

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

DISSERTATION

Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch Lebersinusendothel

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Wechsung

aus Eisenach

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Bestandteile des Immunsystems	1
1.2. Immunreaktionen in der Leber	1
1.2.1. Vaskuläre Strukturen der Leber	2
1.2.2. Das Lebersinusendothel	2
1.2.3. Immunkompetente Zellen der Leber	3
1.3. Transmigration und Multi-Step-Modell	4
1.3.1. Besonderheiten der Transmigration in den Lebersinusoiden	5
1.4. Chemokine – Regulation und Funktion in der hepatischen Entzündungsreaktion	6
1.4.1. Klassifikation von Chemokinen	6
1.4.2. Chemokine bei der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber	6
1.4.3. Interaktion von Chemokin und Endothel	7
1.5. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung	8
2. Methodik	9
2.1. Versuchstiere	9
2.2. Reagenzien	9
2.3. Geräte und Materialien	11
2.4. Antikörper und Fluorochrome	11
2.5. Medien und Puffer	12
2.6. Methoden	13
2.6.1. Aufreinigung von Zellen mittels Magnet-aktivierter Zellsortierung und Panning	13
2.6.2. Durchflusszytometrie	13
2.6.3. Isolation von Lebersinusendothelzellen	14
2.6.4. Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen	16
2.6.5. Transmigrationsassay	17
2.6.6. AcLDL-Assay	21
2.6.7. Apoptose-Assay	22
2.6.8. Berechnung und Statistik	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Morphologie und Endozytosefähigkeit kultivierter LSEC	23
3.2. Konzentrationsabhängigkeit der CXCL12-vermittelten CD4 ⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer	24
3.3. Transmigration über den LSEC-Monolayer nach Chemokin-Vorinkubation	25
3.4. Inhibition intrazellulärer Transportwege in LSEC und Auswirkung auf die CD4 ⁺ T-Zell-Transmigration	28
3.5. Rolle von Chemokinrezeptoren in LSEC bei der CD4 ⁺ T-Zell Transmigration	34
3.5.1. CXCR4	34
3.5.2. CXCR3	35
3.6. Rolle von Glykosaminoglykanen bei der CD4 ⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC	37

4.	Diskussion	40
4.1.	Modulation der Chemokinwirkung durch LSEC.....	40
4.2.	Chemokintransport in Vesikeln	41
4.3.	Chemokintransport mittels Rezeptoren	43
4.4.	Chemokinimmobilisierung mittels Glykosaminoglykanen	45
4.5.	Das Modell der Chemokintranszytose in LSEC	46
4.6.	Ausblick auf therapeutische Eingriffsmöglichkeiten	49
	Literaturverzeichnis	51
	Eidesstattliche Versicherung	57
	Lebenslauf	58
	Publikationen	59
	Danksagung	60

Abstrakt

Bei Immunreaktionen in der Leber ist die Entstehung und Verteilung von T-Zell-Infiltraten entscheidend. Ein Großteil der T-Zellen gelangt chemokinabhängig über das Endothel der Lebersinusoiden in das Leberparenchym. Über die Mechanismen, die die Entstehung und Verfügbarkeit von Chemokingradienten über das Lebersinus endothel kontrollieren, ist wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Lebersinus endothelzellen (LSEC) durch die Interaktion mit Chemokinen die T-Zell-Transmigration modulieren. Im Transwell-Assay *in vitro* wurde die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen über LSEC-Monolayer nach basaler Inkubation des Endothels mit den Chemokinen CXCL9, CXCL10 und CXCL12 gemessen.

Es zeigte sich, dass LSEC die Chemokine aufnehmen und anschließend für CD4⁺ T-Zellen gezielt bereitstellen können. Die chemotaktische Wirkung von CXCL12 und CXCL9 wurde durch diese Interaktion verstärkt. Hierbei erfolgte eine Internalisierung von CXCL12 mittels des CXCR4-Rezeptors, der Transport in Clathrin-Vesikeln und die anschließende Immobilisation auf der Endothelzelloberfläche mittels der Glykosaminoglykane Heparansulfat und Chondroitinsulfat. Bei CXCL9 war der Clathrin-Vesikel abhängige Transport und die apikale Präsentation an Glykosaminoglykanen Teil der Chemokintranszytose. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zum Verständnis der Endothel-Chemokin Interaktion in den Lebersinusoiden bei. Dies könnte zur Entwicklung von therapeutischen Strategien in entzündlichen Lebererkrankungen beitragen.

