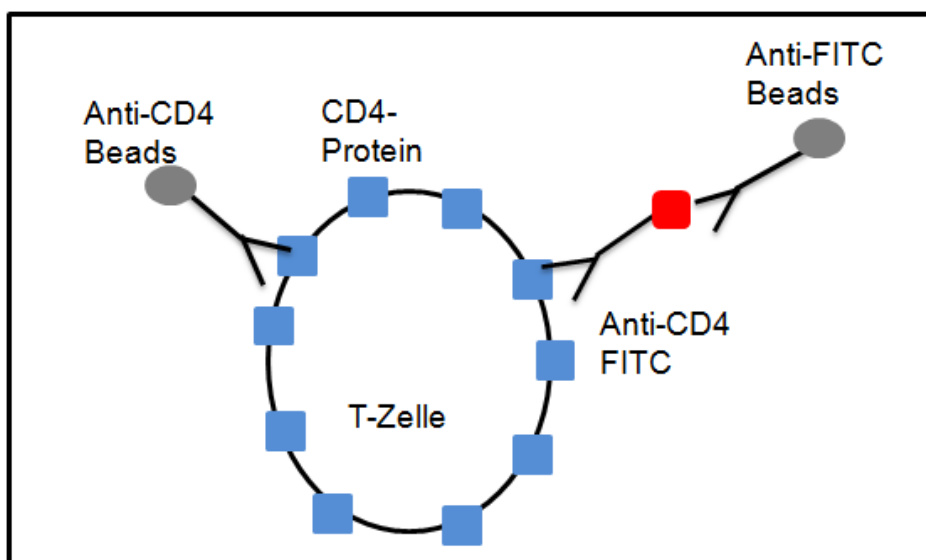


Abbildung 2: Prinzip der magnetischen Zellsortierung.

3.10 *Ex-vivo*-Isolation von Einzelzellen aus murinen Lymphknoten und Milz

Zur Gewinnung von Einzelzellen wurden die Milz sowie die peripheren (*Lnn. inguinales, axillares, cervicales superficiales et mandibulares*) und mesenterialen Lymphknoten der getöteten Tiere abpräpariert und in steriles PBS/BSA aufgenommen. Die entnommenen Organe wurden zunächst mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein grobes Metallsieb gedrückt und erneut in PBS/BSA aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde durch ein feines Zellsieb passiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Daraufhin wurden die Zellen in je 1 ml Erylyse-Puffer pro entnommene Milz aufgenommen und auf Eis für 5 Minuten inkubiert, um in der Zellsuspension enthaltene Erythrozyten zu lysieren. Die Reaktion wurde durch einen Waschschrift beendet, indem die Zellen in 50 ml PBS/BSA aufgenommen und bei 350 g für 8 Minuten bei 4 °C zentrifugiert wurden. Dann wurden sie mit einer Zählkammer in Anwesenheit von Trypanblau gezählt. Dieser Farbstoff diffundiert durch die beschädigte Zellmembran der toten Zellen, färbt sie dunkelblau und ermöglicht unter dem Mikroskop deren Unterscheidung von vitalen Zellen. Es konnte eine Zellzahl von $13,27 \times 10^7$ Zellen $\pm 3,74 \times 10^7$ aus einer OT-II und $12,9 \times 10^7$ Zellen $\pm 3,28 \times 10^7$ aus einer OT-I Maus gewonnen werden. Anschließend erfolgte nach einmaligem Waschen die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen an der Zelloberfläche mit dem anti-Fc γ -RII/III-Antikörper (20 μ g/ml) bei einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml.

3.10.1 *Ex-vivo*-Isolation von CD4⁺ T-Zellen

Zur Isolation von CD4⁺ T-Zellen wurde das MACS-Verfahren benutzt. Der zuvor erhaltenen erythrozytenfreien Zellsuspension (10^8 Zellen/ml) wurde ein anti-CD4-FITC-Antikörper (2,5 μ g/ml) zugesetzt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Somit wurden die CD4-Oberflächenantigene mit FITC-Antikörper markiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^8 /ml mit Anti-FITC MicroBeads (1:10) für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem neuen Waschschrift wurden die Zellen in PBS/BSA resuspendiert. Mittels MACS konnten $1,92 \times 10^7$ CD4⁺ T-Zellen $\pm 3,875 \times 10^6$ pro OT-II Maus mit einer Reinheit von 97 % isoliert werden.

Analog erfolgte auch die Isolation von naiven CD4⁺ T-Zellen. Diese wurden wegen ihrer hohen CD62L-Expression im Unterschied zu den differenzierten CD4⁺ T-Zellen als CD4⁺CD62L⁺ definiert. Zunächst wurde die Zellsuspension mit anti-CD4-FITC-Antikörper und nachfolgend mit Anti-FITC MultiSort Microbeads (1:11) inkubiert. Die mittels MACS isolierten Zellen der

Positivfraktion wurden mit einem MultiSort-Release-Reagenz (35 µl/ml bei $2,8 \times 10^7$ Zellen/ml) 10 Minuten auf Eis und 20 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert, um die Microbeads von den Antikörpern zu entfernen. Anschließend wurden die magnetischen Beads nach erneuter MACS von der Einzelzellsuspension depletiert. Die gewonnenen Bead-freien $CD4^+$ T-Zellen der Negativfraktion wurden zur Depletion restlicher MHC-II⁺ Zellen nacheinander mit dem anti-MHC-II-Cy5-Antikörper und anti-Cy5-Beads (1:10) markiert. Nach nochmaliger Sortierung wurde die MHC-II⁻ Negativfraktion mit anti-CD62L-MicroBeads (1:40) inkubiert. Danach folgte die Selektion der $CD4^+$ MHC-II⁻ $CD62L^+$ T-Zellen in der Positivfraktion des letzten *Sorts*. Es konnte eine Zellzahl von $4,9 \times 10^6$ /ml Zellen $\pm 1,07 \times 10^6$ pro OT-II Maus mit einer Reinheit von 99 % isoliert werden.

3.10.2 *Ex-vivo*-Isolation von antigenpräsentierenden Zellen

Die Zellen der CD4-depletierten Negativfraktion (3.10.1), die überwiegend aus der Milz stammen, wurden als APC definiert und *spleen-derived antigen presenting cells* (SAPC) genannt. Es konnten $5,75 \times 10^7$ SAPC $\pm 1,35 \times 10^7$ pro OT-II Maus gewonnen werden, die bei den Zellkulturen eingesetzt wurden.

3.10.3 *Ex-vivo*-Isolation naiver $CD8^+$ T-Zellen

Die Isolation von naiven $CD8^+$ T-Zellen erfolgte analog zu 3.10.1. Das Oberflächenprotein CD8 wurde mit einem monoklonalen anti-CD8-FITC-Antikörper (1 µg/ml) markiert. Unter Verwendung von Anti-FITC MultiSort Microbeads und MultiSort Release Reagenz konnte eine Beads-freie Negativfraktion mit $CD8^+$ T-Zellen separiert werden. Diese wurde anschließend nacheinander von MHC-II⁺ sowie $CD44^+$ Zellen depletiert, um noch vorhandene professionelle APC und schon aktivierte $CD8^+$ T-Zellen zu eliminieren. Hierzu wurden anti-MHC-II-Cy5-Antikörper und Anti-Cy5-MicroBeads (1:10) sowie anti-CD44-PE-Antikörper (0,4 µg/ml) und Anti-PE-MicroBeads (1:10) benutzt. Es konnte eine Zellzahl von $9,03 \times 10^6$ /ml $CD8^+$ MHC-II⁻ $CD44^-$ T-Zellen $\pm 3,27 \times 10^6$ pro OT-I Maus mit einer Reinheit von 99 % isoliert werden.

3.11 *Ex-vivo*-Isolation von Sinusendothelzellen aus muriner Leber

Zur Isolation von Sinusendothelzellen wurde die Leber zunächst *in situ* über die *V. portae* mit 2 ml auf Raumtemperatur (RT) aufgewärmtem Verdaumedium durchspült. Dann erfolgte die

Durchtrennung der *V. cava inferior*. Dadurch konnte das Blut aus der perfundierten Leber zum größten Teil entfernt werden, was an ihrer heller werdenden Farbe zu erkennen war.

Danach wurde die Gallenblase entfernt, um dem Kontakt der Zellen mit den in der Galle enthaltenen Enzymen zu vermeiden. Als Nächstes wurde die Leber durch Präparation entnommen und bis zur weiteren Behandlung in Verdaumedium aufbewahrt. Anschließend wurden die aus sieben bis zehn Mäusen abpräparierten Organe mit Hilfe einer gebogenen Schere in einer Petrischale zerkleinert, das erhaltene Gewebe in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Verdaumedium aufgefüllt. Nachfolgend erfolgte der enzymatische Verdau bei 37 °C für 10 Minuten unter Schütteln mit 100 Zyklen pro Minute.

Nach dem Verdau wurde das durch die DNase I und Kollagenase Typ IV aufgelockerte Lebergewebe mit Hilfe eines Spritzenstempels zuerst in einer Petrischale durch ein grobes Metallsieb gedrückt. Der Inhalt wurde dann durch ein feines Zellsieb passiert und bei 20 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Nur die Zellen im Überstand wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Waschmedium (WM) aufgefüllt. Dadurch konnten die größeren und schwereren Hepatozyten sowie Binde- und Fettgewebe im Pellet beseitigt werden. Nach einmaligem Waschen der gewonnenen Zellen erfolgte die Lyse der restlichen Erythrozyten durch Inkubation mit Erylyse-Puffer (1 ml/Leber) für 5 Minuten auf Eis. Anschließend folgte eine Dichtegradientenzentrifugation zur Abtrennung der gewünschten endothelialen von den kontaminierenden parenchymatösen Zellen. Dazu wurden je 2 ml WM in 12 ml Zellkulturröhrchen vorgelegt und die Gesamtzellsuspension (ca. 1 ml Pelletvolumen pro Leber) in 6,5 ml Nycodenz (30 % ig) pro Leber aufgenommen. Daraus resultierte eine Zellsuspension (ca. 7,5 ml pro Leber) in 26 % iger Nycodenzlösung, die unter die vorgelegten 2 ml WM geschichtet wurde. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 1300 g und RT, ohne Bremse. Nach dem Gradienten enthielt die Interphase die endothelialen Zellen, die abgesammelt, gewaschen und gezählt wurden. Es konnte eine Zellzahl von $18,22 \times 10^6$ Zellen $\pm 3,78 \times 10^6$ pro Leber isoliert werden.

Die erhaltenen Zellen wurden in einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml in PBS/BSA aufgenommen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den monoklonalen anti-CD146-FITC (Schrage et al., 2008) oder -PE-Antikörper (0,714 µg/ml) sowie dem polyklonalen anti-FcγRII/III-Antikörper (20 µg/ml) für 10 Minuten bei 4 °C. Nach dem Waschen wurden die schon FITC- oder PE-markierten CD146⁺ Zellen mit Anti-FITC- (1:5) bzw. Anti-PE-Beads (1:5) für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und nachfolgend mittels MACS isoliert. Es konnte eine Zellzahl von $3,69 \times 10^6$ LSEC $\pm 1,37 \times 10^6$ pro Leber einer C57BL/6 Wildtyp Maus mit einer Reinheit von minimal 96 % isoliert werden.

Für die LSEC-Kultur wurde jedes Loch einer 24-Loch-Zellkulturplatte mit 0,2 % tigem Gelatine für mindestens 30 Minuten bei RT vorbeschichtet und anschließend mit proteinfreiem PBS einmal gespült. Die isolierten CD146⁺ LSEC wurden in cDMEM in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen und je 1 ml der Zellsuspension pro Plattenloch eingegeben. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Am nächsten Tag wurden die LSEC mit WM abgespült, um tote sowie nicht haftende Zellen zu entfernen. Mikroskopisch wurde überprüft, ob die adhärent wachsenden LSEC einen einschichtigen Zellrasen (*Monolayer*) auf der Gelatine-Oberfläche gebildet hatten. Dabei stieg die Reinheit der Kultur auf 99 %.

3.12 In-vitro-Kultur

3.12.1 In-vitro-Differenzierung von Th1-Zellen

Zur Differenzierung von Th1-Zellen wurden CD4⁺ T-Zellen mit SAPC im Verhältnis 1:3 gemischt und mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (5 µg/ml) enthaltendem, Th1-polarisierendem Medium in Kultur genommen. Es wurden je 1×10^7 Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in die Vertiefung einer 6-Lochplatte gegeben. Insgesamt enthielt jede angelegte Kultur 1×10^7 CD4⁺ T-Zellen und 2×10^7 SAPC in 15 ml Th1-polarisierendem Medium.

Die Th1-Kultur wurde anschließend bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am Tag 3 wurde der Kultur frisches cRMPI im Verhältnis 1:3 zugeführt und am Tag 6 wurden die Zellen abgeerntet. Um die lebendigen von den toten Zellen abzutrennen, wurde nach einem Waschschrift eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierbei wurden die Th1-Zellen in WM aufgenommen und jeweils 3 ml dieser Zellsuspension auf 3 ml Nycodenz (17 %) gegeben, die schon in ein Gradientenröhrchen vorgelegt waren. Nach einer Zentrifugation bei 840 g für 10 Minuten, mit Bremse und bei RT wurden die gewünschten lebendigen Th1-Zellen aus der Interphase abgesammelt. Die toten Zellen und deren Bestandteile sedimentierten dagegen zum Boden des Gradientenröhrchens. Es konnten $3,78 \times 10^6$ Th1-Zellen $\pm 0,92 \times 10^6$ pro ml Th1-Kultur gewonnen werden.

3.12.2 *In-vitro*-LSEC-Kultur unter inflammatorischen Bedingungen

Um Phänotypänderungen der LSEC unter Inflammation zu untersuchen, wurden diese bei verschiedenen Bedingungen für 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Gemäß 3.11 wurden LSEC-Kulturen angelegt. Zur Simulation einer Entzündungsreaktion dienten folgende Gruppen:

In-vitro-Kokultur mit 1×10^6 Th1-Zellen

In-vitro-Kokultur mit 1×10^6 Th1 in Anwesenheit von 5 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid

In-vitro-Kokultur mit 1×10^6 restimulierten Th1

In-vitro-Kokultur mit 1×10^6 restimulierten Th1 in Anwesenheit von 5 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid

In-vitro-Kultur mit TNF-α (10 ng/ml) und IFN-γ (20 ng/ml)

Nach der Inkubation der Ansätze über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt wurden die LSEC zuerst gründlich mit PBS/BSA gespült, um die Th1-Zellen bzw. die Zytokine zu entfernen. Erneut wurde der LSEC-Monolayer mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die LSEC jedes Plattenlochs in 500 µl Accutase für 7 Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert, um sie von der Zellkulturplatte abzulösen. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS/BSA gewaschen und nach Oberflächenmarkierung am Durchflusszytometer analysiert.

3.12.3 *In-vitro*-Kokultur von LSEC und naiven T-Zellen

Um die antigenpräsentierenden Eigenschaften inflammatorisch veränderter LSEC und deren Auswirkungen auf den Aktivierungszustand und Proliferation von naiven CD4⁺CD62L⁺ und CD8⁺MHC-II⁻CD44⁻ T-Zellen analysieren zu können, wurden *in-vitro*-Kulturen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Vorbereitung der LSEC-Kultur, dann wurden naive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen isoliert und mit CFSE markiert. Anschließend wurden diese in cRPMI aufgenommen und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen auf die LSEC gegeben. Um eine spezifische Antigenpräsentation zu ermöglichen, wurde der Kokultur 5 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid bzw. 1 µg/ml OVA zugefügt. Bei einigen Experimenten wurde eine B7-H1-Blockierung durchgeführt, indem den LSEC-Kulturen der anti-B7-H1-Antikörper (40 µg/ml) unmittelbar vor der Kokultur mit T-Zellen zugegeben wurde. Am Tag 3 der Kokultur wurden pro Plattenloch jeweils 300 µl frisches cRPMI zugegeben. Am Tag 6 erfolgte die Aberntung der T-Zellen und nach Oberflächen- und Intrazellulärmarkierung die durchflusszytometrische Analyse.

Als Positivkontrolle wurden SAPC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen generiert. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden zusammen mit SAPC in cRPMI aufgenommen und im Verhältnis 1:3 in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (5 µg/ml) kokultiviert. Insgesamt wurden bei jeder angelegten Kultur 2 x

10^6 CD4⁺CD62L⁺ und 4×10^6 CD4⁻ Zellen in 4 ml cRPMI aufgenommen und in einer 6-Loch-Zellkulturplatte für 6 Tage kokultiviert. Am Tag 3 der Kokultur wurden die Zellen mit cRPMI im Verhältnis 1:3 gesplittet, um am Tag 6 abgeerntet und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Die SAPC-geprägten CD4⁺ T-Zellen wurden T_{SAPC} (Kruse et al., 2009) genannt.

3.13 Durchflusszytometrie

3.13.1 Analyse von Zellpopulationen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Zellanalyse, das die Untersuchung vielfältiger Eigenschaften einer großen Zellanzahl in kürzester Zeit ermöglicht. Einzelne Zellen werden in einem feinen Flüssigkeitsstrahl durch eine Kapillare geführt und mit einem Laserstrahl definierter Wellenlänge durchleuchtet. Passiert die Zelle durch den Laserstrahl, kommt es zur Lichtstreuung. Durch die Markierung von Zellbestandteilen mit einem farbstoff-gekoppelten monoklonalen Antikörper kann eine Lichtemission erzeugt werden. Der jeweilige Farbstoff (Fluorochrom) wird durch den entsprechenden Laser angeregt und emittiert ein Fluoreszenzlicht von einer bestimmten Wellenlänge. Im Anschluß messen hochempfindliche Photodetektoren (Photomultiplier) sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht und wandeln es in elektrische Signale um. Dadurch wird Information über die Größe und Granularität der Zellen sowie über die Expression der markierten Zellmoleküle gewonnen.

Die Messungen wurden mit Hilfe von einem FACSCantoII mit Drei-Laser-Technik durchgeführt. Dieses Durchflusszytometer kann durch violettes (405 nm), blaues (488 nm) und rotes (633 nm) Licht die entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe anregen. Die anschließende Datenauswertung erfolgte mit den Computerprogrammen BD FACSDiva und FlowJo.

Benutzte Fluorochrome:

Tabelle 8: Verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Exzitation (nm)	Emission (nm)
Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)	495	519
Phycoerythrin (PE)	480;565	578
Allophycocyanin (APC)	650	660
Indodicarbocyanin (Cy5)	650	670
Carboxyfluoreszein-Succinimidylester (CFSE)	492	517
Propidium Iodid (PI), interkaliert	536	617

3.13.2 Markierung und Nachweis von Oberflächenmolekülen

Die Zellen mussten vor der Markierung ihrer Oberflächenproteine durch einen Waschschritt vorbereitet werden. Anschließend wurden sie in 5 ml Einmalröhrchen aufgenommen, mit jeweils 100 µl Färbelösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zur Minimierung von unspezifischen Antikörperbindungen wurde der anti-FcγRII/III-Antikörper (20 µg/ml) benutzt. Die Identifikation der zu analysierenden Zellpopulation erfolgte mittels anti-CD146-FITC (Schrage, et al., 2008), anti-CD90.1-PE (0,29 µg/ml), anti-CD90.2-PE (0,2 µg/ml) und anti-CD8-PE (0,67 µg/ml). Gleichzeitig fanden zur Phänotypisierung der ermittelten Populationen nach erfolgter Kultur folgende Antikörper Einsatz: anti-CD54-PE (0,13 µg/ml), anti-CD106-Cy5 (2 µg/ml), anti-CD274-PE (0,4 µg/ml), anti-CD25-APC (0,4 µg/ml) und anti-MHC-II-Cy5 (0,884 µg/ml). Zum Beenden der Markierung wurden die Zellen gewaschen, mit PBS/BSA resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

Die LSEC sowie die T-Lymphozyten unterscheiden sich in ihrer Größe und Granularität von anderen Zelltypen und können dank charakteristischer Oberflächenproteine identifiziert werden. Alle Zellen wurden zuerst nach den ermittelten Werten für die erzeugte Pulsfläche durch das charakteristische Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC-A/SSC-A) zweidimensional als Punktwolke (*Dotplot*) dargestellt und ein Lymphozyten- oder LSEC-Gate gelegt (Abb. 3A-C). Hierdurch wurden Zelltrümmer und ungewünschte Zellen von der weiteren Auswertung eliminiert. Die T-Zell-Populationen wurden zusätzlich je nach vom Streulicht erzeugter Pulsweite bzw. -höhe (SSC-W/FSC-H) dargestellt (Abb. 3B und C), um die Zelldoubletten und -klumpen aus der weiteren Analyse auszuschließen. Bei allen Oberflächenmarkierungen wurde unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer Propidiumiodid (PI) eingesetzt, das beschädigte Zellmembranen durchdringen und in ihre doppelsträngige DNA interkalieren kann.

Durch das Ausgrenzen von PI⁻ Zellen ließen sich tote Zellen in der weiteren Betrachtung ausschließen (Abb. 3). Es wurde sichergestellt, dass nur Zellen in die weitere Auswertung eingeschlossen sind, die folgende Fluorochrom-markierte Oberflächenantigene besitzen: CD146-FITC auf LSEC (Abb. 3A), CD90.1- oder CD90.2-PE auf den entsprechenden CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3B) und CD8-PE auf CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3C).