Abstract

The recruitment of T-lymphocytes is central in the immune surveillance and immune defense of the liver. The extravasation of T-cells mainly occurs in the liver sinusoids and is regulated by chemokines and their receptors on the lymphocyte and endothelial cell surface. Little is known about the mechanisms that influence the chemokine availability on the sinusoidal endothelium.

This study investigated how the interaction of liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) with chemokines differentially influences the transmigration of T cells. The CXCL9, CXCL10 and CXCL12 driven transmigration of CD4⁺ T cells across the LSEC monolayer was analyzed in transwell assays in vitro.

The results showed that LSEC can take up chemokines and make them available for CD4⁺ T cells on the endothelial cell surface, thereby enhancing the chemotactic activity of CXCL9 and CXCL12. CXCL12 was internalized in clathrin vesicles, transported via the CXCR4 receptor and presented by the glycosaminoglycans heparane sulfate and chondroitine sulfate. The internalization of CXCL9 was mediated by clathrin vesicles and chemokine presentation occurred via glycosaminoglycans. The results of this study enhance the understanding of chemokine-endothelial interactions in the liver sinusoids which might contribute to the development of new therapeutic strategies in hepatic inflammation.

Abkürzungsverzeichnis

AcLDL	Acetyliertes Low-Density-Lipoprotein
AFC	7 - Amino - 4 - Trifluoromethylcoumarin
Bref A	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin V
Cho	Chondroitinase ABC
CPZ	Chlorpromazin
cRPMI	Komplett- RPMI
Cyt B	Cytochalasin B
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	Foreward light scatter
GAG	Glykosaminoglykane
Hep	Heparinase I
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer-Lösung
HEV	High endothelial venules
(ICAM)-1	Intercellular cell adhesion molecule
(LFA)-1	Lymphocyte function associated antigen
LSEC	Lebersinusendothelzellen
MACS	Magnetic cell sorting
Mon	Monensin
MSR-A	Macrophage scavenger receptor
MW	Mittelwert
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NPC	Nicht parenchymatische Zellen
Nyst	Nystatin
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propodiumjodid
PRP	Pattern recognition receptors
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
rpm	Round per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SSC	Sideward light scatter
St	Staurosporin
(Th)-Zellen	T-Helfer-Zellen
(VAP)-1	Vascular adhesion protein 1
(VCAM)-1	Vascular cell adhesion molecule
WT	Wildtypstämme

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Funktionelle Unterteilung des Leberparenchyms	3
Abb. 2:	Transmigration von T-Zellen nach dem Multi-Step-Modell	5
Abb. 3:	Analyse der LSEC am Durchflusszytometer	15
Abb. 4:	Analyse von CD4 ⁺ T-Zellen am Durchflusszytometer	17
Abb. 5:	Berechnung der Transmigrationsrate von CD4 ⁺ T-Zellen mittels Fluoresbrite™ Microsphere Zählbeads	18
Abb. 6:	Schematischer Ablauf der Inkubation des LSEC-Monolayer vor der CD4 ⁺ T-Zell Transmigration	21
Abb.7:	Morphologie und Funktionalität von <i>in vitro</i> kultivierten LSEC	23
Abb. 8:	CXCL12-abhängige Transmigration von CD4 ⁺ T-Zellen durch LSEC- Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen	25
Abb.9:	Transmigration von CD4 ⁺ T-Zellen durch LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen nach CXCL12-Vorinkubation	26
Abb.10:	Transmigration von Effektor/Memory und naiven CD4 ⁺ T-Zellen durch LSEC- Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen nach CXCL9-Vorinkubation	27
Abb.11:	Transmigration von Effektor/Memory und naiven CD4 ⁺ T-Zellen durch LSEC- Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen nach CXCL10- Vorinkubation	28
Abb.12:	Chemokinabhängige CD4 ⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer nach Vorinkubation von LSEC mit Transportinhibitoren	30
Abb.13:	Wirkung von Transportinhibitoren auf die AcLDL-FITC Aufnahme in LSEC	31
Abb.14:	Einfluss von Transportinhibitoren auf die Apoptoserate in LSEC, die Spontanmigration von CD4 ⁺ T-Zellen und die CD4 ⁺ T-Zell-Mobilität	33
Abb.15:	Einfluss von CXCR4 auf die CXCL12-abhängige CD4 ⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer	35
Abb.16:	CXCL9-vermittelte Transmigration von Effektor/Memory CD4 ⁺ T-Zellen durch CXCR3 ^{-/-} und WT LSEC-Monolayer	36
Abb.17:	Einfluss von GAG auf die chemokinabhängige Transmigration von CD4 ⁺ T- Zellen durch LSEC-Monolayer	37
Abb.18:	Wirkung von Hep, Cho und NaClO ₃ auf die Induktion von Apoptose sowie Funktionalität der LSEC und CD4 ⁺ T-Zellen	39
Abb.19	Modell der Chemokintranszytose in LSEC für die Chemokine CXCL12 und CXCL9	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	verwendete Fluorochrome	11
Tabelle 2:	Fluorochrom-gekoppelte Antikörper	12
Tabelle 3:	Antikörper für die Zellisolation mittels Panning	12