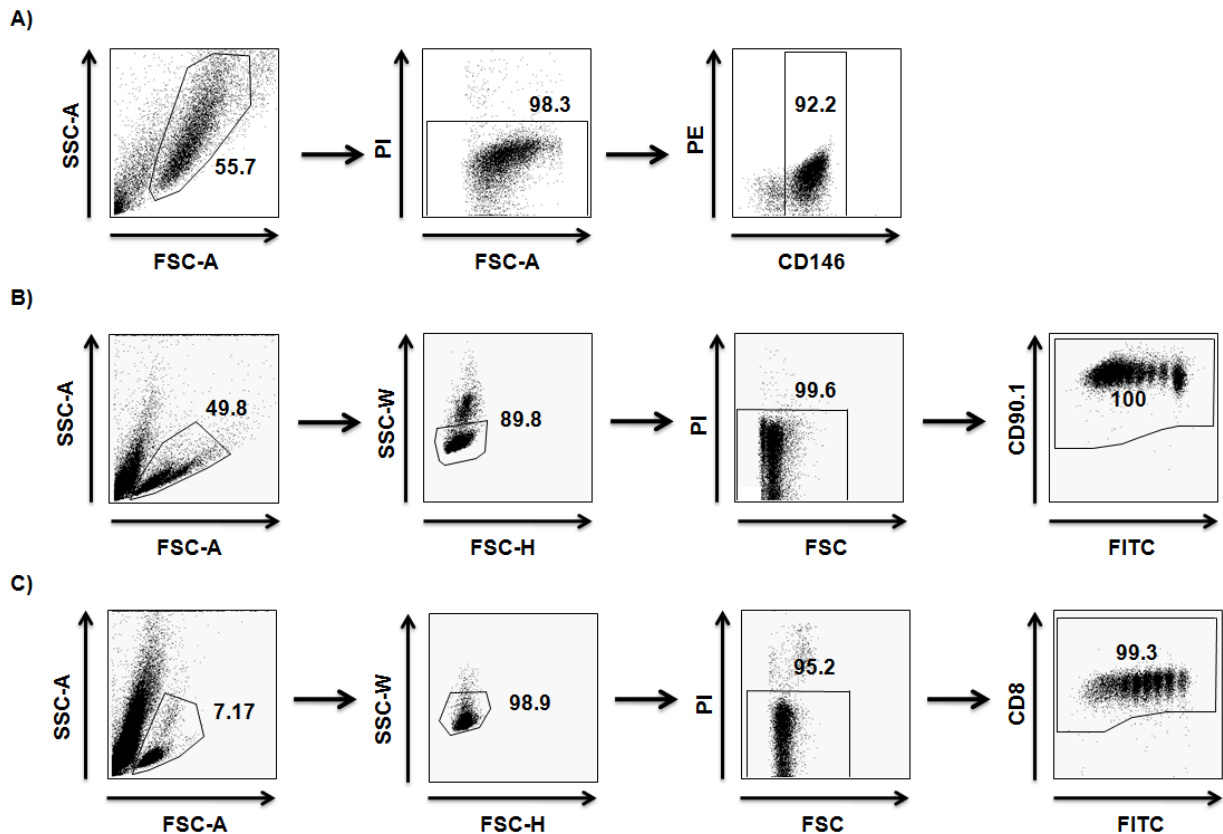


Abbildung 3: Identifikation der zu analysierenden Zellpopulationen im Dotplot.

A, Dargestellt ist eine LSEC-Kontrollaufnahme, die zum Festlegen der Gates diente. Hier wurden zuerst Zellen der erwarteten Größe als Punktwolke eingegrenzt und die toten Zellen nach PI-Gating aus der Wertung genommen. Dann wurde ein Gate auf die CD146⁺ Zellen gelegt. **B**, Analog zu **A** erfolgte die Eingrenzung der T-Zell-Population und durch ein weiteres Gate wurden die Zelldoubletten und -klumpen eliminiert. Dann folgte ein PI-Gating für die Ausgrenzung der toten Zellen. Die Identifikation von CD90.1⁺ oder CD90.2⁺CD4⁺ T-Zellen hat sichergestellt, dass die zu analysierende Zellpopulation nur aus T-Zellen besteht. **C**, Analog zu **B** wurden nur CD8⁺ T-Zellen in die Auswertung genommen.

3.13.3 T-Zell-Restimulierung und intrazelluläre IFN- γ -Markierung

Durch die Restimulierung werden die zu analysierenden Zellen aktiviert und ihre Zytokinproduktion induziert. Zunächst wurden die Zellen gewaschen und mit cRPMI in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 10 ng/ml Phorbol-Myristat-Azetat (PMA) und 500 ng/ml Ionomycin (IM) inkubiert. Dabei wird die Phospholipase C (PMA) aktiviert und die intrazelluläre Kalziumkonzentration gesteigert, was

zur T-Zell-Aktivierung mit entsprechender Zytokinexpression führt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurden die T-Zellen entweder gewaschen, in cRPMI aufgenommen und für Kokulturen verwendet oder für eine intrazelluläre Zytokinmarkierung herangezogen. Bei Letzterem wurde jeder Zellsuspension Brefeldin A (10 µg/ml) zugegeben, um die Zytokinsekretion aus dem Intrazellulärraum zu beenden.

Nach weiteren drei Stunden Inkubation wurde die Restimulierung gestoppt und die Zellen gewaschen. Anschließend erfolgten nacheinander die Markierung der Oberflächenproteine und die Fixierung der Zellen in 2 % igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 Minuten im Dunkeln. Dann wurde PBS/BSA dazugegeben und die Zellen in 0,5 % igem PFA bis zur weiteren Behandlung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Darstellung des intrazellulären IFN- γ mussten die Zellmembranen permeabilisiert werden. Hierzu wurde Saponin-Puffer verwendet, in dem die Zellen aufgenommen und mit dem monoklonalen anti-IFN- γ -APC-Antikörper (1 µg/ml) markiert wurden. Um die unspezifische Bindung des Zytokin-Antikörpers zu minimieren, wurden zusätzlich Ratten-IgG (10 µg/ml) und anti-Fc γ RII/III-Antikörper (20 µg/ml) eingesetzt. Die Inkubation mit dem Antikörper-Gemisch dauerte 30 Minuten bei RT in 0,5 % igem Saponin. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte, zuerst mit Saponin-Puffer und dann mit PBS/BSA, bevor die Zellen unmittelbar vor der Messung in PBS/BSA aufgenommen wurden.

3.13.4 Analyse der Proliferation von T-Zellen

Zur Bestimmung der T-Zell-Proliferation wurden die naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vor der LSEC-Kokultur mit CFSE markiert. Das ist ein lipophiler Farbstoff, der durch die Zellenmembran hindurch diffundieren kann. Intrazellulär wird er so verändert, dass er fluoreszierend wird und aufgrund seiner neu erlangten Hydrophilie die Biomembran nicht mehr passieren kann.

Wie in Abb. 4 gezeigt, führt jede einzelne Zellteilung zu einer fortlaufenden Halbierung der Fluoreszenzintensität, was durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Dadurch entstehen einzelne Gipfel in gleichgroßen Intervallen auf einer logarithmischen Skala. Am größten ist die Fluoreszenzintensität der Ursprungsgeneration, in der keine Teilung erfolgt ist (Abb. 4). CFSE wird sehr präzise zwischen den Tochterzellen aufgeteilt und erlaubt die Erkennung von 8 bis 10 einzelnen Generationen. Entsprechend enthält eine Zellgeneration nach jeder Teilung nur die Hälfte der CFSE-Menge der vorangehenden Generation, was in einer halb so starken

Fluoreszenzintensität resultiert (Abb. 4). Somit kann die mittlere Fluoreszenzintensität als Maß für die Zellteilungsaktivität einer Zellpopulation betrachtet werden.

Die zu markierenden Zellen wurden zuerst zweimal mit proteinfreiem PBS gewaschen, um anschließend in einer Konzentration von $1 \times 10^7/\text{ml}$ in PBS resuspendiert und mit $5 \mu\text{M}$ CFSE bei RT für 2 Minuten inkubiert zu werden. Die Markierung wurde mit Zugabe von PBS/BSA beendet. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS/BSA wurden sie gezählt, in cRPMI aufgenommen und für die Kokulturen verwendet.

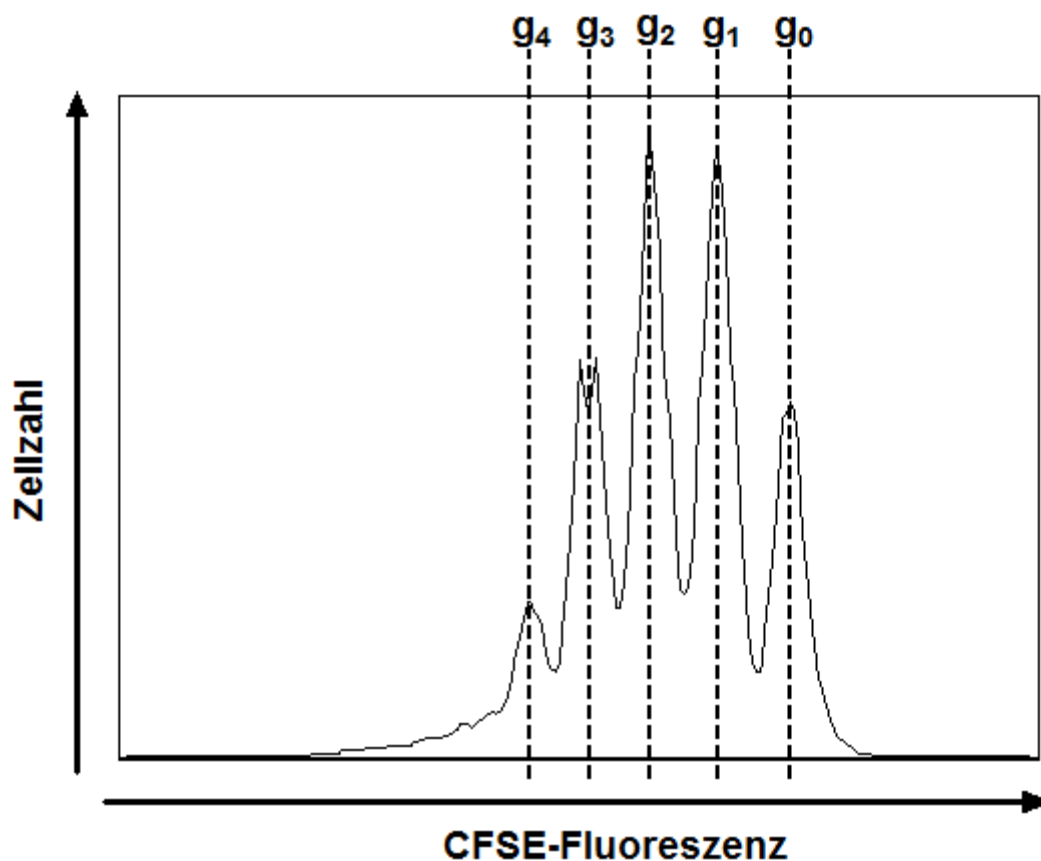


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse einer T-Zell-Proliferation.

Das Histogramm stellt verschiedene T-Zell-Generationen (g) exemplarisch dar. CFSE-markierte T-Zellen wurden für 6 Tage in Kultur genommen, abgerettet und analysiert. Auf der x-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen den Teilungszyklus.

3.13.5 Analyse *in vitro* polarisierter Th1-Zellen

Th1-Zellen wurden durch Kokultur von CD4^+ T-Zellen und SAPC aus OVA-TCR-transgenen OT-II Mäusen generiert, um anschließend für die inflammatorische Aktivierung von LSEC eingesetzt zu werden. Mit Hilfe der antigenabhängigen *in-vitro*-Differenzierung konnten aus 1×10^7 CD4^+ T-Zellen $3,78 \times 10^6 \pm 0,92 \times 10^6$ Th1-Zellen pro ml Initialkultur gewonnen werden.

Als Bestätigung für den Th1-Phänotyp der Zellen wurde als charakteristisches Merkmal ihre IFN- γ -Expression analysiert (Romagnani 2000). Im *Dotplot* der Abb. 5 ist der prozentuale Anteil von IFN- γ^+ -Zellen gegenüber der absoluten Zahl der transgenen CD90.1⁺ T-Zellen aufgetragen. Die abgeernteten Kulturzellen waren nach 4 Stunden Stimulierung mit PMA/IM und nachfolgender intrazellulärer Markierung zu $60,88 \pm 15,88$ % IFN- γ^+ .

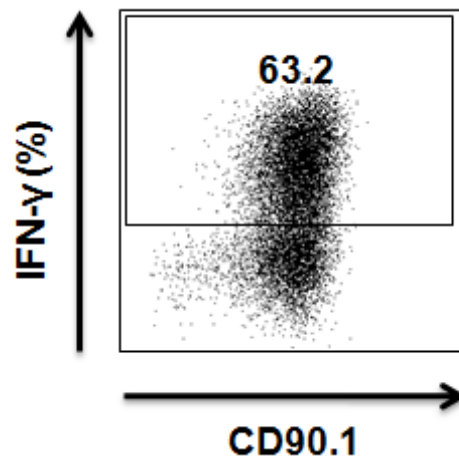


Abbildung 5: Intrazelluläre Markierung der Th1-Kulturzellen.

An Tag 6 wurde die Th1-Kultur beendet und zur Eliminierung der toten Zellen eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Anschließend wurden die vitalen Kulturzellen für 4 Stunden mit PMA/IM restimuliert und die IFN- γ -Expression bestimmt. Darstellung einer repräsentativen Zytokinmarkierung. Repräsentativer *Dotplot* aus zehn unabhängigen Experimenten. Der Prozentsatz positiver Zellen ist angegeben.

3.14 Statistische Analyse

Die erhaltenen Daten wurden mit den Programmen GraphPad Prism 5 und Excel (Microsoft Office) analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* aktivierte LSEC

Eine krankheitsinduzierte Entzündung der Leber hat einen unmittelbaren Einfluss auf das hepatische Endothel, wobei von einer Veränderung des Phänotyps und der antigenpräsentierenden Eigenschaften auszugehen ist. Das Ziel im ersten Teil der vorliegenden Arbeit war die Analyse des Zustands von LSEC bei einer *in-vitro*-Simulation von hepatischer Inflammation.

Um die Expression bestimmter Oberflächenproteine durch die LSEC untersuchen zu können, erfolgte die Zellkultur bzw. -kokultur mit proinflammatorischen Zytokinen oder mit ruhenden bzw. restimulierten Th1-Zellen, die ebenfalls entzündungsfördernd sind (Romagnani 2000). Dadurch sollte insbesondere die Zytokin- und Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Veränderung des LSEC-Phänotyps analysiert werden. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Antigenpräsentation durch die LSEC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids in der Kokultur mit Th1-Zellen untersucht. Die Kulturen wurden für 24 bzw. 48 Stunden angelegt, nachfolgend abgeerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

4.1.1 LSEC-Phänotyp nach 24-stündiger *in-vitro*-Aktivierung

4.1.1.1 Prozentuale Expression der Oberflächenproteine

Die angelegten Kulturen zeigten ein hohes Expressionsniveau der beiden Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowohl durch ruhende als auch durch aktivierte Sinusendothelzellen (Abb. 6). Wie in den repräsentativen Histogrammen dargestellt (Abb. 6), weisen alle ruhenden LSEC beide Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche auf. Dementsprechend nahm der Anteil von ICAM-1⁺ und VCAM-1⁺ LSEC unter inflammatorischen Bedingungen nicht zu.

Das für die Toleranzinduktion im CD8⁺ T-Zell-Kontext wichtige koinhibitorische Protein B7-H1 (Diehl et al., 2008) wurde ebenfalls auf der Oberfläche aller ruhenden LSEC nachgewiesen und zeigte nach inflammatorischer Aktivierung eine unveränderte Expression (Abb. 6).

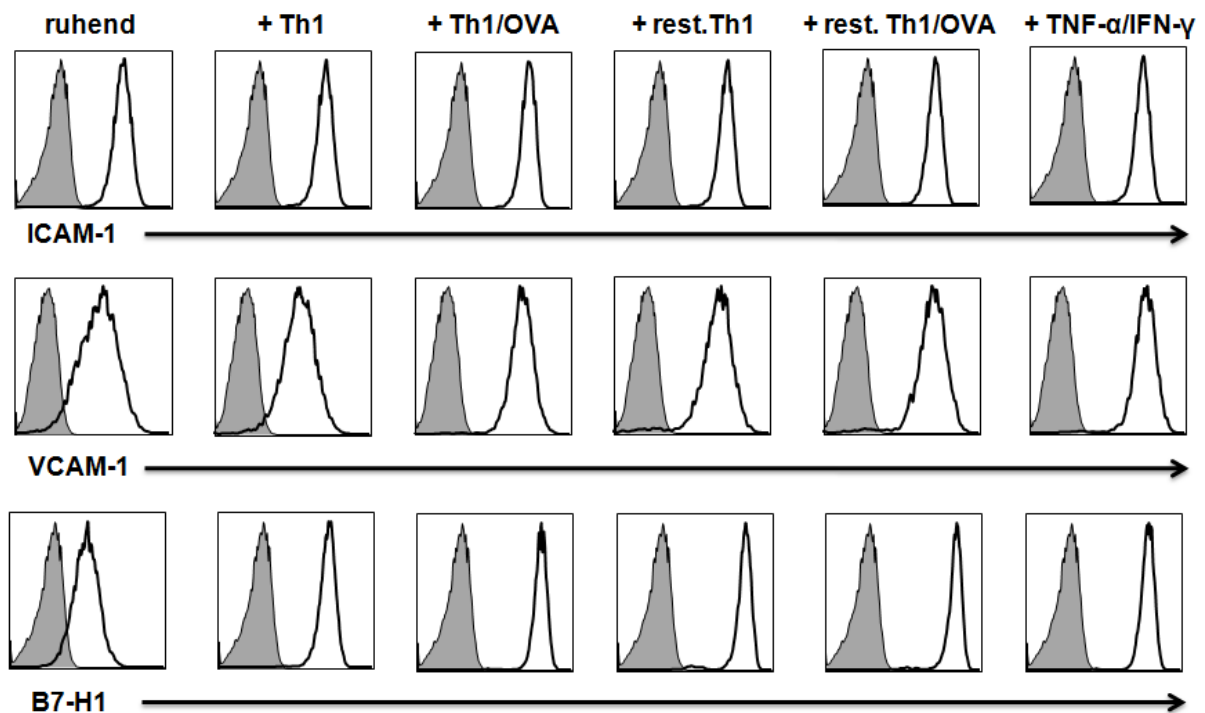


Abbildung 6: Expression von ICAM-1, VCAM-1 und B7-H1 durch LSEC nach 24-stündiger, inflammatorischer Aktivierung.

LSEC aus C57BL/6-Mäusen wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen *in vitro* kultiviert. Die inflammatorische Aktivierung erfolgte durch Kokultur mit vorher nicht-restimulierten bzw. restimulierten Th1-Zellen in An- und Abwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids oder durch Inkubation mit TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle diente eine unbehandelte Gruppe ruhender LSEC. Die Zellen wurden mit einem anti-ICAM-1-, anti-VCAM-1- und anti-B7-H1-Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte Kontrolle; Verstärkte Linie, spezifischer Antikörper. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment aus vier (VCAM-1 und B7-H1) bzw. fünf (ICAM-1) unabhängigen Experimenten.

Das zur Antigenpräsentation wichtige Protein MHC-II wurde dagegen durch einen kleinen Prozentanteil von ruhenden LSEC exprimiert (Abb. 7A und B). Die inflammatorische Aktivierung im Einzelexperiment aus Abb. 7A zeigte eine Tendenz zur Hochregulation der MHC-II-Expression, wobei die Zytokine IFN- γ und TNF- α die stärkste Induktion bewirkten. Ein statistisch signifikanter Anstieg der MHC-II⁺ LSEC mit $17,60 \pm 6,44$ % zeigte sich nur in der zytokinaktivierten Gruppe (Abb. 7B).

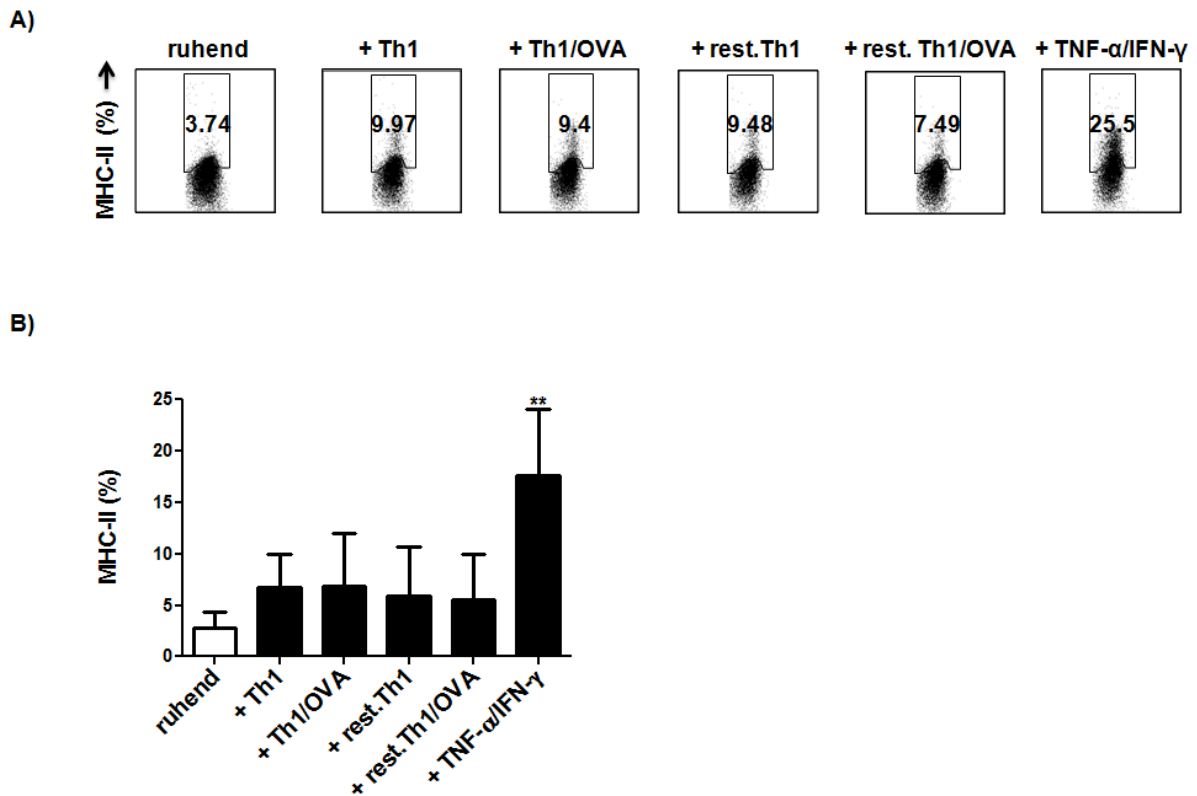


Abbildung 7: Expression von MHC-II durch LSEC nach 24-stündiger, inflammatorischer Aktivierung.

LSEC aus C57BL/6-Mäusen wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen *in vitro* kultiviert. Die inflammatorische Aktivierung erfolgte durch Kokultur mit vorher nicht-restimulierten bzw. restimulierten Th1-Zellen in An- und Abwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids oder durch Inkubation mit TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle diente eine unbehandelte Gruppe ruhender LSEC. **A**, LSEC wurden mit einem anti-MHC-II-Antikörper markiert und der prozentuale Anteil MHC-II⁺ LSEC durchflusszytometrisch bestimmt. Die *Dotplots* zeigen ein repräsentatives Experiment aus fünf unabhängigen Experimenten. **B**, Das Säulendiagramm zeigt den Prozentanteil der MHC-II⁺ LSEC in den inflammatorisch aktivierten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) von fünf unabhängigen Experimenten sind angegeben. **P < 0,01; Mann-Whitney-Test.

4.1.1.2 Expressionsstärke der Oberflächenproteine

Wie in 4.1.1.1 beschrieben exprimierten alle LSEC die Oberflächenproteine ICAM-1, VCAM-1 und B7-H1. Deshalb wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität (GMFI) des jeweiligen zur Markierung benutzten Fluorochroms bestimmt, was ein Maß für die Expressionsstärke des markierten Proteins pro Zelle ist. Zuerst erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle, was die Menge farbstoffmarkierter Zellmoleküle wiedergibt. Dann wurden nach der Formel $G = \sqrt[n]{(x_1 x_2 \dots x_n)}$ die geometrischen Mittelwerte (G-Wert) für die entsprechende Messgruppe mit dem Computerprogramm FlowJo errechnet. Jeder x-Wert ist die Fluoreszenzintensität des jeweiligen

Events (Zelle). Durch diese Vorgehensweise wurde eine bessere Vergleichbarkeit in absoluten Zahlen der Proteinexpressionsstärke gewährleistet.

In den folgenden inflammatorischen Ansätzen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ICAM-1- und VCAM-1-Expression: Th1/OVA-, restimulierte Th1-, restimulierte Th1/OVA- und TNF- α /IFN- γ -Gruppe. Die Kokultur von LSEC mit Th1-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid bewirkte eine signifikante Hochregulation der beiden Adhäsionsproteine (Abb. 8A und B). Ähnliche Beobachtungen wurden für B7-H1 gemacht, wobei die Inkubation der LSEC mit nicht-restimulierten Th1-Zellen in Abwesenheit des spezifischen Antigens ausreichend war, um eine signifikante Steigerung der B7-H1-Expression zu induzieren. Zudem steigerte eine Präsentation des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids durch LSEC an Th1-Zellen die B7-H1-Expression im Vergleich zur Gruppe ohne Antigen (Abb. 8C).

Die Aktivierung des Sinusendothels durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ führte zur stärksten Induktion der ICAM-1- und VCAM-1-Expression auf der LSEC-Membran (Abb. 8A und B). B7-H1 war ebenfalls signifikant hochreguliert (Abb. 8C). Nach inflammatorischer Aktivierung mit Zytokinen zeigten prozentual gesehen mehr LSEC eine MHC-II-Expression auf ihrer Zelloberfläche (4.1.1.1), jedoch konnte die Expressionstärke dieses Moleküls nicht gesteigert werden (Abb 8D).

Vor dem Hintergrund aller anderen Aktivierungsansätze hoben sich folgende zwei als für weitere Experimente geeignete Gruppen hervor: Th1/OVA und TNF- α /IFN- γ . Die Th1/OVA-Aktivierung induzierte eine ca. 2-fache ICAM-1-, 4-fache VCAM-1- und 26-fache B7-H1-Expressionssteigerung. Die TNF- α /IFN- γ -Aktivierung induzierte eine mehr als 2-fache ICAM-1-, ca. 7-fache VCAM-1- und 23-fache B7-H1-Expressionssteigerung. Somit spiegelten diese beiden Gruppen die *in vivo* Situation einer Leberentzündung am besten wieder.

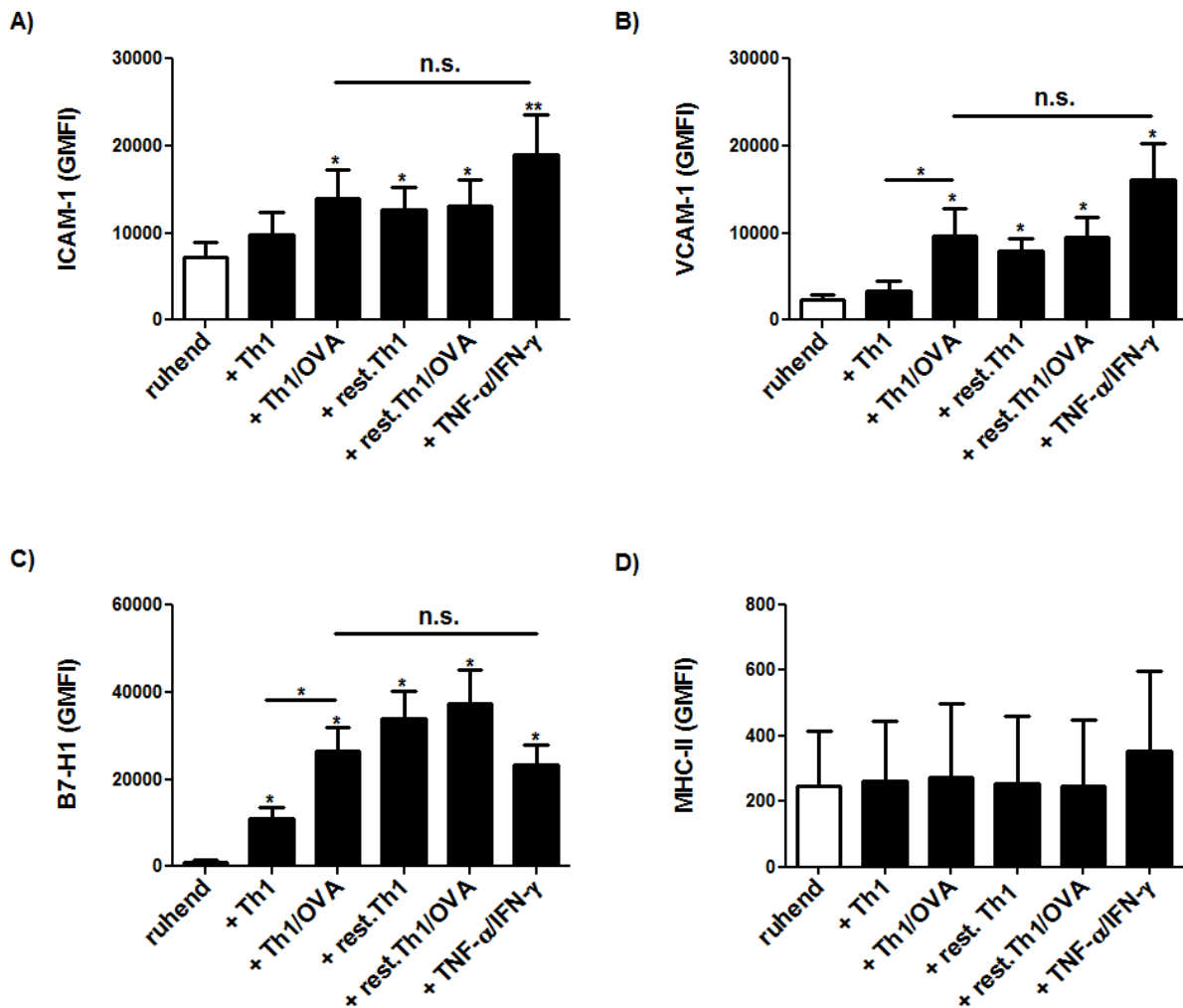


Abbildung 8: Expressionsstärke von ICAM-1, VCAM-1, B7-H1 und MHC-II durch LSEC nach 24-stündiger Aktivierung.

LSEC aus C57BL/6-Mäusen wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen *in vitro* kultiviert. Die inflammatorische Aktivierung erfolgte durch Kokultur mit vorher nicht-restimulierten und restimulierten Th1-Zellen in An- und Abwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids oder durch Inkubation mit TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz ruhender LSEC. LSEC wurden mit einem anti-ICAM-1-, anti-VCAM-1-, anti-B7-H1- und anti-MHC-II-Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Proteinexpressionsniveaus sind als GMFI des untersuchten Fluorochroms wiedergegeben. **A**, Darstellung der ICAM-1-Expression von LSEC. **B**, Darstellung der VCAM-1-Expression von LSEC. **C**, Darstellung der B7-H1-Expression von LSEC. **D**, Darstellung der MHC-II-Expression von LSEC. Die Diagramme zeigen MW \pm SD der GMFI inflammatorisch aktivierter LSEC im Vergleich zur GMFI ruhender LSEC von vier (VCAM-1 und B7-H1) bzw. fünf (MHC-II und ICAM-1) unabhängigen Experimenten. *P < 0,05. **P < 0,01; n.s.= nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

4.1.2 LSEC-Phänotyp nach 48-stündiger *in-vitro*-Aktivierung

Um mögliche Einflüsse einer längeren Aktivierungszeit der LSEC zu untersuchen, wurde wie in 4.1.1 geschildert vorgegangen. Im Unterschied wurden die Endothelzellen 48 statt 24 Stunden lang aktiviert, wobei zur Aktivierung nur die Zytokine TNF- α und IFN- γ eingesetzt wurden.

Nach 48-stündiger Aktivierung wurde eine signifikante Steigerung der MHC-II-Expression auf $35,86 \pm 12,89$ % gegenüber $4,87 \pm 2,39$ % bei ruhenden LSEC beobachtet (Abb. 9D). Zur Darstellung der Expressionswerte der Oberflächenproteine ICAM-1, VCAM-1 und B7-H1 wurde die GMFI benutzt. Die LSEC haben nach 48-stündiger Aktivierung alle drei Proteine hochreguliert (Abb. 9A-C).

Im Vergleich zur 24-stündigen führte eine 48-stündige Aktivierung zu keiner weiteren Steigerung der Proteinexpression (Abb. 9A-D).

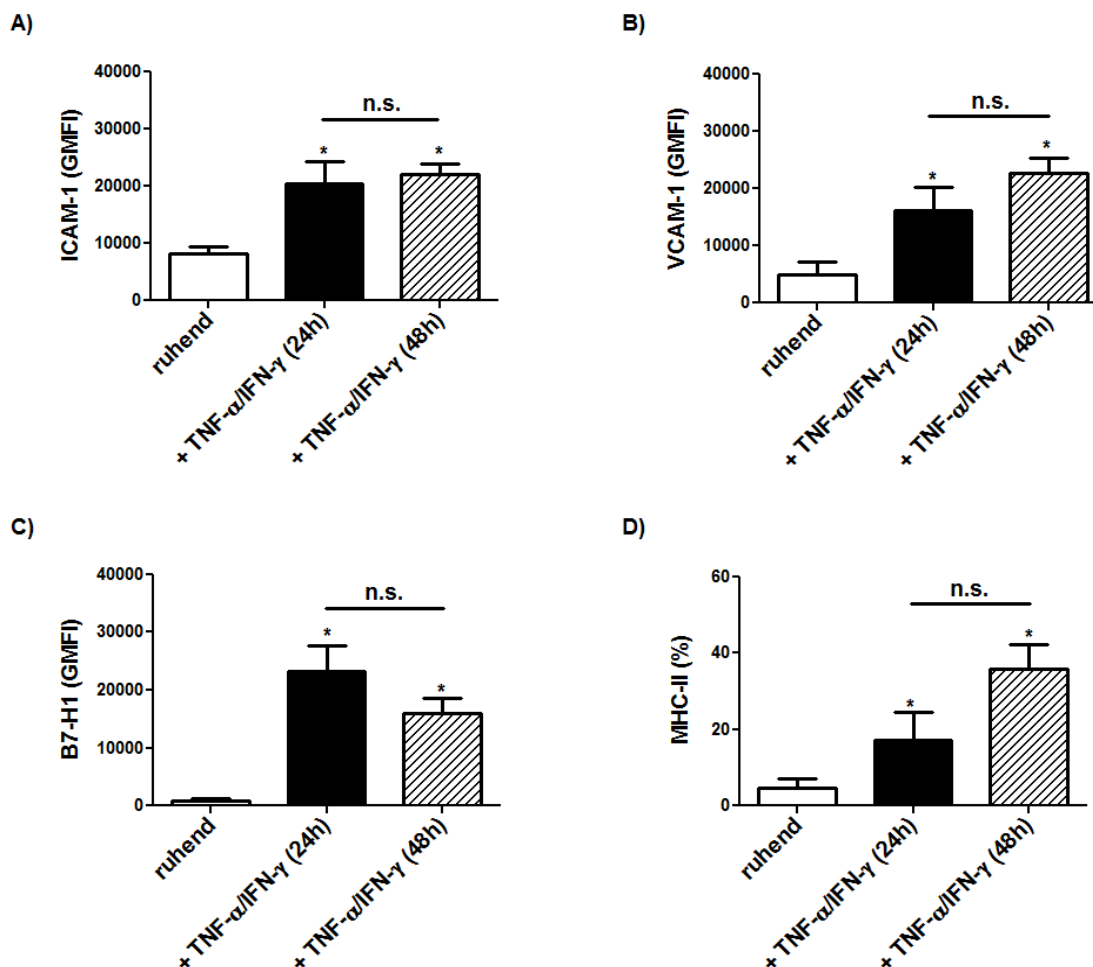


Abbildung 9: Expressionsstärke von ICAM-1, VCAM-1, B7-H1 und prozentuale Expression von MHC-II durch LSEC nach 48-stündiger Aktivierung.

LSEC aus C57BL/6-Mäusen wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen *in vitro* kultiviert. Inflammatorische Aktivierung erfolgte durch Inkubation mit TNF- α und IFN- γ für 24 oder 48 Stunden. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Gruppe ruhender LSEC. LSEC wurden mit einem anti-ICAM-1-, anti-VCAM-1-, anti-B7-H1- und anti-MHC-II-Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Proteinexpressionsniveaus sind als % positive Zellen oder als GMFI der Zellen wiedergegeben. **A**, Darstellung der ICAM-1-Expression von LSEC. **B**, Darstellung der VCAM-1-Expression von LSEC. **C**, Darstellung der B7-H1-Expression von LSEC. **D**, Darstellung des Prozentanteils der MHC-II⁺ LSEC. Die Diagramme zeigen MW \pm SD des Prozentanteils bzw. des GMFI

inflammatorisch aktivierter LSEC im Vergleich zum Prozentanteil bzw. GMFI ruhender LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P< 0,05; n.s.= nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

4.2 CD4⁺ T-Zell-Phänotyp nach *Priming* durch aktivierte LSEC

LSEC sind nicht-professionelle APC und können naiven CD4⁺ T-Zellen spezifische Antigene mittels MHC-II präsentieren, wobei diese unter homöostatischen Bedingungen einen tolerogenen Phänotyp erlangen (Kruse et al., 2009). Ob diese Toleranzinduktion durch LSEC auch unter Inflammation erhalten bleibt, ist nicht bekannt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC auf den T-Zell-Phänotyp analysiert. Im Mittelpunkt stand die Frage, ob es zu einer stärkeren T-Zell-Aktivierung kommt und ob eine auf Zell-Zell-Kontakt und antigenabhängige TCR-Stimulierung basierende oder eine rein zytokinvermittelte LSEC-Aktivierung ausschlaggebender ist. Dazu wurden die Zellproliferation, die Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 und des Effektorzytokins IFN- γ bestimmt.

LSEC wurden isoliert, inflammatorisch aktiviert und mit naiven OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Zwei verschiedene Ansätze wurden zur inflammatorischen Aktivierung verwendet: Th1-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid und die Zytokine TNF- α und IFN- γ .

4.2.1 Proliferation und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, ob die inflammatorisch aktivierten LSEC eine stärkere Proliferation der naiven CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen induzieren. Dafür wurden die T-Zellen vor der *in-vitro*-Kokultur mit CFSE markiert. Die LSEC-Aktivierung resultierte nicht in einer gesteigerten Proliferationsrate der *geprimten* CD4⁺ T-Zellen, wie die charakteristischen CFSE-Profile und die CFSE-GMFI zeigten (Abb. 10A und B). Im Gegenteil war die T-Zell-Proliferation in der Zytokingruppe signifikant kleiner als in der unstimulierten Kontrolle, während in der Th1/OVA-Gruppe kein signifikanter Unterschied zu sehen war (Abb. 10B). Die stärkste Proliferation zeigten T_{SAPC}, die als Positivkontrolle dienten (Abb. 10B). Ihre Zellteilung war signifikant stärker als in den LSEC-*geprimten* Gruppen (Abb. 10B).

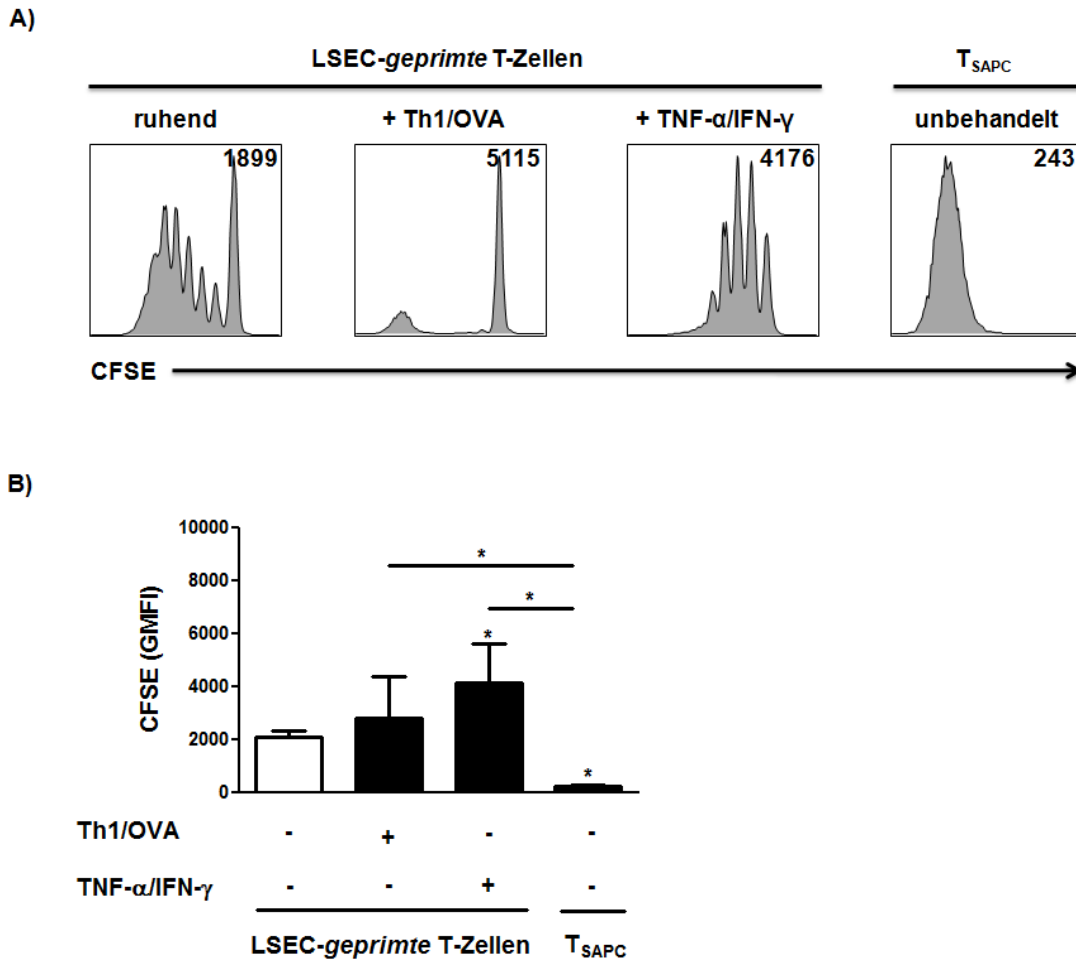


Abbildung 10: CD4⁺ T-Zell-Proliferation nach Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit Th1-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder TNF-α und IFN-γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD90.2⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung der T-Zell-Proliferation als die Abnahme des zellulären CFSE-Gehalts und des CFSE-GMFI (rechts oben). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW ± SD des GMFI von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bzw. SAPC im Vergleich zum GMFI nach *Priming* durch ruhende LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P < 0,05; Mann-Whitney-Test.