1. Einleitung

1.1 Bestandteile des Immunsystems

Die Abwehr körperfremder Substanzen wird im menschlichen Organismus durch ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und humoralen Reaktionen gewährleistet, die gemeinsam das Immunsystem bilden. Als Antigene bezeichnet man Moleküle, die vom Immunsystem erkannt werden und Immunantworten induzieren. Bei Infektionen reagiert zunächst das angeborene Immunsystem, welches eine Reihe von unspezifischen Abwehrmechanismen umfasst. Das Komplementsystem ist eine festgelegte Reaktionskaskade von Plasmaproteinen, die an Pathogene binden und diese lysieren oder für Immunzellen kenntlich machen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Antigene über konservierte Rezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRP). Zu ihnen gehören Makrophagen (gewebetypische Fresszellen), welche Erreger phagozytieren. Persistiert der Erreger, senden Makrophagen Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine aus, die weitere proinflammatorische Zellen (Mastzellen, Granulozyten) aktivieren und eine Entzündungsreaktion in Gang setzen. Dendritische Zellen (DC) nehmen im Gewebe ständig Antigene aus der Umgebung auf. Erkennt eine DC über ihre PRP einen Erreger, wandert sie in die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz, Tonsillen) und präsentiert die Antigene auf der Zelloberfläche an die Zellen der adaptiven Immunantwort. Die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Zellen. Sie werden als naiv bezeichnet, wenn sie noch keinen Antigenkontakt hatten. Durch Antigenpräsentation aktivieren DC naive B- und T-Zellen und induzieren die Differenzierung in Effektorzellen. B-Zellen differenzieren zu Antikörper-sezierenden Plasmazellen. Naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren zu T-Helfer (Th)-Zellen, die B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren und andere Immunzellen in ihrer Funktion fördern. Naive CD8⁺ T-Zellen hingegen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die darauf spezialisiert sind, Zielzellen zu zerstören. Die Effektor T-Zellen sind in der Lage, in bestimmte entzündete Gewebe einzuwandern. Memory T-Zellen überdauern die rasche Immunantwort und patrouillieren Gewebe und lymphatische Organe für den Fall einer wiederholten Exposition mit dem spezifischen Antigen [1]. Das adaptive Immunsystem bildet somit das immunologische Gedächtnis.

1.2. Immunreaktionen in der Leber

Die Leber hat zentrale Aufgaben im Immunsystem und Stoffwechsel des menschlichen Organismus. In den Leberparenchymzellen (Hepatozyten) finden die Hauptreaktionen des

Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsels statt. Dazu gehört die Synthese hämatogener Transport- und Gerinnungsproteine. Auch die Synthese der Proteine des Komplementsystems findet hier statt. Durch komplexe Immunreaktionen wird in der Leber die orale Toleranz induziert: Nahrungsmittelantigene, die aus dem Magen-Darm-Trakt in die Leber gelangen, werden als ungefährlich erkannt und toleriert [2]. Andererseits werden Toxine oder Pathogene als gefährlich erkannt und über den gezielten Abbau bzw. induzierte Immunantworten vernichtet. Um diese Aufgaben zu erfüllen, verfügt die Leber über eine histologische Struktur und Zusammensetzung von immunkompetenten Zellen, die sie von anderen Organen maßgeblich unterscheidet.