Weder die LSEC-Aktivierung mit Th1/OVA noch mit Zytokinen konnte eine höhere CD25-Expression der *geprimten* CD4⁺ T-Zellen induzieren (Abb. 11A und B). Auch zwischen den beiden aktivierten Gruppen bestand kein Unterschied. Starke Expression von CD25 und signifikant größere Werte als in den anderen Gruppen wurden bei den T_{SAPC} beobachtet (Abb. 11A und B).

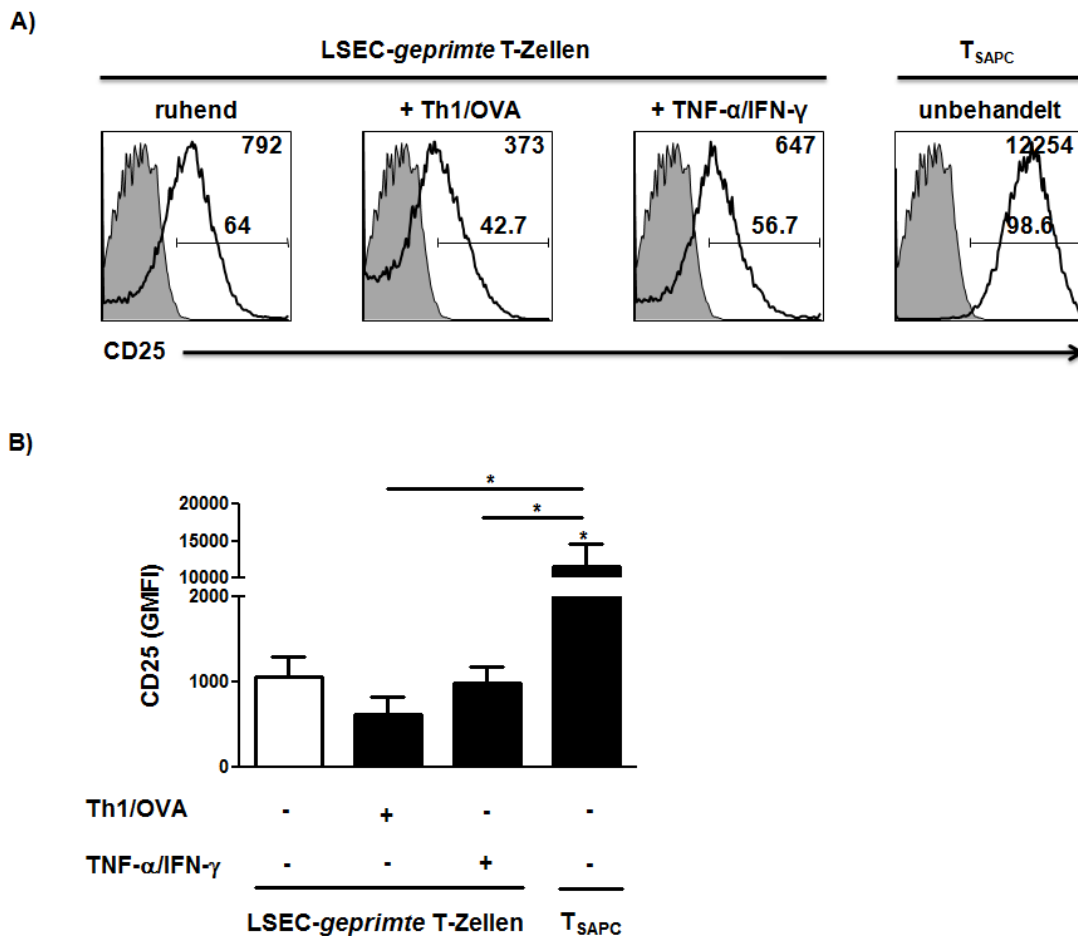


Abbildung 11: Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit Th1-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder TNF-α und IFN-γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD90.2⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung des Prozentanteils CD25⁺ T-Zellen und des GMFI der Zellen (rechts oben). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte Kontrolle; Verstärkte Linie, spezifischer Antikörper. **B**, Darstellung der CD25-Expressionstärke gemessen am GMFI. Das Diagramm zeigt MW ± SD des GMFI von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bzw. SAPC im Vergleich zum GMFI nach *Priming* durch ruhende LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P < 0,05; Mann-Whitney-Test.

4.2.2 IFN-γ-Expression der CD4⁺ T-Zellen

Ein weiterer Aspekt der T-Zell-Analyse war die Bestimmung der Expression von IFN-γ, das ein Effektor- und Markerzytokin der Th1-Helfer-Zellen ist (Romagnani 2000). In erster Linie sollte

untersucht werden, ob aktivierte LSEC naive antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Effektorzellen polarisieren können.

Th1/OVA-aktivierte LSEC induzierten nach *Priming* eine signifikant stärkere IFN- γ -Expression in naiven CD4⁺ T-Zellen mit 23,74 \pm 8,50 % im Vergleich zu ruhenden LSEC (Abb. 12). Gleichzeitig konnten zytokinaktivierte LSEC mit 1,89 \pm 0,40 % signifikant weniger IFN- γ ⁺ T-Zellen als ruhende LSEC polarisieren (Abb. 12). Zwischen der Th1/OVA- und der Zytokingruppe lag ein signifikanter Unterschied vor (Abb. 12B). Eine eindeutige T-Zell-Polarisierung zu Th1-Effektorzellen hatten die SAPC bewirkt (Abb. 12A), die eine signifikant größere IFN- γ -Produktion als in allen anderen Gruppen zeigten (Abb. 12B).

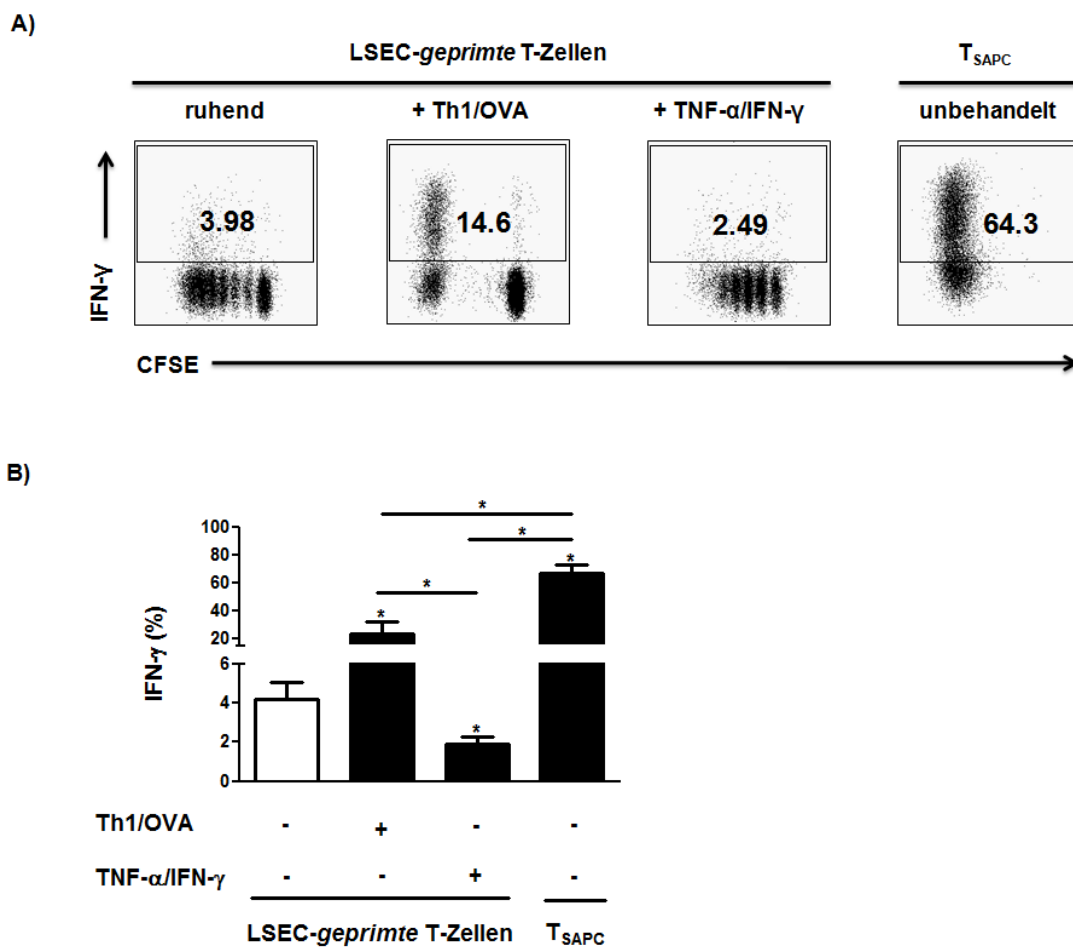


Abbildung 12: IFN- γ -Expression von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit Th1-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die

Auswertung wurden nur CD90.2⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung des Prozentanteils IFN- γ ⁺ T-Zellen. Die *Dotplots* zeigen ein repräsentatives Experiment. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW \pm SD des pruzentualen Anteils IFN- γ -exprimierender CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bzw. SAPC im Vergleich zum Prozentanteil nach *Priming* durch ruhende LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P < 0,05; Mann-Whitney-Test.

4.2.3 Ausgrenzung der kontaminierenden Th1-Zellen

Eine genauere Betrachtung der Histogramme und *Dotplots* in Abb. 10A und 12A, die die Merkmalsausprägung der LSEC-*geprimten* T-Zellen darstellen, zeigte dass die T-Zellen in der Th1/OVA-Gruppe zwei unterschiedlichen Subpopulationen zugeordnet werden können. Die auf der x-Achse links gelegenen T-Zellen weisen keine CFSE-Markierung auf und exprimieren zu einem großen Anteil IFN- γ , während die rechts positionierte Gruppe stark CFSE⁺ ist und kaum IFN- γ -Produzenten zeigt. Im Unterschied zu den anderen Ansätzen können keine Zwischengenerationen der T-Zellen beobachtet werden. Demzufolge sollte ausgeschlossen werden, dass im Th1/OVA-Ansatz trotz des mehrmaligen Abspülens noch Th1-Zellen auf den Endothelzellen haften geblieben sind und sich in der anschließenden Kokultur mit den naiven CD4⁺ T-Zellen stark geteilt haben.

Um die zur LSEC-Aktivierung eingesetzten Th1-Zellen von den in der anschließenden Kokultur benutzten naiven CD4⁺ T-Zellen unterscheiden zu können, wurden T-Zellen aus zwei unterschiedlichen Mausstämmen benutzt. Th1-Zellen wurden aus CD4⁺ T-Zellen von OT-II x B6Pl Mäusen generiert, deren T-Zellen CD90.1 (Thy1.1) exprimieren. Die naiven CD4⁺ T-Zellen für die Kokultur mit LSEC wurden aus OT-II Mäusen isoliert, deren T-Zellen CD90.2 (Thy1.2) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

Nach der Th1/OVA-Aktivierung der LSEC und ihrer anschließenden Kokultur mit naiven CD4⁺ T-Zellen, wurden die *geprimten* T-Zellen für CD90.1 markiert. Es wurde festgestellt, dass nach dem LSEC-*Priming* zwei unterschiedliche T-Zell-Populationen abgeerntet wurden: eine CD90.1⁺CFSE⁻ und eine CD90.1⁻CFSE⁺ (Abb. 13A). Somit entsprachen die CD90.1⁺CFSE⁻ T-Zellen den ursprünglich zur Aktivierung eingesetzten Th1-Zellen aus OT-II x B6Pl Mäusen. Die CD90.1⁻CFSE⁺ waren dagegen aus den naiven CD4⁺ T-Zellen entstanden, die aus OT-II Mäusen isoliert und mit CFSE markiert wurden. Somit waren Th1-Zellen nach der LSEC-Aktivierung trotz des mehrmaligen Abspülens auf den Lebersinusendothelzellen haften geblieben und hatten sich in der darauf folgenden Kokultur vermehrt. Daher mussten die Th1-Zellen zuerst ausgegrenzt (Abb. 13A) und die Merkmalsauswertung neu durchgeführt werden (Abb. 13B).

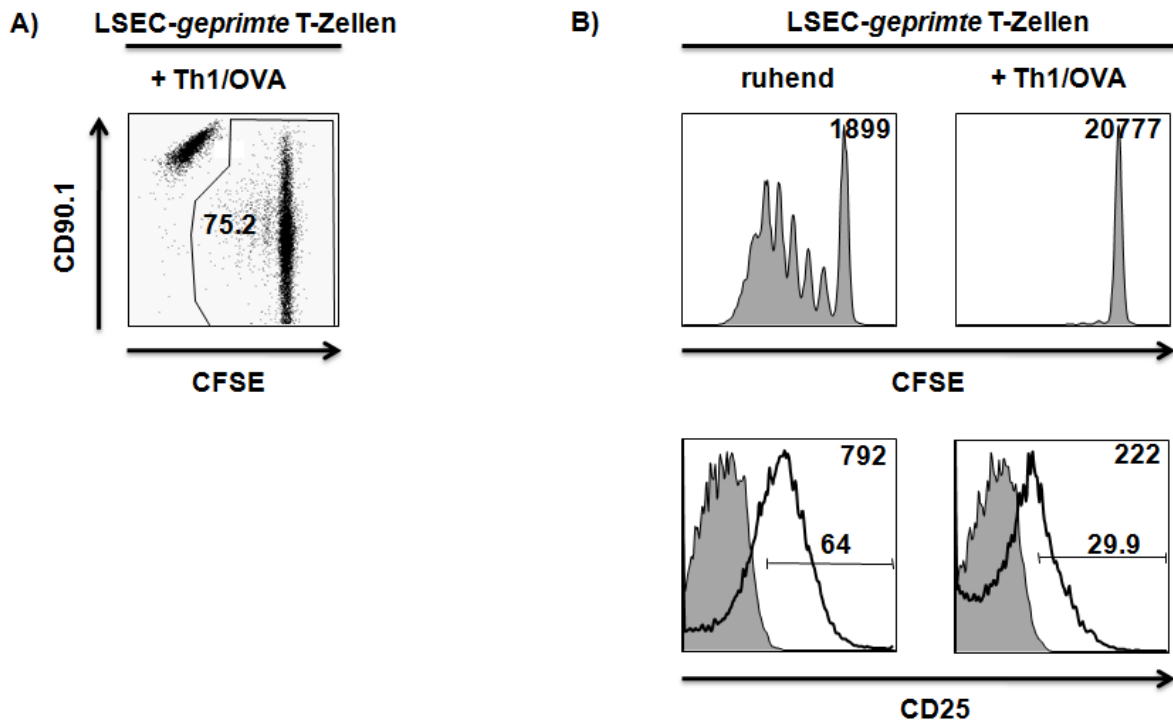


Abbildung 13: Proliferation und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch Th1/OVA-aktivierte LSEC und Ausgrenzung der kontaminierenden Th1-Zellen.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit Th1-Zellen aus OT-II x B6Pl Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgspült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. Betrachtet wurden nur die Ansätze mit ruhenden und Th1/OVA-aktivierten LSEC. **A**, Darstellung der CD90.1⁺ gegen die CFSE⁺ CD4⁺ T-Zellen. Ein *Gate* wurde auf die CFSE⁺ T-Zellen und die von ihnen ausgehenden Generationen vor der weiteren Analyse gelegt. Der Prozentanteil an der gesamten Zellpopulation ist angegeben. **B**, Darstellung der Zellproliferation und des Prozentanteils CD25-exprimierender CD4⁺ T-Zellen. Die GMFI der T-Zellen ist angegeben (rechts oben). Repräsentative Histogramme und *Dotplots* aus vier unabhängigen Experimenten.

Die gleiche Beobachtung konnte für die intrazelluläre IFN- γ -Markierung gemacht werden. Auch hier lagen in der Th1/OVA-Gruppe zwei T-Zell-Populationen mit verschiedenen Merkmalen (Abb. 14A), so dass zuerst die Ausgrenzung der CFSE⁻ Th1-Zellen erfolgen musste (Abb. 14A), um dann die IFN- γ -Daten für die *geprimten*, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen neu auszuwerten (Abb. 14B).

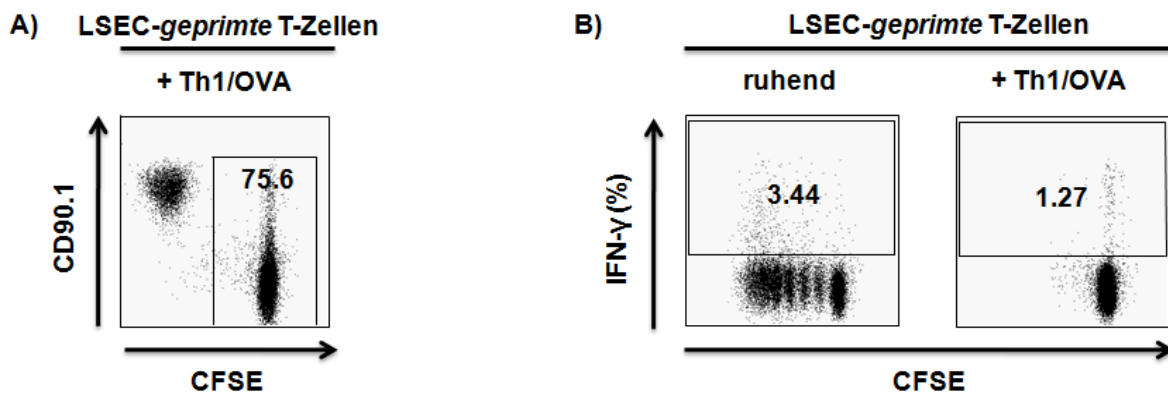


Abbildung 14: IFN- γ -Expression von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation auf Th1/OVA-aktivierten LSEC und Ausgrenzung der kontaminierenden Th1-Zellen.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit Th1-Zellen aus OT-II x B6Pl Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. Betrachtet wurden nur die Ansätze mit ruhenden und Th1/OVA-aktivierten LSEC. **A**, Darstellung der CD90.1⁺ gegen die CFSE⁺ CD4⁺ T-Zellen. Ein *Gate* wurde auf die CFSE⁺ T-Zellen und die von ihnen ausgehenden Generationen vor der weiteren Analyse gelegt. Der Prozentanteil an der gesamten Zellpopulation ist angegeben. **B**, Darstellung des Prozentanteils IFN- γ -exprimierender CD4⁺ T-Zellen. Repräsentative *Dotplots* aus vier unabhängigen Experimenten.

4.2.4 T-Zell-Merkmale nach Ausgrenzung der Th1-Zellen

Die anschließend an die Th1-Ausgrenzung durchgeführte statistische Analyse der Proliferation, CD25- und IFN- γ -Expression von LSEC-geprimten CD4⁺ T-Zellen wurde in Abb. 15 zusammengefasst. Folgende Ergebnisse für die Proliferationsrate konnten bestimmt werden: die T-Zellteilung in beiden Gruppen mit aktivierten LSEC (25334 ± 9338 bzw. 4112 ± 1487 CFSE-GMFI) war signifikant kleiner als bei den ruhenden LSEC (2086 ± 220 CFSE-GMFI), während die T_{SAPC} (228 ± 28 CFSE-GMFI) signifikant stärker als alle anderen T-Zellen proliferiert hatten. Unterschiede gab es auch zwischen den beiden Gruppen mit aktivierten LSEC: die Zytokinvorbehandlung der Sinusendothelzellen induzierte eine signifikant stärkere CD4⁺ T-Zell-Teilung als die Th1/OVA-Aktivierung (Abb. 15A).

Die CD25-Expression der T-Zellen wurde durch Th1/OVA-aktivierte LSEC im Vergleich zu ruhenden LSEC signifikant erniedrigt: 252 ± 24 GMFI gegenüber 1062 ± 224 GMFI. Die Zytokinaktivierung der LSEC dagegen induzierte ähnliche CD25-Expressionsniveaus wie ohne Aktivierung: 977 ± 195 GMFI. SAPC bewirkten verglichen mit allen anderen Gruppen einen signifikanten Anstieg der CD25-Expression auf der CD4⁺ T-Zell-Membran mit 11561 ± 3050 GMFI (Abb. 15B).

Aktivierte LSEC induzierten eine signifikant kleinere IFN- γ -Expression in CD4⁺ T-Zellen als ruhendes Sinusendothel: $1,93 \pm 1,05$ % bzw. $1,89 \pm 0,40$ % gegenüber $4,18 \pm 0,88$ %. Schließlich bewirkten SAPC mit Werten von $67,25 \pm 5,52$ % eine starke IFN- γ -Expression (Abb. 15C).

Zusammenfassend führte die LSEC-Aktivierung zu einer höheren Anzahl MHC-II-exprimierender Zellen, jedoch ohne Änderung der Expressionsstärke pro Zelle. Die Oberflächenmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und B7-H1 wurden hochreguliert. Die Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC resultierte in einer geringeren T-Zell-Proliferation und IFN- γ -Expression im Vergleich zu ruhenden LSEC. LSEC bewirkten nach Th1/OVA-Aktivierung eine schwächere CD25-Expression in den *geprimten* CD4⁺ T-Zellen als ruhende LSEC, während das mit TNF- α und IFN- γ aktivierte Sinusendothel keine Änderung induzierte. Die stärkste Proliferation, CD25- und IFN- γ -Expression zeigten die T_{SAPC}.