1.2.1. Vaskuläre Strukturen der Leber

Die vaskuläre Struktur der Leber erlaubt es residenten Leberzellen mit Lymphozyten aus dem Blut zu interagieren. Die Vena portae führt Blut und damit aufgenommene Nahrungsmittel oder Pathogene aus dem Magen-Darm-Trakt in die Leber. Zusätzlich gibt es einen Zustrom aus dem systemischen Kreislauf über die Arteria hepatica. Beide Gefäße treten am Leberhilus in die Leber ein und verzweigen sich im Leberparenchym. Ihre Endäste verlaufen gemeinsam mit einem Gallengang als Gefäß-Trias und bilden mit den umgebenden Hepatozyten das Portalfeld (Abb. 1). Das Blut beider Gefäße mischt sich in den kapillären Lebersinusoiden, die nur noch durch schmale Hepatozytenbalken voneinander getrennt sind. Hier finden sich Lebersinusendothelzellen (LSEC), welche das Lumen der Lebersinusoiden auskleiden und leberspezifische Makrophagen (Kupffer-Zellen). Im Disse-Raum, welcher LSEC und Hepatozyten trennt, befinden sich hepatische Sternzellen (auch Ito-Zellen genannt). Diese dienen als Lipid- und Vitamin A-Speicher und sind als Fibroblasten bei der Entstehung von Leberfibrose beteiligt. Aus den Lebersinusoiden wird das Blut über Zentralvenen wieder dem systemischen Kreislauf zugeführt.

1.2.2. Das Lebersinusendothel

LSEC machen nach den Hepatozyten die zweitgrößte Zellpopulation der Leber aus [3]. Das Lebersinusendothel unterscheidet sich von anderen vaskulären Endothelien: Es besitzt keine Basalmembran oder *Tight junctions* und ist fenestriert, wobei die Unterbrechungen im Durchmesser etwa 103-107 nm groß und in Siebplatten angeordnet sind [4]. Diese Anordnung erlaubt den bidirektionalen Austausch von Partikeln mit einem Durchmesser bis 10 nm. LSEC zeichnen sich durch eine hohe Endozytoserate aus. Sie exprimieren hochaktive Endozytoserezeptoren wie den Mannose-Rezeptor und Stabilin-2-Rezeptor zur

Internalisierung löslicher Makromoleküle oder kolloidaler Stoffe mit einem Durchmesser kleiner als 100 nm aus dem Blut [5, 6]. Da LSEC die Fähigkeit besitzen, aufgenommene Antigene zu prozessieren und an CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren, gehören sie zu den immunkompetenten Zellen der Leber [7].

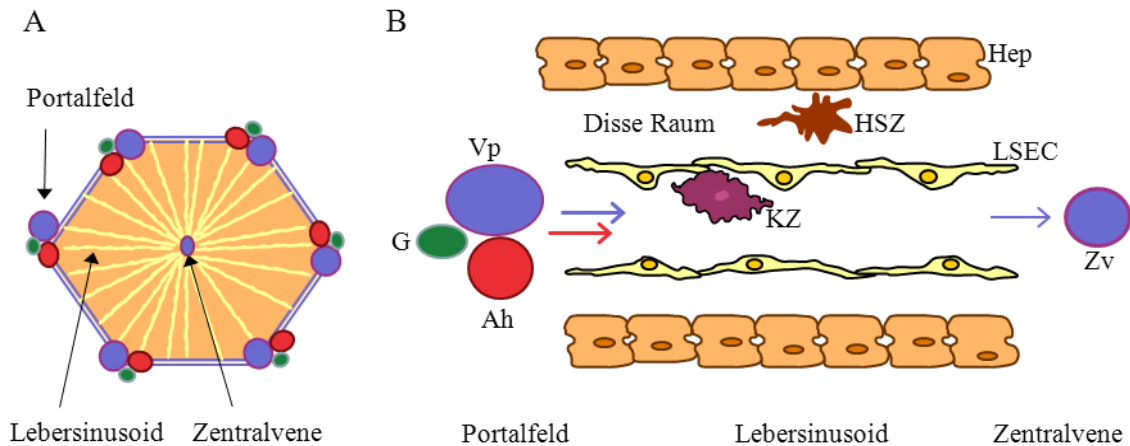


Abb. 1: Funktionelle Unterteilung des Leberparenchyms. (A) Jeweils sechs Portalfelder begrenzen ein Leberläppchen in dessen Zentrum die Zentralvene (Zv) verläuft. (B) In den Sinusoiden fließt das Blut aus der Vena portae (Vp) und der Arteria hepatica (Ah) zusammen. Zuvor verlaufen die Endäste der Gefäße mit einem Gallengang (G) im Portalfeld. LSEC kleiden die Sinusoide aus, in deren Lumen Kupfer-Zellen (KZ) zu finden sind. Der Disse-Raum trennt LSEC von Hepatozyten (Hep) und enthält die fettspeichernden hepatischen Sternzellen (HSZ). Modifiziert nach [2].

1.2.3. Immunkompetente Zellen der Leber

Als Zellen des angeborenen Immunsystems erfüllen Kupffer-Zellen sowie LSEC im Wesentlichen die Filterfunktion der Leber, indem sie Endotoxine, Zelltrümmer und Mikroorganismen aus dem Blut entfernen. DC der Leber finden sich vor allem in der periportalen Region und um die Zentralvenen. Sie besitzen einen unreifen Phänotyp und induzieren durch Antigenpräsentation an B- und T-Zellen Effektorzellen, die mit tolerogenen Wirkungen assoziiert sind [8]. Weiterhin verfügt die Leber über eine ungewöhnlich große Population von Zellen der angeborenen Immunität, die der Abwehr intrazellulärer Pathogene dienen. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen), die etwa 30% der intrahepatischen Lymphozyten ausmachen, erkennen infizierte Zellen direkt und zerstören sie [9]. Von den Zellen des adaptiven Immunsystems stellen T-Zellen ungefähr 25% aller intrahepatischen Lymphozyten, während B-Zellen nur etwa 5% ausmachen. Die spezifische Lymphozytenzusammensetzung entsteht einerseits durch gezielte Rekrutierung und andererseits durch Proliferation und Entwicklung zu Effektorzellen in der Leber selbst. Kupffer-Zellen, LSEC, hepatische Sternzellen und Hepatozyten sind durch Antigenpräsentation und Sekretion von Zytokinen fähig, die Aktivierung und Differenzierung

von naiven, zirkulierenden T-Zellen zu Effektor T-Zell-Populationen zu steuern, wobei in der Leber primär ein tolerogener, anti-inflammatorischer Phänotyp induziert wird [7, 10, 11, 12, 13, 14].

1.3. Transmigration und Multi-Step-Modell

Die Rezirkulation von T-Zellen zwischen Blut und Gewebe ist eine Voraussetzung für die Immunüberwachung und gezielte Immunantwort. Nach der Selektion im Thymus, bei der Autoantigen-erkennende naive T-Zellen den programmierten Zelltod durchlaufen, gelangen naive T-Zellen ins Blut. Sie rezirkulieren durch die sekundären lymphatischen Organe, bis sie dort ihr Antigen auf antigenpräsentierenden Zellen erkennen und aktiviert werden [15]. Die Einwanderung ins Gewebe erfolgt in Gefäßen mit spezialisiertem Endothel - den *High endothelial venules* (HEV). Nach der Differenzierung zu Effektor T-Zellen verlassen sie die sekundären lymphatischen Organe und migrieren in die peripheren Organe auf der Suche nach ihrem Antigen. Die Einwanderung in periphere Organe erfolgt (außer in Lunge und Leber) durch postkapilläre Venolen. Die Direktion der T-Zellen an ihre jeweiligen Zielorte wird durch die Expression von Signalmolekülen (Integrinen, Selektinen, Chemokinrezeptoren) sowie deren Liganden auf T-Zellen und Endothelzellen gesteuert. Chemokine (chemotaktische Zytokine) werden zudem von den Zellen der Zielorgane sekretiert und bewirken über Chemokinrezeptoren die Pseudopodienbildung und damit die gerichtete Fortbewegung der T-Zelle [16].