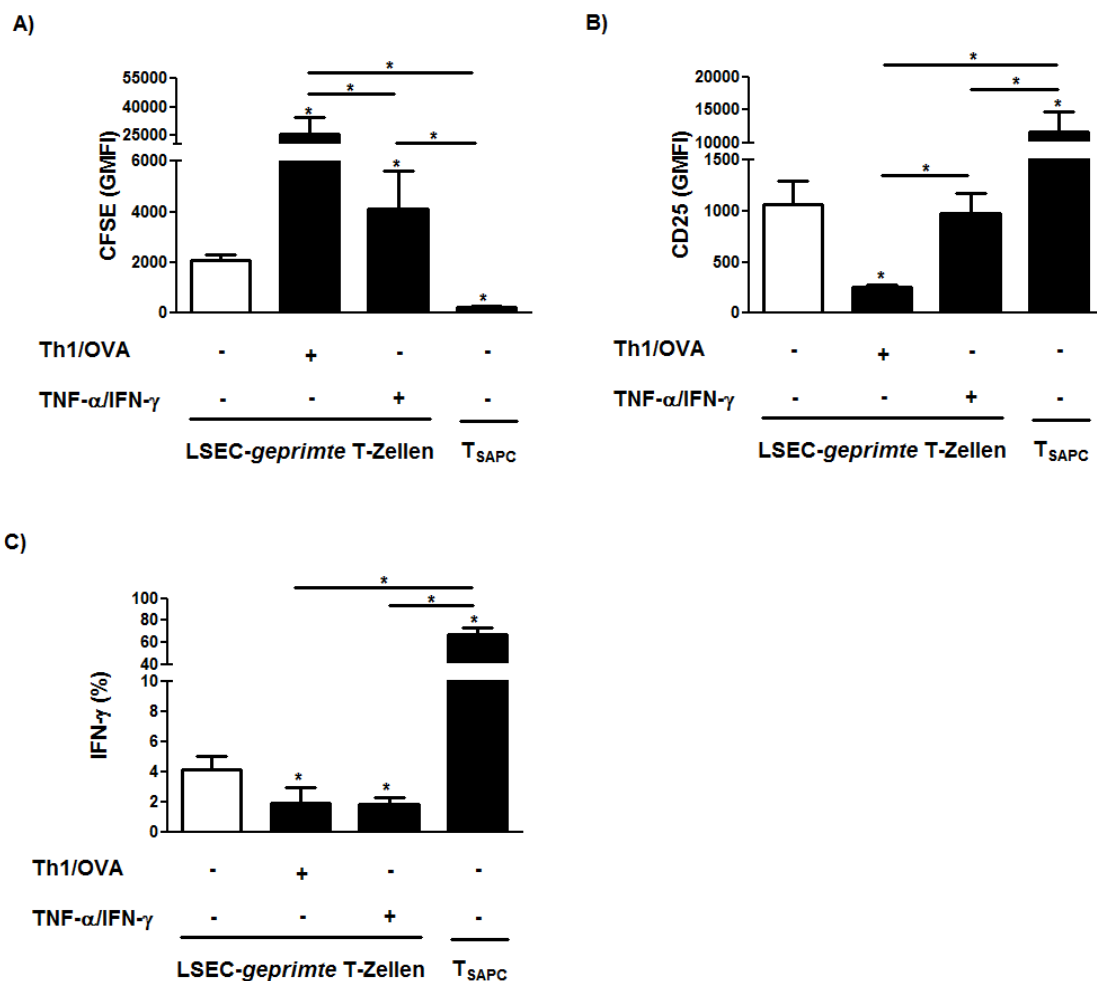


Abbildung 15: Statistische Analyse der Proliferation, CD25- und IFN- γ -Expression durch LSEC-geprimte CD4⁺ T-Zellen.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit Th1-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. Am Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD90.2⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung der Proliferationsrate der *geprimten* CD4⁺ T-Zellen gemessen am CFSE-GMFI. **B**, Darstellung des CD25-Expressionsniveaus von *geprimten* CD4⁺ T-Zellen gemessen am GMFI des benutzten Markers. **C**, Darstellung der IFN- γ -Expression durch *geprimte* CD4⁺ T-Zellen gemessen am Prozentanteil IFN- γ ⁺ T-Zellen. Die Säulendiagramme zeigen MW \pm SD des GMFI von CD4⁺ T-Zellen bzw. des pruzentualen Anteils IFN- γ -exprimierender CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bzw. SAPC im Vergleich zum *Priming* durch ruhende LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P < 0,05; Mann-Whitney-Test.

4.3 Einfluss des B7-H1-Mechanismus auf die Toleranzinduktion in CD4⁺ T-Zellen

Die Sinusendothelzellen der Leber exprimieren auf ihrer Zellmembran konstitutiv das Molekül B7-H1, welches eine entscheidende Rolle in der Toleranzinduktion im CD8-T-Zell-Kontext spielt (Diehl et al., 2008). In dieser Hinsicht stand im Fokus der nächsten Exsperimenterreihe die Frage, wie sich die Interaktion zwischen B7-H1 und seinem Rezeptor auf der T-Zell-Membran auf die Merkmalsausprägung von naiven CD4⁺ T-Zellen bei *Priming* durch inflammatorisch aktivierte LSEC auswirkt und ob über diesen Mechanismus eine T-Zell-Toleranz induziert wird. Zunächst wurden LSEC-Kulturen angelegt und zwei Ansätze mit den inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ aktiviert. Infolge dieser Aktivierung wurde eine signifikante Steigerung der B7-H1-Expression auf der LSEC-Zellmembran mit 23241 ± 4501 GMFI gegenüber 1012 ± 434 GMFI unter *in vitro* homöostatischen Bedingungen (Abb. 8C) beobachtet. Anschließend folgte die Kokultur mit den naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid. B7-H1 wurde in einem der Ansätze mit aktivierten LSEC blockiert.

4.3.1 Proliferation und Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen

Durch aktivierte LSEC *geprimte* T-Zellen proliferierten unter B7-H1-Block signifikant weniger als im Ansatz mit den ruhenden LSEC (Abb. 16): 5109 ± 1295 GMFI gegenüber 1840 ± 330 GMFI. Aktivierte LSEC zeigten mit und ohne B7-H1-Block keinen Unterschied in der Induktion von CD4⁺ T-Zell-Proliferation (Abb. 16A und B): 5109 ± 1295 bzw. 4921 ± 959 CFSE-GMFI. Die T_{SAPC} hatten mit 314 ± 79 CFSE-GMFI am stärksten proliferiert und signifikant mehr als die T-Zellen in der Gruppe mit dem B7-H1-Block (Abb. 16A und B).

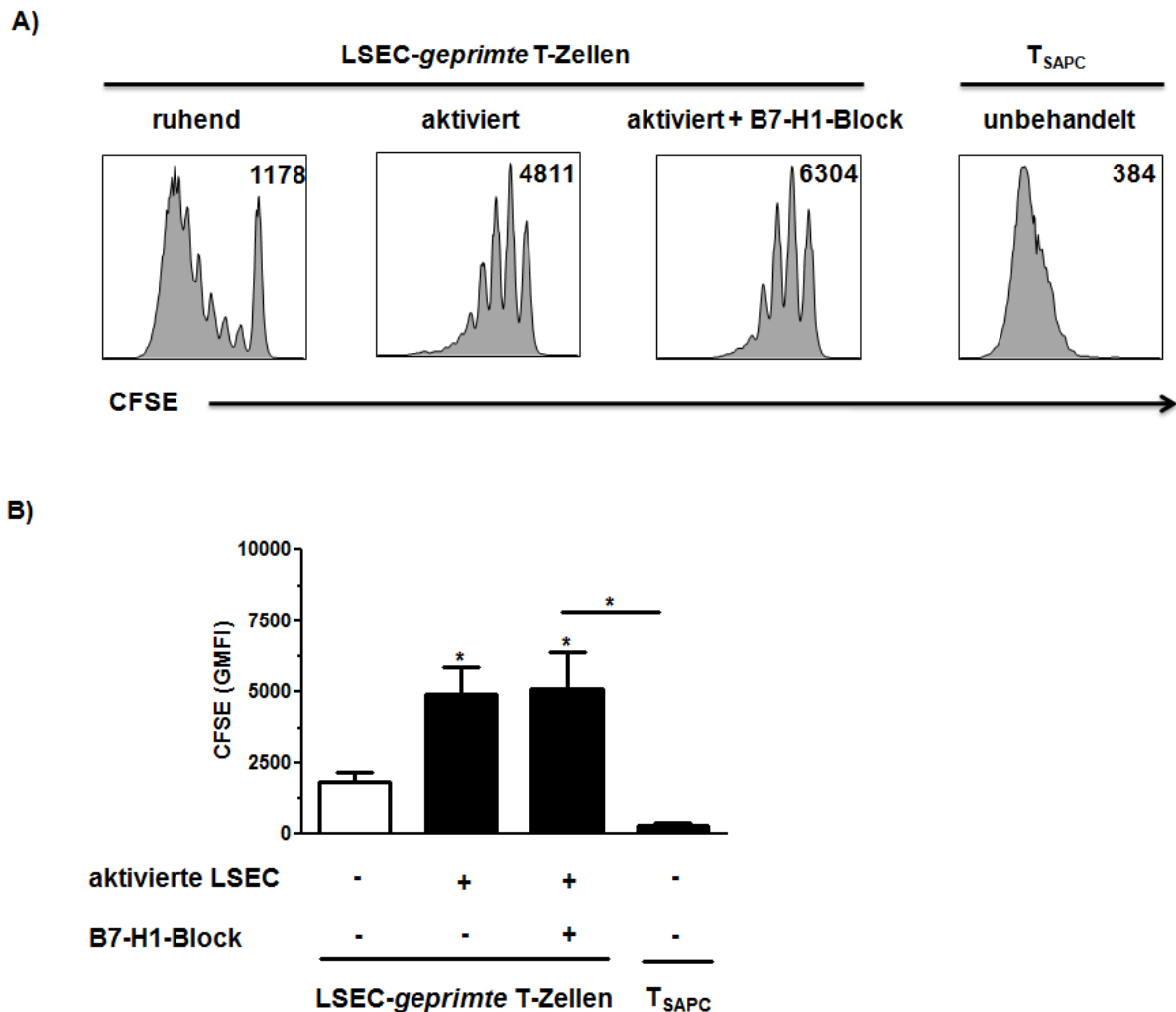


Abbildung 16: Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Zusätzlich wurde der anti-B7-H1-Antikörper in einen der aktivierten Gruppen zugegeben. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD90.2⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung der T-Zell-Proliferation als die Abnahme des zellulären CFSE-Gehalts sowie der GMFI (rechts oben). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW \pm SD des GMFI von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bei gleichzeitigem B7-H1-Block bzw. SAPC im Vergleich zum GMFI nach *Priming* durch ruhende LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P < 0,05; Mann-Whitney-Test.

Die T-Zell-Populationen in den Gruppen mit ruhenden sowie zytokinaktivierten LSEC mit bzw. ohne B7-H1-Block haben minimale Unterschiede hinsichtlich des Prozentsatzes CD25-expressierender Zellen gezeigt, was auch mit ihren GMFI-Werten korrelierte (Abb. 17A und B):

1311 ± 558 GMFI im Ansatz mit den ruhenden LSEC und 1157 ± 513 bzw. 1373 ± 741 GMFI nach Zytokinaktivierung ohne und mit B7-H1-Block. Nach spezifischer Antigenpräsentation durch SAPC zeigte sich eine starke CD25-Induktion (23036 ± 16021 GMFI), die signifikant größer war als im Ansatz mit dem B7-H1-Block (Abb. 17A und B).

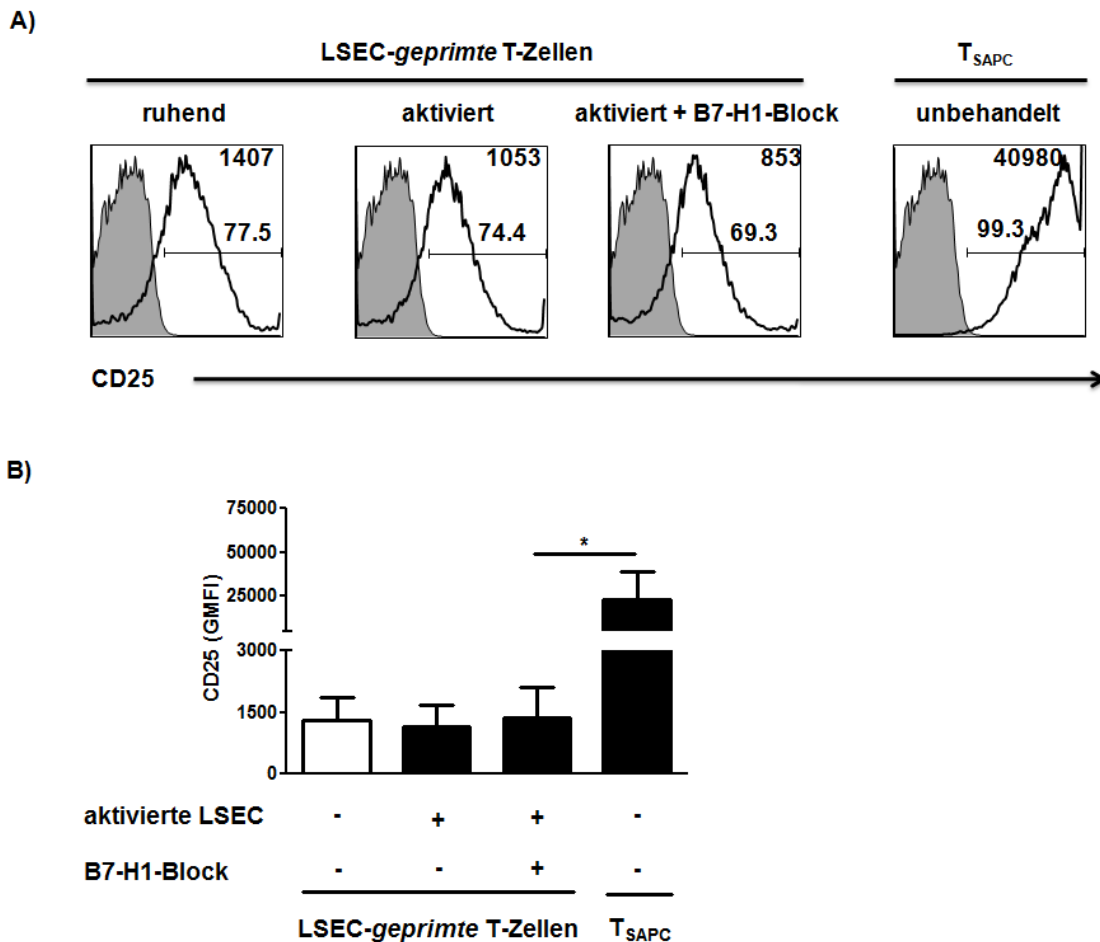


Abbildung 17: Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mittels Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid in Kokultur gegeben. Zusätzlich wurde der anti-B7-H1-Antikörper in einen der aktivierten Ansätze gegeben. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD90.2⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung des prozentualen Anteils CD25⁺ T-Zellen und des GMFI der Zellen (rechts oben). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte Kontrolle; Verstärkte Linie, spezifischer Antikörper. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW ± SD des GMFI von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bei gleichzeitigem B7-H1-Block bzw. SAPC im Vergleich zum GMFI nach *Priming* durch ruhende LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P < 0,05; Mann-Whitney-Test.

4.3.2 IFN- γ -Expression

Aktivierte LSEC induzierten unter gleichzeitigem B7-H1-Block eine IFN- γ -Expression tendenziell in einem kleineren Prozentsatz von CD4⁺ T-Zellen als ruhende LSEC, jedoch bestand hier kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 18A und B): $2,56 \pm 0,91$ % gegenüber $4,96 \pm 3,08$ %. Beide zytokinaktivierte Gruppen wiesen nahezu identische Prozentanteile an IFN- γ ⁺ T-Zellen auf und somit hatte der B7-H1-Block keinen Einfluss auf die IFN- γ -Expression (Abb. 18A und B): $2,33 \pm 0,34$ % gegenüber $2,56 \pm 0,91$ %. SAPC induzierten eine starke IFN- γ -Expression in den T_{SAPC} mit $68,48 \pm 8,05$ % (Abb. 18A und B).

Zusammenfassend führte der B7-H1-Block in inflammatorisch aktivierten LSEC zu keiner Änderung der Proliferation und IFN- γ -Expression von *geprimten* CD4⁺ T-Zellen. Auch der T-Zell-Aktivierungsgrad blieb unverändert bei konstanter CD25-Expression.

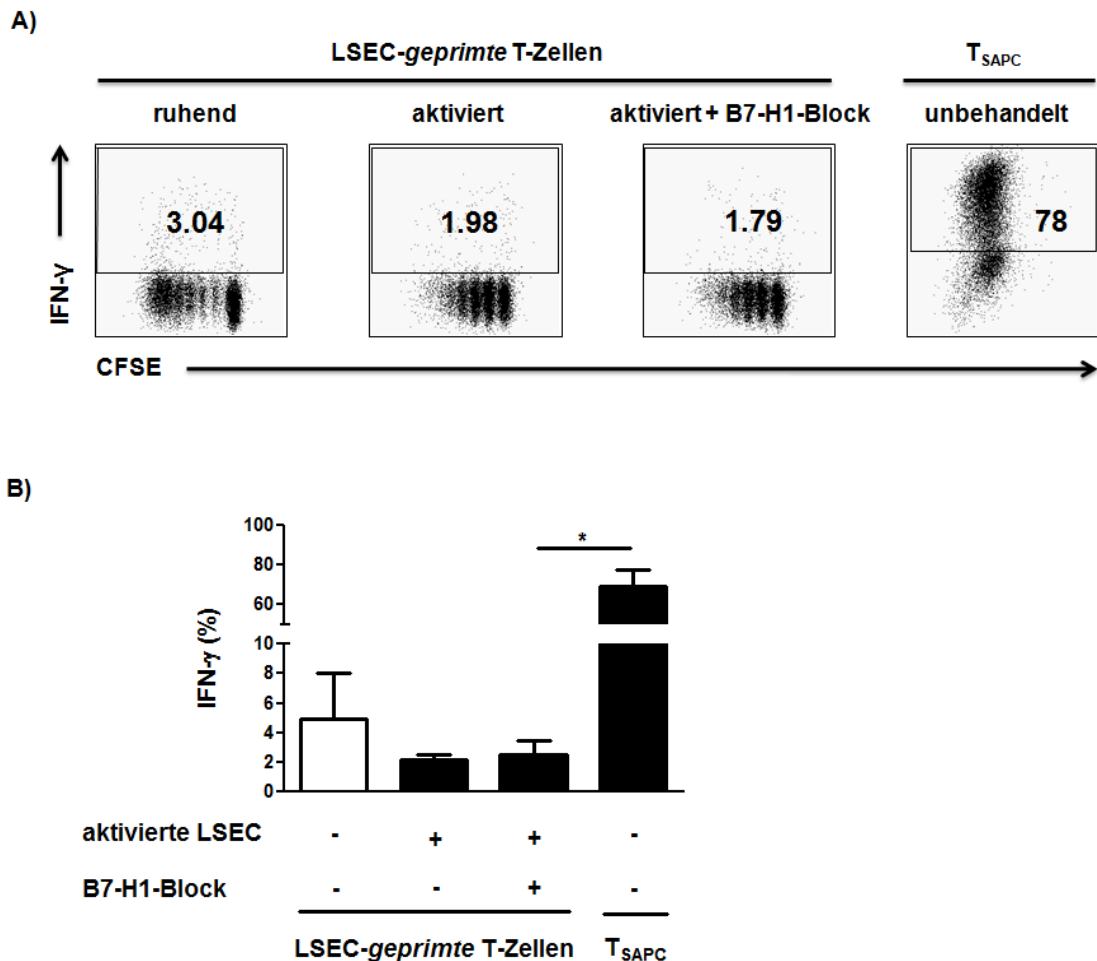


Abbildung 18: IFN- γ -Expression von CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgewaschen und mit naiven, CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen in Anwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid in Kokultur gegeben. Zusätzlich wurde der anti-B7-H1-Antikörper in einen der aktivierten Ansätze gegeben. Als Kontrollen dienten unbehandelte Ansätze mit ruhenden LSEC und SAPC. Am Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD90.2⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung des Prozentanteils IFN- γ ⁺ T-Zellen. Die *Dotplots* zeigen ein repräsentatives Experiment. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW \pm SD der prozentualen IFN- γ -Expression durch CD4⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bei gleichzeitigem B7-H1-Block bzw. SAPC im Vergleich zum Prozentanteil nach *Priming* durch ruhende LSEC von vier unabhängigen Experimenten. *P < 0,05; Mann-Whitney-Test.

4.4 CD8⁺ T-Zell-Phänotyp nach *Priming* durch aktivierte LSEC und Einfluss des B7-H1-Mechanismus auf die T-Zell-Toleranz

LSEC exprimieren wie jede andere kernhaltige Körperzelle MHC-I auf ihrer Zellmembran und können CD8⁺ T-Zellen exogene Antigene kreuzpräsentieren (Limmer, et al., 2000). Im dritten Teil dieser Arbeit sollten der Einfluss aktivierter LSEC auf die Merkmalsausprägung von naiven CD8⁺ T-Zellen nach antigenspezifischem *Priming* und die Rolle des B7-H1-Moleküls analysiert werden.

LSEC wurden isoliert, mit den inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ aktiviert und mit CFSE-markierten naiven CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von OVA kokultiviert. Zusätzlich wurde in einer Gruppe mit aktivierten LSEC B7-H1 blockiert (3.11.3). Nach der Kokultur wurden die T-Zellen abgeerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

4.4.1 Proliferation und Aktivierung der CD8⁺ Zellen

Nach *Priming* durch zytokinaktivierte LSEC zeigten CD8⁺ T-Zellen eine Tendenz zur stärkeren Proliferation als im Ansatz mit den ruhenden LSEC (Abb. 19A und B): 2084 \pm 45 CFSE-GMFI versus 2751 \pm 1046 CFSE-GMFI. Die CD8⁺ T-Zellen wiesen nach B7-H1-Block mit 1437 \pm 300 CFSE-GMFI eine tendenziell stärkere Zellteilung als in den beiden anderen Ansätzen auf (Abb 19A und B).

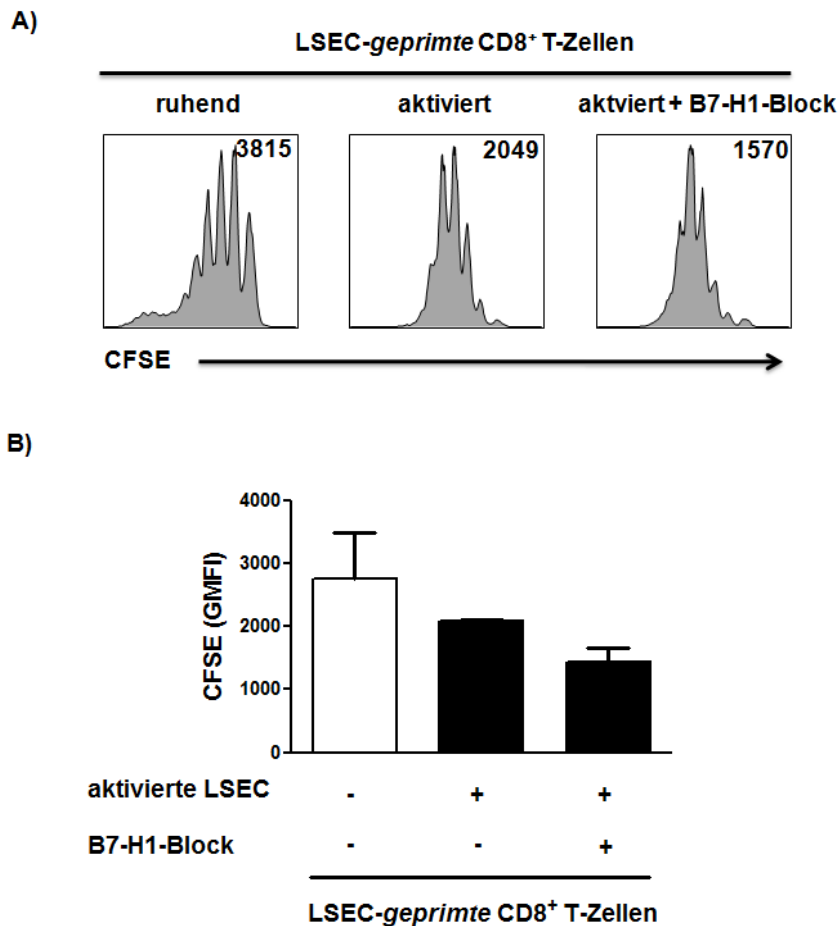


Abbildung 19: CD8⁺ T-Zell-Proliferation nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD8⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen aus OT-I Mäusen in Anwesenheit von OVA in Kokultur genommen. Zusätzlich wurde der anti-B7-H1-Antikörper in einen der aktivierten Ansätze gegeben. Als Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz mit ruhenden LSEC. An Tag 6 wurden die CD8⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD8⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung der T-Zell-Proliferation als die Abnahme des zellulären CFSE-Gehalts sowie des GMFI (rechts oben). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW \pm SD der GMFI von CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bei gleichzeitigem B7-H1-Block im Vergleich zur GMFI nach *Priming* durch ruhende LSEC von zwei unabhängigen Experimenten.

Zur Phänotypisierung wurde auch hier die Expression von CD25 auf der Lymphozytenmembran bestimmt. Es wurde eine tendenzielle Erhöhung der CD25-Expression nach erfolgtem B7-H1-Block mit 323 ± 154 GMFI verglichen mit den beiden anderen Ansätzen beobachtet, die gegenseitig keinen Unterschied zeigten (Abb. 20A und B): 155 ± 67 GMFI bei ruhenden LSEC bzw. 164 ± 54 GMFI bei zytokinaktivierten LSEC.

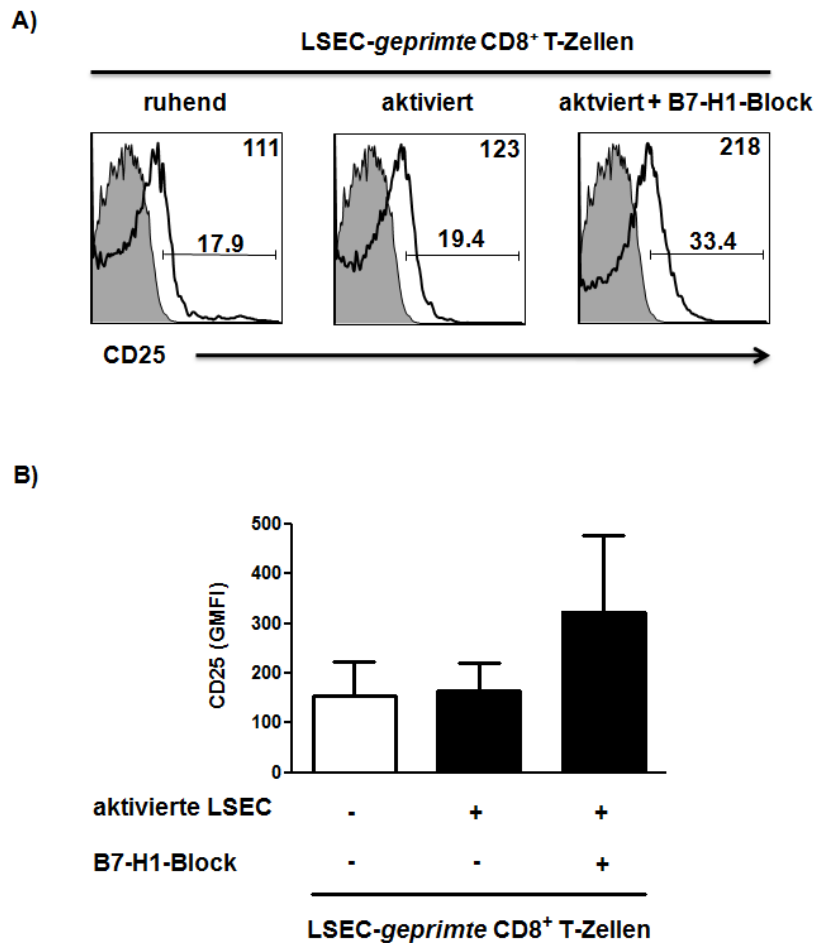


Abbildung 20: Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD8⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen aus OT-I Mäusen in Anwesenheit von OVA in Kokultur genommen. Zusätzlich wurde der anti-B7-H1-Antikörper in einen der aktivierten Ansätze gegeben. Als Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz mit ruhenden LSEC. An Tag 6 wurden die CD4⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD8⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung des prozentualen Anteils CD25⁺ T-Zellen sowie des GMFI der Zellen (rechts oben). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte Kontrolle; Verstärkte Linie, spezifischer Antikörper. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW \pm SD der GMFI von CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bei gleichzeitigem B7-H1-Block im Vergleich zur GMFI nach *Priming* durch ruhende LSEC von zwei unabhängigen Experimenten.

4.4.2 IFN- γ -Expression der CD8⁺ Zellen

Die Bestimmung des Prozentanteils IFN- γ ⁺ Zellen zeigte eine Tendenz zur stärkeren IFN- γ -Expression von CD8⁺ T-Zellen nach *Priming* durch zytokinaktivierte LSEC im Vergleich zu ruhenden LSEC (Abb. 21A und B): $14,07 \pm 1,32$ % IFN- γ ⁺ T-Zellen gegenüber $7,56 \pm 2,98$ % IFN- γ ⁺ T-Zellen. Weiterhin erzeugte der B7-H1-Block einen tendenziell noch stärkeren Anstieg der Zytokinexpression mit $25,33 \pm 12,48$ % IFN- γ ⁺ T-Zellen (Abb. 21A und B).

Zusammenfassend führte die Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktivierte LSEC an naiven CD8⁺ T-Zellen zu einer erhöhten Proliferation und IFN- γ -Expression der T-Zellen. Der Aktivierungsgrad blieb unverändert bei konstanter CD25-Expression. Ein B7-H1-Block der aktivierten LSEC bewirkte einen Anstieg der Proliferation, CD25- und IFN- γ -Expression von LSEC-geprägten CD8⁺ T-Zellen.

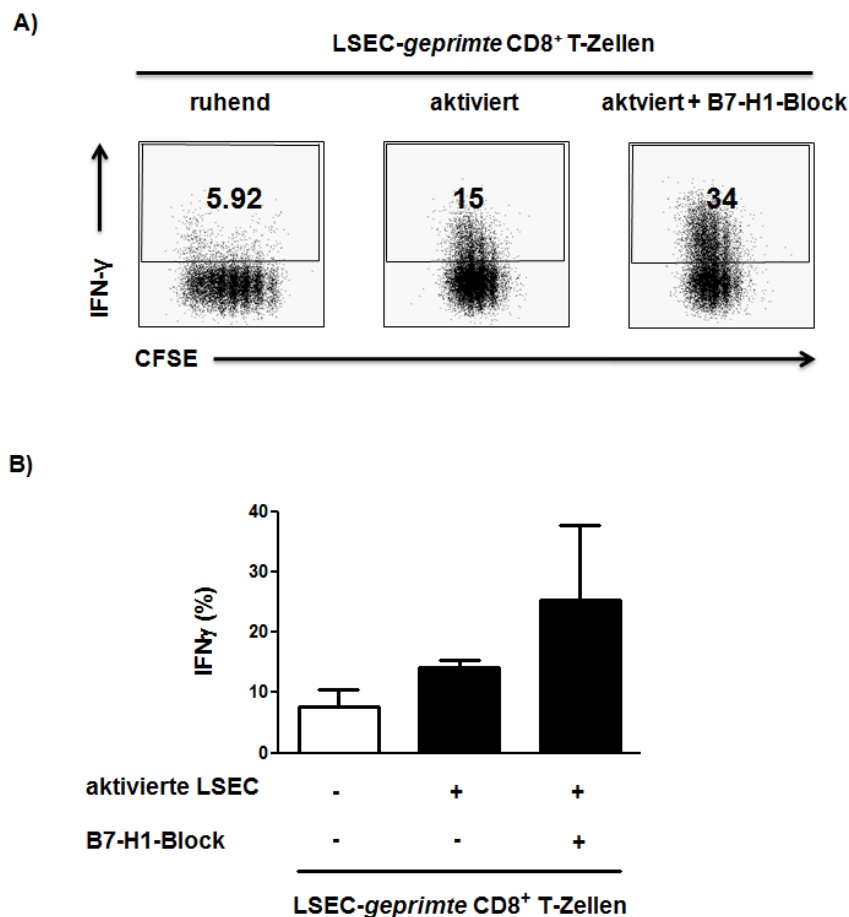


Abbildung 21: IFN- γ -Expression von CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte, B7-H1-blockierte LSEC.

LSEC wurden unter inflammatorischen im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen mit naiven CD8⁺ T-Zellen *in vitro* kokultiviert. LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ aktiviert. Über Nacht kultivierte LSEC wurden abgespült und mit naiven, CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen aus OT-I Mäusen in Anwesenheit von OVA in Kokultur genommen. Dabei wurde einen der aktivierten Ansätze der anti-B7-H1-Antikörper in zugegeben. Als Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz mit ruhenden LSEC. An Tag 6 wurden die CD8⁺ T-Zellen abgeerntet und am Durchflusszytometer analysiert. In die Auswertung wurden nur CD8⁺ T-Zellen eingeschlossen. **A**, Darstellung des Prozentanteils IFN- γ ⁺ T-Zellen. Die *Dotplots* zeigen ein repräsentatives Experiment. **B**, Das Säulendiagramm zeigt MW \pm SD der prozentualen IFN- γ -Expression durch CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC bei gleichzeitigem B7-H1-Block im Vergleich zum Prozentanteil nach *Priming* durch ruhende LSEC von zwei unabhängigen Experimenten.

5 Diskussion

Die Leber begünstigt die antigenspezifische Toleranzinduktion im Organismus statt eine Immunantwort einzuleiten (Racanelli und Rehermann 2006). Eine Schlüsselrolle für diese Funktion nehmen dabei die nicht-parenchymalen antigepräsentierenden Zellpopulationen ein. So verleiht das Lebersinusendothel als eine Population von nicht-professionellen APC der Leber naiven, antigenunerfahrenen T-Zellen durch Antigenpräsentation einen tolerogenen Phänotyp (Limmer et al., 2005; Kruse et al., 2009). Bei entzündlichen Leberkrankheiten wie den viralen Hepatitiden und der AIH kommt es zu einer lymphozytären Infiltration des Organs und zur Veränderung des hepatischen Mikromilieus. Ob die Induktion von T-Zell-Toleranz durch LSEC auch in der entzündlichen Situation nach Kontakt mit proinflammatorischen T-Effektorzellen und Zytokinen erhalten bleibt und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen, ist jedoch nicht bekannt.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen die Phänotypänderung des inflammatorisch aktivierten Lebersinusendothels und das *Priming* von naiven T-Zellen durch aktivierte LSEC in Hinblick auf die Induktion von tolerogenen oder immunogenen Eigenschaften. Dabei wurde insbesondere der Einfluss einer Interaktion zwischen dem koinhibitorischen B7-H1-Molekül auf der LSEC-Membran und seinem Rezeptor PD-1 in der Ausprägung des T-Zell-Phänotyps untersucht.

5.1 *In-vitro*-Modell für die hepatische Inflammation

In Lebererkrankungen wie den viralen Hepatitiden und der AIH führt die Immunantwort des Organismus auf fremde oder körpereigene Antigene zu einer Leberentzündung und -schädigung. Auch eine toxische Leberschädigung z.B. im Rahmen der alkoholinduzierten Hepatitis oder der nichtalkoholischen Steatohepatitis scheint durch die Zellen des eigenen Immunsystems vermittelt zu werden (Tiegs 2007). Eine zentrale Rolle für die Leberschädigung nehmen die CD4⁺ Effektorlymphozyten (Th1-Zellen) ein, wobei eine Th1-Immunantwort mit erhöhten TNF- α - und IFN- γ -Spiegeln im hepatischen Mikromilieu einhergeht (Tiegs 2007). So wurde bei Patienten mit chronischer Hepatitis C eine Korrelation zwischen der progressiven Leberschädigung und der erhöhten, intrahepatischen Expression von Th1-typischen Zytokinen beobachtet (Napoli et al., 1996). In Maus-Modellen für Concanavalin A-induzierte AIH und in Hepatitis-B-Virus-transgenen Mäusen wurde *in vivo* gezeigt, dass die Leberschädigung von der CD4⁺ T-Zell-Aktivierung und der intrahepatischen Produktion von TNF- α und IFN- γ abhängt (Gantner et al.,

1995; Franco et al., 1997; Sass et al., 2002). Ferner wurde im Maus-Modell für akute Leberschädigung *in vivo* demonstriert, dass Th1-Zellen die wichtigsten Effektorzellen sind und der Transaminasenanstieg konnte durch monoklonale Antikörper gegen TNF- α und IFN- γ rückgängig gemacht werden (Nishimura und Ohta 1999). Studien für nichtalkoholische Steatohepatitis in Maus-Modellen für Adipositas wiesen auch auf eine Th1-Polarisierung der hepatischen Lymphozyten hin, die intrazellulär vermehrt TNF- α und IFN- γ exprimierten (Li et al., 2005).

Inflammatorische Leberkrankheiten, die zu einer Fibrosierung oder Zirrhose führen können, gehen im humanen und murinen System mit Veränderungen des Lebersinusendothels einher. Charakteristisch sind der Verlust von endothelialen *Fenestrae*, die Akkumulation von Bindegewebe im Disse-Raum und der Nachweis von einer subendothelialen Basalmembran (Ogawa 1982; Ishak et al., 1991; Mori et al., 1993). Des Weiteren wird in der entzündeten Leber die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch LSEC beeinflusst (Ali et al., 2006). So werden bei einer Leberzirrhose Adhäsionsproteine auf LSEC exprimiert, die unter physiologischen Bedingungen nicht detektierbar sind, wie das PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) und verschiedene Lamininrezeptoren (Couvelard et al., 1993). Außerdem wird die konstitutive Expression des Leukozyten-Adhäsionsmoleküls VCAM-1 und des für die Attraktion von Neutrophilen wichtigen ICAM-1 hochreguliert (Steinhoff und Brandt 1996; Sakamoto et al., 1997; Lalor und Adams 1999).

Zunächst stand im Mittelpunkt dieser Arbeit die *in-vitro*-Simulation einer hepatischen Inflammation, die auf zwei verschiedenen Wegen induziert werden sollte. Zum einen sollten LSEC über Zell-Zell-Kontakte mit Th1-Effektorzellen unter spezifischer Antigenpräsentation, TCR-Stimulierung und Vermittlung kostimulatorischer Signale aktiviert werden. Zum anderen sollten die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IFN- γ eingesetzt werden. Die inflammatorische LSEC-Aktivierung führte zu Änderungen in der Expression von Adhäsionsmolekülen, MHC-II und des koinhibitorischen B7-H1-Moleküls.

Ruhende LSEC zeigten eine konstitutive Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Auf einer inflammatorischen Aktivierung hin wurden beide Adhäsionsproteine hochreguliert. Konkordant dazu konnte in anderen Studien eine gesteigerte Expression von ICAM-1 auf humanen venösen Endothelzellen und von VCAM-1 auf humanen intestinalen mikrovaskulären Endothelien nach *in-vitro*-Stimulation mittels Zytokine induziert werden (Dustin und Springer 1988; Haraldsen et al., 1996). Eine Steigerung der Expression beider Adhäsionsmoleküle auf LSEC ist auch durch andere proinflammatorisch wirkende Substanzen wie Endotoxin induzierbar (Knolle et al.,

1999a). Diese Hochregulation könnte die antigenabhängigen Interaktionen von LSEC mit naiven T-Zellen stabilisieren und hierdurch die T-Zell-Stimulation unterstützen (Camacho et al., 2001). Das B7-H1-Molekül wurde durch ruhende LSEC exprimiert und unter inflammatorischen Bedingungen stark hochreguliert. Im Einklang dazu stehen immunhistochemische Analysen von Leberbiopsien bei Patienten mit AIH, die eine erhöhte B7-H1-Expression in den Lebersinusoiden auf LSEC und Kupffer-Zellen zeigen (Oikawa et al., 2007). Es wurde beobachtet, dass die Anwesenheit des spezifischen Th1-Zell-Antigens in der Zellkultur einen additiven Effekt auf die B7-H1-Hochregulation hatte. Das spricht für die Bedeutung der TCR-Stimulierung, was wiederum Einfluss auf die Proteinexpression LSEC hat. Korrelierend hierzu wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass antigenspezifische Interaktionen zwischen naiven T-Zellen und ruhenden LSEC zur Hochregulation des B7-H1-Moleküls auf den Endothelzellen sowie ihres Rezeptors PD-1 auf den T-Zellen führt (Diehl et al., 2008).

Mikrovaskuläre Endothelien des Menschen exprimieren das für die Antigenpräsentation an CD4⁺ T-Zellen notwendige MHC-II-Protein konstitutiv (Choi et al., 2004), nicht-aktivierte Endothelien von Nagetieren wie Mäuse und Raten dagegen nicht (Rose 1998; Catravas 1999). Auch LSEC weisen unter homöostatischen Bedingungen eine konstitutive Expression vom MHC-II-Molekül (Rubinstein et al., 1986; Lohse et al., 1996; Knolle et al., 1999b). Eine Aktivierung mittels TNF- α und IFN- γ bewirkte eine MHC-II-Expression durch einen größeren Prozentsatz von LSEC. Auch andere Studien haben gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine MHC-II auf der Oberfläche sowohl von humanen als auch von murinen Epithelien induzieren können (Collins et al., 1984; Murray et al., 1994; Batten et al., 1996; Haraldsen et al., 1998). Unter einer Th1-Aktivierung wurde lediglich eine Tendenz zur Steigerung der Expression von MHC-II-Molekülen beobachtet. Auch eine antigenvermittelte Interaktion mit dem TCR von Th1-Zellen oder eine vorausgehende Restimulierung dieser konnte die MHC-II-Expression auf der Sinusedothelzellmembran nicht steigern.

Außerdem zeigte eine 24- im Vergleich zu einer 48-stündigen LSEC-Aktivierung mittels Zytokine keinen signifikanten Unterschied in der Oberflächenexpression der Proteine ICAM-1, VCAM-1, B7-H1 und MHC-II. Somit ist von einer stärkeren Stimulierung des Lebersinusendothels durch längere Inkubationszeiten unter den gewählten *in vitro* inflammatorischen Bedingungen nicht auszugehen.