Der Prozess, bei dem T-Zellen im Blutstrom durch Interaktion mit den genannten Signalmolekülen verlangsamt werden und schließlich das Endothel der Gefäße passieren, wird als transendotheliale Migration (Transmigration) nach dem Multi-Step-Modell beschrieben [17, 18]. Das Multi-Step-Modell umfasst vier Einzelschritte und ist in Abb. 2 verdeutlicht. T-Zellen kommen im Blutstrom mit den Endothelzellen in Kontakt, woraufhin Selektine und ihre spezifischen Selektinliganden die Verlangsamung der T-Zellen und das lose Anbinden an das Endothel (*Rolling*) vermitteln. Die T-Zellen können nun direkt mit den Endothelzellen interagieren. Auf den Endothelzellen immobilisierte Chemokine binden an Chemokinrezeptoren der T-Zellen, was durch intrazelluläre Signalkaskaden zur Aktivierung von T-Zell-Integrinen und Erhöhung der Integrinaffinität führt. Die Integrine können daraufhin an Adhäsionsmoleküle auf der Endotheloberfläche binden. Dies führt zur festen Adhäsion der T-Zelle an das Endothel. Anschließend erfolgt die Diapedese der T-Zelle transzellulär durch die Endothelzelle oder parazellulär zwischen zwei angrenzenden Endothelzellen.

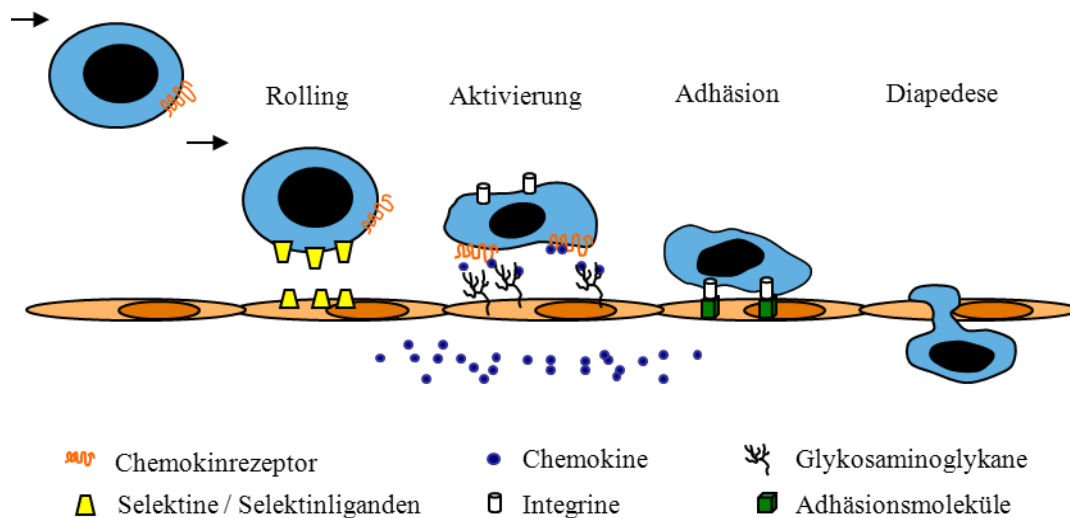


Abb. 2: Transmigration von T-Zellen nach dem Multi-Step-Modell. Das Multi-Step-Modell der Transmigration umfasst die Schritte *Rolling*, Aktivierung, feste Adhäsion und Diapedese. Nachdem T-Zellen mit dem Endothel in Kontakt gekommen sind, bewirken Selektine und Selektinliganden das *Rolling* der Leukozyten. Durch auf der Endothelzelloberfläche immobilisierte Chemokine werden Leukozyten aktiviert und adhären durch Integrine fest an das Endothel. Es folgt die Diapedese. Modifiziert nach [18].