Die Ergebnisse der proinflammatorischen Aktivierung von murinen LSEC zeigten, dass sowohl Zytokine als auch Interaktionen mit Th1-Zellen eine deutliche Hochregulation der Adhäsionsproteine ICAM-1 und VCAM-1 und des koinhibitorischen Proteins B7-H1 bewirken. Zudem konnten exogen zugeführte, proinflammatorische Zytokine das MHC-II-Protein in einer

prozentual größeren Anzahl von Sinusendothelzellen induzieren. Th1-Zellen konnten dagegen die MHC-II-Expression auf LSEC nicht steigern. Auch eine vorangehende Restimulierung der Th1-Zellen induzierte keine Hochregulation von MCH-II auf der LSEC-Membran. Diese Ergebnisse zeigten, dass insgesamt eine Aktivierung des Endothels sowohl durch die Zytokine als auch durch die Th1-Zellen stattfand, auch Unterschiede in Hinsicht auf die MHC-II-Hochregulation der LSEC waren.

Zum Verständnis dieser Ergebnisse ist eine Unterscheidung von rein humoralen gegenüber zellulären LSEC-Stimuli wichtig. Eine alleinige Exposition zu löslichen Entzündungsmediatoren scheint zum potentiell immunogenen LSEC-Phänotyp mit einer erhöhter MHC-II-Expression zu führen. Die Inkubation mit proinflammatorischen Th1-Zellen resultiert dagegen nicht in einer einseitigen Wirkung auf das Endothel, sondern vielmehr muss die gegenseitige Interaktion von Th1-Zellen und LSEC berücksichtigt werden. Carambia et al demonstrierten, dass ruhendes Lebersinusendothel hemmend auf Th1-Effektorzellen wirkt und ihre IFN- γ -Sekretion inhibiert (Carambia et al., 2013). Dies könnte die proinflammatorische Th1-Wirkung auf LSEC einschränken und das Unterbleiben der MHC-II-Hochregulation erklären, obwohl gleichzeitig Adhäsionsproteine (ICAM-1 und VCAM-1) und B7-H1 induziert werden. Deutlich wird hier die zentrale Rolle der TCR-MHC-Interaktionen zwischen LSEC und T-Zellen, die unter antigenabhängigem *Priming* zur T-Zell-Toleranz führen können (Kruse et al., 2009). Auch bei den LSEC scheint nicht ein immunogener, sondern ein tolerogener Phänotyp durch Antigen- und Th1-Zell-Kontakt favorisiert zu werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dieses *in-vitro*-Modell vergleichbar mit der *in-vivo*-Situation einer hepatischen Inflammation ist, was für seine Validität spricht. Insbesondere werden er zwei wichtige Aspekte der *in-vivo*-Situation widerspiegelt. Zum einen erfolgte die Induktion einer Sinusendothelaktivierung durch zelluläre und lösliche Mediatoren, die auch *in vivo* entscheidend an der hepatischen Inflammation beteiligt sind. Zum anderen zeigten die proinflammatorisch stimulierten LSEC einen Phänotyp, der ein typisches Proteinexpressionsmuster eines aktivierten Endothels hat.

5.2 *In-vitro-Priming* naiver CD4⁺ T-Zellen durch aktivierte LSEC

Ihre Aufgabe, bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharid und verschiedene Nahrungsantigene aus dem Portalkreislauf zu entfernen, ohne dabei eine Immunreaktion auszulösen, erfüllt die Leber, indem sie die Toleranz und Immunität von T-Zellen beeinflusst.

Die Fähigkeit des Lebersinusendothels, tolerogen auf CD4⁺ T-Zellen zu wirken, ist weniger gut definiert als ihre etablierte Rolle in der CD8⁺ T-Zell-Toleranzinduktion. Das *Priming* von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC scheint eher eine Th2- als eine Th1-Immunantwort zu begünstigen (Klugewitz et al., 2002). Ruhende LSEC scheitern, einen Th1-Phänotyp in naiven CD4⁺ T-Zellen mittels MHC-II-restringierter Präsentation exogener Antigene zu induzieren (Knolle et al., 1999b). LSEC-geprimte CD4⁺ T-Zellen können eine inflammatorische T-Zell-Antwort supprimieren und wirken protektiv gegen eine T-Zell-vermittelte Hepatitis *in vivo* (Kruse et al., 2009). Ob eine inflammatorische Aktivierung der LSEC ihr tolerogenes T-Zell-*Priming* beeinflusst oder sogar aufhebt, ist nicht bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit wiesen aktivierte LSEC (5.1) eine signifikant erhöhte Expression des zur Antigenpräsentation wichtigen MHC-II-Moleküls und eine deutliche Hochregulation der kostimulatorischen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf. Im zweiten Teil wurde untersucht, ob in der inflammatorischen Situation LSEC eine immunogene statt einer tolerogenen Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen induzieren.

Der direkte Vergleich einer Antigenpräsentation durch ruhende und aktivierte LSEC zeigte, dass eine vorausgehende Th1-Aktivierung kleinere Proliferationsraten sowie eine schwächere CD25-Expression und IFN- γ -Produktion induziert. Ähnliche Beobachtungen konnten nach LSEC-Aktivierung mit TNF- α und IFN- γ gemacht werden, jedoch blieb hier die CD25-Expression unverändert. Diese Ergebnisse sprechen für den Erhalt der Toleranz in naiven CD4⁺ T-Zellen nach antigenabhängiger Stimulierung durch inflammatorisch aktivierte LSEC. Zudem scheint der T-Zell-Aktivierungsgrad sogar niedriger zu sein als nach Stimulierung durch ruhende LSEC. Die Gründe für das erhöhte Potential von aktivierten LSEC, tolerogene Eigenschaften in naiven CD4⁺ T-Zellen zu induzieren sind auf zwei verschiedenen Ebenen zu suchen: Freisetzung von Mediatorsubstanzen und direkte Zell-Zell-Interaktionen. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde beschrieben, dass in Transwell-Experimenten DC-stimulierte CD4⁺ T-Zellen weniger IFN- γ und IL-17 in Anwesenheit von LSEC auf dem Boden der Platte sezernieren, obwohl kein direkter Zellkontakt besteht (Carambia et al., 2013). Diese Beobachtung spricht für die Rolle von suppressiv wirkenden, löslichen Substanzen. Auf der Mediatorebene sind hauptsächlich zwei Botenstoffe mit den tolerogenen Eigenschaften von LSEC assoziiert worden: IL-10 und Prostaglandin E2 (Knolle et al., 1998). Das immunsuppressiv wirkende Prostaglandin E2 wird nach Stimulation mit proinflammatorischem, bakteriellem Endotoxin durch LSEC von Meerschweinchen freigesetzt (Rieder et al., 1990; Phipps et al., 1991). Andererseits liegt umfangreiche Literatur über die Wirkung von IL-10 auf LSEC vor, das im hepatischen Mikromilieu sowohl von Kupffer'schen Zellen als auch von DC produziert und sezerniert wird

(Knolle et al., 1995; Goddard et al., 2004). So reduziert IL-10 *in vitro* die Antigenaufnahme der LSEC über den Mannoserezeptor und die Expression von MHC-II, CD80 und CD86 (Knolle et al., 1998). Des Weiteren führt eine infektionsbedingte, unkontrollierte Zytokinproduktion durch CD4⁺ T-Zellen in IL-10 Knock-out-Mäusen zur Leberschädigung, Organversagen und Tod (Gazzinelli et al., 1996). Eine IL-10-Sekretion durch LSEC selbst ist in der aktuell vorliegenden Literatur nicht beschrieben worden. Auch durch ruhende LSEC *geprimte* CD4⁺ T-Zellen zeigen keine IL-10-Expression (Kruse et al., 2009). Dementsprechend ist auch eine IL-10-Sekretion von CD4⁺ T-Zellen nach *Priming* durch aktivierte LSEC unwahrscheinlich. Andererseits wurde die Hypothese aufgestellt, dass LSEC während ihrer *ex vivo* Isolation mittels MACS mit IL-10 in Kontakt kommen könnten (Crispe 2011). Somit scheint das Zusammenwirken verschiedener Faktoren auf der Mediatorebene für die erhaltene und sogar tendenziell erhöhte tolerogene Kapazität von aktivierten LSEC beizutragen. Vermutlich sezernieren diese Endothelzellen unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt einen bis jetzt nicht identifizierten Botenstoff, am ehesten Prostaglandin E2. Gleichzeitig halten IL-10-Effekte auch in *ex vivo* isolierten LSEC weiterhin an. Eine intensivere IL-10-Sekretion durch kleinere Mengen kontaminierende DC und Kupffer'sche Zellen kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Auf der Zell-Zell-Interaktionsebene sind ebenfalls mehrere Aspekte zu beachten. Ein Grund für die erhaltene CD4⁺ T-Zell-Toleranz könnte die Ausbildung von starken Zellbindungen zwischen aktivierten LSEC und naiven CD4⁺ T-Zellen sein wie die erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 suggeriert. Lebersinusendothelien von Mäusen, die in einer sterilen Umgebung gezüchtet wurden, zeigten in zwei unabhängigen Arbeiten eine niedrige und für Interaktionen mit T-Zellen ungenügende Expression von Adhäsionsmolekülen. Zudem konnten diese Tiere auch keine Toleranz auf oral verabreichtes Antigen entwickeln (Kiyono et al., 1982; Komatsu et al., 2000). Schwächere kostimulatorische Signale bei der Antigenpräsentation könnten ebenfalls einen Mechanismus darstellen. So bewirkt eine Exposition des Lebersinusendothels zu bakteriellem Endotoxin eine Herunterregulation der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 (Knolle et al., 1999a). Eine weitere Erklärung für die erhaltene und tendenziell erhöhte Toleranzinduktion durch aktivierte LSEC könnte die nachgewiesene Hochregulation des koinhibitorischen B7-H1-Moleküls sein, dem bilaterale Wirkungen zugeschrieben werden. Ein direkter, suppressiver Effekt auf die Effektdifferenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen ist bekannt (Diehl et al., 2008). Für DC wurde ein Prozess beschrieben, bei dem über B7-H1 suppressive Eigenschaften in APC während ihrer Interaktion mit T-Zellen induziert werden können (Kuipers et al., 2006). Schurich et al haben die Vermutung geäußert, dass derselbe

Mechanismus suppressiv auf LSEC im Rahmen einer Antigenpräsentation an naiven CD8⁺ T-Zellen wirken könnte (Schurich et al., 2010).

Das T-Zell-*Priming* durch LSEC und professionelle SAPC unterscheidete sich im Vergleich. Ruhende und inflammatorisch aktivierte LSEC induzierten in naiven CD4⁺ T-Zellen eine geringere Proliferation, CD25-Expression und IFN- γ -Produktion als professionelle APC konkordant zu der vorliegenden Literatur (Kruse et al., 2009). Auch in einer weiteren Arbeit haben ruhende LSEC eine niedrigere IFN- γ -Produktion in naiven CD4⁺ T-Zellen induziert als eine Präparation von Knochenmarkszellen, die zu 95 % DC enthielt (Knolle et al., 1999b). Diese Unterschiede waren erwartet, denn professionelle APC weisen eine stärkere Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen auf (Limmer und Knolle 2001).

5.3 *In-vitro-Priming* naiver CD8⁺ T-Zellen durch aktivierte LSEC

LSEC fördern die hepatische Immuntoleranz durch einen tolerogenen Einfluss nicht nur auf CD4⁺ T-Zellen, sondern auch auf die Träger der zytotoxischen T-Zell-Immunität die CD8⁺ T-Zellen. Als erster Schritt in der Induktion einer CD8⁺ T-Zell-Toleranz gegenüber zirkulierenden Antigenen durch LSEC wurde die antigenspezifische Retention von naiven CD8⁺ T-Zellen in der Leber beschrieben (von Oppen et al., 2009). Zudem zeigte ein *in-vitro*-Modell, dass das Modellantigen OVA durch rezeptorvermittelte Endozytose unter Einsatz der Mannose- und *Scavenger*-Rezeptoren von den LSEC aufgenommen und CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentiert wird (Limmer et al., 2005). Die Kreuzpräsentation von spezifischem Antigen an naiven CD8⁺ T-Zellen durch LSEC führt zu einer Zellproliferation und -expansion mit mangelnden Effektorfunktionen (von Oppen et al., 2009). So wurde in *in-vitro*-Experimenten gezeigt, dass antigenkreuzpräsentierende LSEC im Unterschied zu professionellen Milz-APC eine Herunterregulation der IFN- γ - und IL-2-Produktion in CD8⁺ T-Zellen bewirken (Limmer et al., 2000). Limmer et al konnten *in vitro* keine Zytotoxizität für LSEC-*geprimte* CD8⁺ T-Zellen nachweisen, wogegen Milz-APC eine hohe antigenspezifische Zytotoxizität induzierten (Limmer et al., 2000). Auch die Induktion einer CD8⁺ T-Zell-Toleranz gegenüber Tumorzellen, die mit dem spezifischen Antigen transfiziert wurden, war mittels antigenspezifischen LSEC-*Priming* möglich (Limmer et al., 2000). Im *in-vivo*-Maus-Modell führt der adoptive Transfer von antigengepulsten LSEC zur Abnahme der spezifischen Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen und zur Reduktion ihrer IFN- γ -Expression (Limmer et al., 2005). Somit liegt wesentliche Evidenz für die tolerogene Wirkung von LSEC auf naive CD8⁺ T-Zellen vor. Es ist jedoch nicht bekannt, ob

diese Toleranz auch unter inflammatorischen Bedingungen nach LSEC-Aktivierung erhalten bleibt. Auf diese Frage wurde im dritten Teil der vorliegenden Arbeit eingegangen.

Ruhende LSEC induzierten einen T-Zell-Phänotyp, der sich mit niedrigen Proliferationsraten, schwacher IFN- γ -Produktion und CD25-Expression präsentierte. Diese Eigenschaften sprechen für eine funktionelle Inaktivität und ähneln sehr denen von „erschöpften“ CD8⁺ T-Zellen, die bei einer persistierenden, viralen Infektion entstehen (Barber et al., 2006). Eine Aktivierung der LSEC mit den proinflammatorischen Zytokinen IFN- γ und TNF- α induzierte eine stärkere Proliferation und IFN- γ -Expression in naiven CD8⁺ T-Zellen nach *Priming* in Anwesenheit ihres spezifischen Antigens, während die CD25-Expression unverändert blieb. Diese Beobachtung weist auf eine Aufhebung des tolerogenen *Primings* von CD8⁺ T-Zellen durch inflammatorisch aktivierte LSEC hin. Eine Brechung der LSEC-vermittelten CD8⁺ T-Zell-Toleranz wurde bei der Kreuzpräsentation einer hohen Anzahl MHC-I-geladener Peptide beschrieben und einer starken Stimulation des TCR zugeschrieben (Schurich et al., 2010). Die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 als Ursache für die Toleranzaufhebung wurde in derselben Studie ausgeschlossen, denn LSEC aus CD80/86^{-/-}-Mäusen konnten in Anwesenheit hoher Antigenkonzentrationen eine Differenzierung der naiven CD8⁺ T-Zellen zu CTL mit IFN- γ - und IL-2-Produktion induzieren (Schurich et al., 2010). Eine IL-2-Freisetzung durch die *geprimten* CD8⁺ T-Zellen selbst scheint ebenfalls zur Brechung der Toleranz beizutragen (Schurich et al., 2010). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die IFN- γ -Freisetzung der LSEC-*geprimten* CD8⁺ T-Zellen durch eine funktionelle IL-2-Inaktivierung inhibiert wird (von Oppen et al., 2009).

Insgesamt kann vermutet werden, dass inflammatorisch aktivierte LSEC am ehesten über eine MHC-I-Hochregulation naiven CD8⁺ T-Zellen vermehrt Antigene kreuzpräsentieren, was über eine verstärkte TCR-Signalübertragung zur IL-2-abhängigen Aufhebung der T-Zell-Toleranz führt. Dass aktivierte LSEC verstärkt MHC-I exprimieren, steht im Einklang mit Studien, welche eine mehrfache Expressionserhöhung dieses Proteins auf humanen Endothelzellen der *Vena umbilicalis* (Wedgwood et al., 1988) und auf zerebralen Endothelzellen der Rate (Male und Pryce 1988) nach Zytokinaktivierung beschreiben.

Gegenstand der Untersuchung waren auch die unterschiedlichen Phänotypeigenschaften von naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach *Priming* durch aktivierte LSEC. Während in CD4⁺ T-Zellen ein tolerogener Phänotyp induziert wird, werden die CD8⁺ T-Zellen immunogen *geprimt*. Ruhende LSEC *primen* dagegen beide T-Zellarten tolerogen (Kruse et al., 2009; von Oppen et al., 2009). Diese Ergebnisse könnten mit T-Zell-Antworten bei der chronifizierten HCV-Infektion in Verbindung gebracht werden. Hier wurde eine Suppression der CD4⁺ T-Zell-

Antwort bei persistierender Virämie und eine niedrige CD8⁺ T-Zell-Antwort mit Lyse von infizierten Zellen beschrieben, die eine chronische Hepatitis verursacht, aber nicht ausreichend für eine vollständige Viruseliminierung ist (Chang et al., 2001). Somit könnte vermutet werden, dass das Lebersinusendothel der chronisch entzündeten Leber indirekt sowohl die Aufrechterhaltung der Inflammation als auch die Persistenz der Pathogens begünstigt.

5.4 Die Rolle der PD-1/B7-H1-Interaktion für die Toleranzinduktion durch LSEC

Das Protein B7-H1 ist auch als PD-L1 (*Programmed Cell Death Ligand 1*) bekannt und gehört zur B7-Genfamilie. Es wird auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und bindet an seinen Rezeptor PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*), welcher auf aktivierten T-, B- und myeloiden Zellen gefunden werden kann. Während die anderen zwei Mitglieder der B7-Familie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) in der Initiation von Immunantworten kostimulatorisch wirken, führt die Interaktion zwischen B7-H1 und PD-1 zur Inhibition von TCR-vermittelten Immunreaktionen (Lenschow et al., 1996; Freeman et al., 2000). Eine zentrale Rolle von B7-H1 ist die Regulation von antigenspezifischen Immunreaktionen. So schützt die Expression dieses Moleküls auf Pankreasparenchymzellen vor der Entwicklung eines Autoimmundiabetes in Mäusen und auf nicht-parenchymatischen Zellen der Leber vor Autoimmunehepatitis (Iwai et al., 2003; Dong et al., 2004; Keir et al., 2006).

LSEC exprimieren konstitutiv das B7-H1-Molekül und induzieren über PD-1/B7-H1-Interaktionen eine CD8⁺ T-Zell-Toleranz in der Leber. Eine Studie beschreibt, dass LSEC aktiv und B7-H1-abhängig einen tolerogenen Phänotyp statt einer Effektordifferenzierung in naiven CD8⁺ T-Zellen fördern (Diehl et al., 2008). Dabei ist die gegenseitige Stimulation von Lebersinusendothelzellen und CD8⁺ T-Zellen entscheidend. Einerseits findet eine tolerogene Reifung der LSEC statt, indem sie ihre B7-H1-Expression hochregulieren, was bei professionellen APC wie DC nicht der Fall ist. Andererseits wird die PD-1-Expression auf der T-Zell-Membran der *geprimten* CD8⁺ T-Zellen gesteigert (Diehl et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Exposition von LSEC zu einer inflammatorischen Umgebung eine Hochregulation vom B7-H1-Molekül induziert. Ob und wie diese stärkere B7-H1-Expression die tolerogenen Eigenschaften des Lebersinusendothels gegenüber naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beeinflusst, ist jedoch nicht bekannt und wurde hier zum ersten Mal analysiert.

Zunächst wurde durch Blockierungs-Experimente mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern die Rolle von B7-H1 im tolerogenen *Priming* von CD4⁺ T-Zellen untersucht. Hierbei zeigten sich

keine Unterschiede in der Proliferation, CD25-Expression und IFN- γ -Produktion, was für eine Erhaltung des tolerogenen CD4⁺ T-Zell-Phänotyps spricht. Demzufolge scheint der PD-1/B7-H1-Mechanismus in der inflammatorischen Situation keine Schlüsselrolle für die LSEC-induzierte Toleranz in naiven CD4⁺ T-Zellen zu spielen. Konkordant hierzu berichten Kruse et al, dass eine B7-H1-Blockierung auf der Zellmembran von ruhenden LSEC keine Aufhebung der Toleranz in naiven CD4⁺ T-Zellen induziert (Kruse et al., 2009).

Allerdings wurde beschrieben, dass ruhende LSEC die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen in CD4⁺ Th1-Effektorzellen B7-H1-abhängig supprimieren können (Carambia et al., 2013). Diese Ergebnisse lassen sich durch den unterschiedlichen Kostimulationsbedarf von naiven und ausdifferenzierten CD4⁺ T-Zellen zur Aktivierung erklären. So wurde für murine Endothelzellen aus Lymphknoten gezeigt, dass durch eine IFN- γ -Aktivierung die Proliferation von CD4⁺ T-Effektorzellen, aber nicht von naiven CD4⁺ T-Zellen induziert werden kann (Perez et al., 1998).

Im CD8⁺ T-Zell-Kontext dagegen war die Toleranzinduktion durch inflammatorisch aktivierte LSEC abhängig vom PD-1/B7-H1-Mechanismus. Eine B7-H1-Blockierung führte zur stärkeren Proliferation, höheren CD25-Expression und vermehrten IFN- γ -Produktion der *geprimten* CD8⁺ T-Zellen. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Erkenntnissen über das CD8⁺ T-Zell-*Priming* durch ruhende LSEC überein (Diehl et al., 2008).

Insgesamt sollten diese Ergebnisse im Zusammenhang des empfindlichen Gleichgewichts zwischen koinhibitorischen und kostimulatorischen Signalen bei der Induktion von Toleranz oder Immunität gedeutet werden (Nurieva et al., 2006). Einerseits bleibt die Intensität der kostimulatorischen Signale über CD80 und CD86 auch beim aktivierten Lebersinusendothel relativ niedrig wie z.B. nach Exposition zu bakteriellem Endotoxin (Knolle et al., 1999a), so dass eine Ausschaltung des B7-H1-Signals für eine Brechung der Toleranz in naiven CD4⁺ T-Zellen nicht ausreicht. Andererseits erfordern naive CD4⁺ T-Zellen zur Effektorzellendifferenzierung eine relativ starke TCR-Stimulation mittels MHC-II-restringierter Antigenpräsentation, die selbst durch aktivierte LSEC nicht gewährleistet wird. Im Unterschied scheint im CD8⁺ T-Zell-Kontext eine starke MHC-I-vermittelte TCR-Stimulation vorzuliegen, die sogar bei schwachen CD80/86-Signalen eine Brechung der Toleranz bewirkt. Dann führt die zusätzliche B7-H1-Blockierung zum noch stärkeren immunogenen *Priming* der naiven CD8⁺ T-Zellen.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunmodulatorischen Fähigkeiten von inflammatorisch

aktivierten LSEC untersucht. Die *in-vitro*-Endothelaktivierung erfolgte durch Einsatz von zellulären und humoralen Mediatoren, die maßgebend für die Entwicklung einer Hepatitis sind (Nishimura und Ohta 1999; Sass et al., 2002; Tiegs 2007). Dadurch konnten charakteristische Phänotypänderungen in LSEC induziert werden, die *in vivo* nachgewiesen worden sind und für eine Aktivierung im Sinne einer Hepatitis sprechen (Lalor und Adams 1999; Ali et al., 2006; Oikawa et al., 2007). Aktivierte LSEC induzierten in naiven CD4⁺ T-Zellen durch antigenspezifisches *Priming* einen tolerogenen und nicht immunogenen Phänotyp. Diese CD4⁺ T-Zellen wiesen niedrigere Aktivitätsniveaus als nach Antigenpräsentation durch ruhende LSEC. Somit scheint die LSEC-induzierte CD4⁺ T-Zell-Toleranz auch in der inflammatorischen Situation erhalten zu bleiben. Auf der anderen Seite wurden naive CD8⁺ T-Zellen durch aktivierte LSEC immunogen *geprimt* und zeigten eine stärkere Proliferation und erhöhte IFN- γ -Expression, was für die Aufhebung der LSEC-induzierten Toleranz spricht. Ferner war die Toleranzinduktion in naiven CD4⁺ T-Zellen unabhängig von der PD-1/B7-H1-Interaktion. Dieser Mechanismus beeinflusste aber im Einklang mit früheren Erkenntnissen die Toleranzinduktion in naiven CD8⁺ T-Zellen (Diehl et al., 2008).

In weiterführenden *in-vivo*-Experimenten wären in erster Linie die phänotypische Stabilität und die funktionelle Bedeutung für das Immunsystem der durch aktivierte LSEC *geprimten* CD4⁺ T-Zellen zu analysieren. Besonders interessant wäre die Auswirkung dieser tolerogenen CD4⁺ T-Zellen auf eine T-Zell-vermittelte Leberinflammation. Hierzu könnte ein OVA-spezifisches Modell für AIH mit Einsatz von Transferrin-Ovalbumin-(TF-OVA)-Mäusen benutzt werden. Bei TF-OVA-Mäusen wird Ovalbumin konstitutiv als membranständiges Protein durch Hepatozyten exprimiert und ein adoptiver Transfer OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen löst eine lokale hepatische Inflammation mit Anstieg der Alanin-Aminotransferase-Werte aus (Derkow et al., 2007). Hier wäre zu analysieren, ob in einer inflammatorischen Situation durch LSEC *geprimte* naive CD4⁺ T-Zellen in der Lage sind, die Leberschädigung zu supprimieren.

Es bleibt auch zu prüfen, wie sich eine spezifische Antigenpräsentation an naiven CD4⁺ T-Zellen durch LSEC *in vivo* im Rahmen eines Hepatitismodells auswirkt. Ein wichtiger Ansatzpunkt wäre die Verwendung von Knochenmarkschimären der Maus, die das MHC-II-Molekül intrahepatisch nur durch LSEC und nicht durch andere APC exprimieren. Dazu müssten WT-Mäuse als Rezipienten letal bestrahlt und mit Knochenmark von MHC-II^{-/-}-Mäusen rekonstituiert werden. Somit würden nur nicht-hämatopoetische Zellen MHC-II exprimieren und Effekte von professionellen APC auf T-Zellen wären weitgehend ausgeschlossen (Kruse et al., 2009). Eine Generierung von MHC-II^{-/-} \rightarrow TF-OVA-Chimären mittels Irradiation von TF-OVA-Mäusen mit anschließender Knochenmarktransplantation aus MHC-II^{-/-}-Mäusen würde sogar eine auf die

Leber begrenzte OVA-Expression und gleichzeitig eine MHC-II-Expression nur durch nicht-hämatopoetische Leberzellen wie LSEC sicherstellen. Die OVA-Aufnahme durch LSEC wäre über Vorgänge wie Protein-*Shedding* und Apoptose von OVA-exprimierenden Hepatozyten gewährleistet. Alternativ könnte MHC-II^{-/-} → WT-Chimären oral OVA verabreicht werden, das mit dem Blut vom Darm über die *Vena portae* zuerst in die Leber gelangt und durch LSEC den zirkulierenden T-Zellen präsentiert wird.

Schließlich sollte eine *in-vitro*-Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC an Th1-Zellen unter zwei verschiedenen Aspekten untersucht werden. Einerseits wäre die Phänotypisierung dieser unter inflammatorischen Bedingungen LSEC-restimulierten Effektorzellen wichtig, da eine Suppression der Zytokinsekretion durch ruhende LSEC schon beschrieben wurde (Carambia et al., 2013). Andererseits sollte die Rolle des PD-1/B7-H1-Mechanismus in der mutmaßlichen Th1-Tolerisierung durch aktivierte LSEC analysiert werden. Der Nachweis einer B7-H1-vermittelten Th1-Tolerisierung durch LSEC in der inflammatorischen Situation würde die Unterschiede in der Empfindlichkeit von naiven und ausdifferenzierten CD4⁺ T-Zellen gegenüber äußeren Stimuli bestätigen.

Die Mechanismen der Toleranzerhaltung in CD4⁺ T-Zellen und Toleranzbrechung in CD8⁺ T-Zellen nach Antigenpräsentation durch inflammatorisch aktiviertes Lebersinusendothel sind weiter aufzuklären. Die vorliegenden Ergebnisse liefern einen Erklärungsansatz für die chronische und oft asymptomatische Form der Leberentzündung bei persistierenden Virushepatitiden. Hier kann eine anhaltende Zellschädigung durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen zur Leberzirrhose führen, aber eine adäquate T-Zell-Antwort mit Pathogeneliminierung bleibt aus (Maini et al., 2000).

6 Literaturverzeichnis

Ali S, Friedman SL, Mann DA, ebrary Inc. Cross Talk of Hepatocytes and Nonparenchymal Liver Cells in Physiology and Pathology. In: Liver diseases biochemical mechanisms and new therapeutic insights. Enfield, New Hampshire, United States: Science Publishers, 2006.

Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 2006;126:32-41.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006;439:682-687.

Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 1998;76:34-40.

Batten P, Yacoub MH, Rose ML. Effect of human cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1 beta, IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. *Immunology* 1996;87:127-133.

Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 1977;72:441-455.

Callery MP, Kamei T, Flye MW. The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding. *J Surg Res* 1989;46:391-394.

Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969;223:472-476.

Camacho SA, Heath WR, Carbone FR, Sarvetnick N, LeBon A, Karlsson L, Peterson PA, Webb SR. A key role for ICAM-1 in generating effector cells mediating inflammatory responses. *Nat Immunol* 2001;2:523-529.

Cantor HM, Dumont AE. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* 1967;215:744-745.

Carambia A, Frenzel C, Bruns OT, Schwinge D, Reimer R, Hohenberg H, Huber S, Tiegs G, Schramm C, Lohse AW, Herkel J. Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2013;58:112-118.

Catravas JD, Callow A, Ryan U. *Vascular endothelium: mechanisms of cell signaling*. Amsterdam, Holland: IOS Press, 1999:41-42.

Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J, McHutchison JG, Alter HJ, Chisari FV. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;33:267-276.

Chase MW. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946;61:257-259.

Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 2004;22:683-709.

Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W, Ault KA, Gimbrone MA, Jr., Strominger JL, Pober JS. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4917-4921.

Couvelard A, Scoazec JY, Feldmann G. Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol* 1993;143:738-752.

Crispe IN. Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 2011;54:357-365.

Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000;174:47-62.

Cunningham CC, Van Horn CG. Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol Res Health* 2003;27:291-299.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30:626-635.

Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 2010;22:333-340.

Damle NK, Aruffo A. Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4⁺T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6403-6407.

De Leeuw AM, Brouwer A, Knook DL. Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age. *J Electron Microscop Tech* 1990;14:218-236.

den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8⁽⁺⁾ but not CD8⁽⁻⁾ dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000;192:1685-1696.

Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T, Wiedenmann B, Ploegh HL, Schott E. Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology* 2007;46:1155-1165.

Diehl L, Schurich A, Grochtmann R, Hegenbarth S, Chen L, Knolle PA. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8⁺ T cell tolerance. *Hepatology* 2008;47:296-305.

Dong H, Zhu G, Tamada K, Flies DB, van Deursen JM, Chen L. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8⁽⁺⁾ T lymphocytes. *Immunity* 2004;20:327-336.

Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 1988;107:321-331.

Franco A, Guidotti LG, Hobbs MV, Paschetto V, Chisari FV. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1997;159:2001-2008.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192:1027-1034.

Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:11.

Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995;21:190-198.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1996;157:798-805.

Goddard S, Youster J, Morgan E, Adams DH. Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol* 2004;164:511-519.

Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1996;156:2558-2565.

Haraldsen G, Sollid LM, Bakke O, Farstad IN, Kvale D, Molberg, Norstein J, Stang E, Brandtzaeg P. Major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by human intestinal endothelial cells. *Gastroenterology* 1998;114:649-656.

Hauser IA, Johnson DR, Madri JA. Differential induction of VCAM-1 on human iliac venous and arterial endothelial cells and its role in adhesion. *J Immunol* 1993;151:5172-5185.

Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994;76:17-27.

Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. Alcoholic liver disease: pathologic, pathogenetic and clinical aspects. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:45-66.

Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 2003;198:39-50.

John B, Crispe IN. Passive and active mechanisms trap activated CD8⁺ T cells in the liver. *J Immunol* 2004;172:5222-5229.

Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561-567.

Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* 1981;292:840-842.

Kamada N, Teramoto K, Baguerizo A, Ishikawa M, Sumimoto R, Ohkouchi Y. Cellular basis of transplantation tolerance induced by liver grafting in the rat. Extent of clonal deletion among thoracic duct lymphocytes, spleen, and lymph node cells. *Transplantation* 1988;46:165-167.

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006;203:883-895.

Kempka G, Kolb-Bachofen V. Binding, uptake, and transcytosis of ligands for mannose-specific receptors in rat liver: an electron microscopic study. *Exp Cell Res* 1988;176:38-48.

Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000;164:1346-1354.

Kirsch J. Hepatobiliäres System und Pankreas. In: Aumüller G, Aust G, Doll A, Hrsg. *Anatomie*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2010:656-681.

Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, Michalek SM. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 1982;155:605-610.

Klugewitz K, Adams DH, Emoto M, Eulenburg K, Hamann A. The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends Immunol* 2004a;25:590-594.

Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Eulenburg K, Emoto M, Hamann A. The spectrum of lymphoid subsets preferentially recruited into the liver reflects that of resident populations. *Immunol Lett* 2004b;93:159-162.

Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol* 2002;169:2407-2413.

Knolle P, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:21-34.

Knolle P, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, Lohse AW, Gerken G. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 1999a;162:1401-1407.

Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995;22:226-229.

Knolle P, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW. 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* 1999b;116:1428-1440.

Knolle P, Uhrig A, Hegenbarth S, Loser E, Schmitt E, Gerken G, Lohse AW. 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* 1998;114:427-433.

Kobayashi E, Kamada N, Enosawa S, Toyama N, Walker NI, Miyata M. Prevention by liver transplantation of the graft-versus-host reaction and allograft rejection in a rat model of small bowel transplantation. *Transplantation* 1994;57:177-181.

Komatsu S, Berg RD, Russell JM, Nimura Y, Granger DN. Enteric microflora contribute to constitutive ICAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G186-191.

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

Kühnel W. Digestive System. In: *Color atlas of cytology, histology and microscopic anatomy*. 4th ed. Stuttgart: Thieme, 2003:272-340.

Lalor PF, Adams DH. Adhesion of lymphocytes to hepatic endothelium. *Mol Pathol* 1999;52:214-219.

Lalor PF, Adams DH. The liver: a model of organ-specific lymphocyte recruitment. *Expert Rev Mol Med* 2002;4:1-16.

Le Couteur DG, Warren A, Cogger VC, Smedsrod B, Sorensen KK, De Cabo R, Fraser R, McCuskey RS. Old age and the hepatic sinusoid. *Anat Rec (Hoboken)* 2008;291:672-683.

Lee YS, Jeong WI. Retinoic acids and hepatic stellate cells in liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27 Suppl 2:75-79.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-258.

Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:880-885.

Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001;49 Suppl 1:S7-11.

Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000;6:1348-1354.

Limmer A, Ohl J, Wingender G, Berg M, Jungerkes F, Schumak B, Djandji D, Scholz K, Klevenz A, Hegenbarth S, Momburg F, Hammerling GJ, Arnold B, Knolle PA. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2005;35:2970-2981.

Lippert H. *Lehrbuch Anatomie*. München, Elsevier. 2011.

Lohse AW, Knolle PA, Biló K, Uhrig A, Waldmann C, Ibe M, Schmitt E, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde KH. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 1996;110:1175-1181.

Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart [u.a.], Thieme. 2009.

Ma W, Pober JS. Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1998;161:2158-2167.

MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 1995;269:G692-698.

Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280.

Male D, Pryce G. Kinetics of MHC gene expression and mRNA synthesis in brain endothelium. *Immunology* 1988;63:37-42.

Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992;6:2591-2599.

McCuskey RS, Reilly FD. Hepatic microvasculature: dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis* 1993;13:1-12.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295-298.

Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 1999;163:3202-3210.

Mori T, Okanou T, Sawa Y, Hori N, Ohta M, Kagawa K. Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:891-897.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.

Muro H, Shirasawa H, Maeda M, Nakamura S. Fc receptors of liver sinusoidal endothelium in normal rats and humans. A histologic study with soluble immune complexes. *Gastroenterology* 1987;93:1078-1085.

Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M. *Janeway Immunologie*. Heidelberg, Spektrum Akad. Verl. 2009:

Murray AG, Khodadoust MM, Pober JS, Bothwell AL. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* 1994;1:57-63.

Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:16-28.

Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996;24:759-765.

Neumann J. *Immunbiologie : eine Einführung*. Berlin [u.a.], Springer. 2008

Nishimura T, Ohta A. A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J Immunol* 1999;162:6503-6509.

Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK, Yu XZ, Dong C. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J* 2006;25:2623-2633.

Ogawa H. Scanning electron microscopy of rat liver hyperplastic nodules induced by diethylnitrosamine. *Scan Electron Microsc* 1982: pp. 1793-1798.

Oikawa T, Takahashi H, Ishikawa T, Hokari A, Otsuki N, Azuma M, Zeniya M, Tajiri H. Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease. *Pathol Int* 2007;57:485-492.

Parker GA, Picut CA. Immune functioning in non lymphoid organs: the liver. *Toxicol Pathol* 2012;40:237-247.

Perez VL, Henault L, Lichtman AH. Endothelial antigen presentation: stimulation of previously activated but not naive TCR-transgenic mouse T cells. *Cell Immunol* 1998;189:31-40.

Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 1991;12:349-352.

Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 1988;46:754-761.

Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43:54-62.

Reimann J, Kaufmann SH. Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr Opin Immunol* 1997;9:462-469.

Rieder H, Ramadori G, Allmann KH, Meyer zum Buschenfelde KH. Prostanoid release of cultured liver sinusoidal endothelial cells in response to endotoxin and tumor necrosis factor. Comparison with umbilical vein endothelial cells. *J Hepatol* 1990;11:359-366.

Robertson JM, Jensen PE, Evavold BD. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* 2000;164:4706-4712.

Romagnani S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res* 1991;21:152-158.

Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:9-18

Rose ML. Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:965-978.

Rubinstein D, Roska AK, Lipsky PE. Liver sinusoidal lining cells express class II major histocompatibility antigens but are poor stimulators of fresh allogeneic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;137:1803-1810.

Sakamoto S, Okanoue T, Itoh Y, Sakamoto K, Nishioji K, Nakagawa Y, Yoshida N, Yoshikawa T, Kashima K. Intercellular adhesion molecule-1 and CD18 are involved in neutrophil adhesion and its cytotoxicity to cultured sinusoidal endothelial cells in rats. *Hepatology* 1997;26:658-663.

Sass G, Heinlein S, Agli A, Bang R, Schumann J, Tiegs G. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* 2002;19:115-120.

Sato K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Yamagiwa S, Watanabe H, Asakura H, Abo T. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J Exp Med* 1995;182:759-767.

Schrage A, Loddenkemper C, Erben U, Lauer U, Hausdorf G, Jungblut PR, Johnson J, Knolle PA, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K. Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochem Cell Biol* 2008;129:441-451.

Schurich A, Berg M, Stabenow D, Bottcher J, Kern M, Schild HJ, Kurts C, Schuette V, Burgdorf S, Diehl L, Limmer A, Knolle PA. Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 2010;184:4107-4114.

Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag. 2011:15-21.

Seternes T, Sorensen K, Smedsrod B. Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7594-7597.

Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 2008;8:788-801.

Smedsrod B. Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol* 2004;3 Suppl 1:S22.

Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:591-619.

Stang E, Kindberg GM, Berg T, Roos N. Endocytosis mediated by the mannose receptor in liver endothelial cells. An immunocytochemical study. *Eur J Cell Biol* 1990;52:67-76.

Steinhoff G, Brandt M. Adhesion molecules in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 1996;43:1117-1123.

Sugahara S, Shimizu T, Yoshida Y, Aiba T, Yamagiwa S, Asakura H, Abo T. Extrathymic derivation of gut lymphocytes in parabiotic mice. *Immunology* 1999;96:57-65.

Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Bluthmann H, von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 1988;335:229-233.

Tiegs G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. *Z Gastroenterol* 2007;45:63-70.

Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2005;23:975-1028.

Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 1990;144:4579-4586.

von Oppen N, Schurich A, Hegenbarth S, Stabenow D, Tolba R, Weiskirchen R, Geerts A, Kolanus W, Knolle P, Diehl L. Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology* 2009;49:1664-1672.

Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2006;44:1182-1190.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-688.

Wedgwood JF, Hatam L, Bonagura VR. Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor on the expression of class I and class II major histocompatibility molecules by cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cell Immunol* 1988;111:1-9.

Winnock M, Barcina MG, Lukomska B, Bioulac-Sage P, Balabaud C. Liver-associated lymphocytes: role in tumor defense. *Semin Liver Dis* 1993;13:81-92.

Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* 1970;31:125-150.

Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbe E, Vermoesen A. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol* 1996;24:100-111.

Wu HY, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Res* 2003;28:265-284.

Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4.

Yang R, Liu Q, Grosfeld JL, Pescovitz MD. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg* 1994;29:1145-1148.

Zinkernagel RM. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. *Biosci Rep* 1997;17:91-111.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Enver Tahir, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Inflammatorisch aktivierte Lebersinusendothelzellen induzieren einen tolerogenen Phänotyp in naiven CD4⁺ T-Zellen unabhängig von B7-H1“, 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 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 der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationen

Tahir E, Karul M, Yamamura J. Persistierende linke Vena cava superior mit Einmündung in die linke obere Lungenvene: Bildgebung und klinische Implikationen. *Rofa* 2014; [Epub ahead of print].

Vortrag

22nd European Students' Conference, Berlin, 2011. Activated liver sinusoidal endothelial cells induce a tolerogenic phenotype in naïve CD4⁺ T-Zellen independent of B7-H1 interaction.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau PD Dr. Katja Klugewitz für das interessante Dissertationsthema und die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Des Weiteren bedanke ich mich für die wertvolle Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation. Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Martin Zeitz für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in der Forschungsabteilung der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin anfertigen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Nils Kruse, der mir mit seiner ständigen Hilfsbereitschaft während der Laborexperimente und danach zur Seite stand. Die zahlreichen Diskussionen bei der Erstellung dieser Arbeit und sein großes wissenschaftliches Fachwissen weiß ich sehr zu schätzen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Katrin Neumann, Frau Dr. Anna-Christine Flach, Marlies Breu und Christina Rudolph für die gute Zusammenarbeit in AG-Klugewitz. Außerdem danke ich Frau Dr. Ulrike Erben, Dr. Rainer Glauben, Dr. Arvind Batra und allen anderen Mitarbeitern der Labore des Karl-Landsteiner-Hauses für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Ein herzliches Dankeschön an meine Eltern Remzia und Güner Tahir sowie meiner Schwester Eliz Tahir, die mir die Promotion und das Studium ermöglicht und mich all die Jahre unterstützt haben. Auch bei meiner Kusine Aylin Sherif möchte ich mich für die vielen Stunden Korrekturlesen bedanken.

Des Weiteren danke ich meiner Freundin Hristina Ivanova, die ständig sehr großes Interesse an meiner Arbeit zeigte und mich in hohem Maße unterstützte.