1.3.1. Besonderheiten der Transmigration in den Lebersinusoiden

In der Leber ist die T-Zell-Transmigration im Portalfeld, den Lebersinusoiden und den Zentralvenen möglich. Über 80% der Leukozytenextravasation findet jedoch in den Lebersinusoiden statt [19]. Hier ist der Blutfluss langsam und der Durchmesser der Gefäße so gering, dass Leukozyten ständig mit den LSEC interagieren. Die Transmigration von Leukozyten über das Lebersinus endothel erfolgt selektinunabhängig ohne den Schritt des *Rolling* [20]. Die Transmigration wird hier durch die chemokinabhängige Aktivierung der Leukozyten induziert. LSEC exprimieren konstitutiv die Adhäsionsmoleküle *Vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 und *Intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, die sonst auf postkapillären Venolen vorkommen (ICAM-1) oder in peripheren Geweben durch inflammatorische Signale induziert werden (VCAM-1) [21, 22]. Zudem spielen *Vascular adhesion protein* (VAP)-1 und CD44 auf LSEC eine Rolle [23, 24]. Selektine werden auf LSEC nicht exprimiert [25]. Entsprechende Signalmoleküle auf Leukozyten sind α 4-Integrin, CD44 und *Lymphocyte function associated antigen* (LFA)-1 [24].

1.4. Chemokine – Regulation und Funktion in der hepatischen Entzündungsreaktion

1.4.1. Klassifikation von Chemokinen

Chemokine werden nach der Abfolge ihrer endständigen konservierten Aminosäuren in die vier Familien CXC-, CC-, CX3C- und XC- Chemokine unterschieden, wobei C für Cystein und X für eine variable Aminosäure steht. Nach ihrer Funktion können sie in homöostatische und inflammatorische Chemokine unterteilt werden. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv in Geweben produziert und sorgen für die Rezirkulation von Lymphozyten bei der Immunüberwachung. Inflammatorische Chemokine werden durch Zellen im entzündeten Gewebe sezerniert und kontrollieren die Rekrutierung von Effektorzellen. Diese eindeutige Unterscheidung der Chemokinfunktion ist jedoch in den letzten Jahren mehr und mehr aufgeweicht, da inflammatorische Chemokine je nach Gewebe auch homöostatische Funktion besitzen können und umgekehrt [26]. Sowohl auf Endothelzellen als auch auf Lymphozyten wirken Chemokine über G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren, die nach der Struktur der an ihnen wirksamen Chemokine und einem darauf folgendem R durchnummeriert werden. Derzeit sind mehr als 50 Chemokine und 19 Chemokinrezeptoren bekannt [27]. Das System der Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktion ist redundant. Dies bedeutet, dass ein Rezeptor für mehrere Chemokine spezifische Signalwege vermitteln kann, aber auch ein einzelnes Chemokin an mehrere Rezeptoren binden kann. Das Chemokinsignal wird durch Rezeptordesensibilisierung und Internalisierung sowie über Signaltransduktionskaskaden gesteuert, auf die unter anderem die Chemokinkonzentration, Cytokine und der Differenzierungsgrad der migrierenden Zellen Einfluss haben [27].

1.4.2 Chemokine bei der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber

Entscheidend für den Ablauf und die Prognose von Immunreaktionen in der Leber ist die Zusammensetzung der rekrutierten T-Zell-Population. So wird der Gewebeschaden bei den Virushepatitiden A, B und C nicht durch eine Zytotoxizität der Viren sondern durch entzündliche T-Zell-Infiltrate verursacht [28]. Bei der Pathogenese von Autoimmunhepatitis spielen CD4⁺ T-Zell-Infiltrate eine entscheidende Rolle. Ein Transfer dieser Zellen in einen gesunden Organismus löst in diesem eine Hepatitis aus [29]. Je nach Ätiologie der Leberentzündung verteilen sich die rekrutierten T-Zellen an unterschiedlichen Stellen im Leberparenchym. So wird ein portales Infiltrat um den Gallengang vor allem bei primärer biliärer Zirrhose (PBC) und primär sklerosierender Cholangitis (PSC) beobachtet. Bei

Virushepatitiden hingegen entstehen Infiltrate hauptsächlich um die Sinusoide [30]. Die selektive Chemokinexpression und -sekretion im Lebergewebe trägt entscheidend zur T-Zell-Rekrutierung und -Verteilung bei. T-Zellen, die in eine chronisch entzündete Leber rekrutiert werden, zeigen eine starke Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR3, CXCR6, CCR1 und CCR5. Die entsprechenden Chemokine werden je nach Lebererkrankung in unterschiedlichen Mengen und durch verschiedene Zellen des Lebergewebes sezerniert [31]. In den Gefäßen des Portalfelds finden sich vor allem die Chemokine CCL3, 4 und 5, die an CCR5 binden. Die CXCR3-bindenden Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind vor allem in lobulären Infiltraten zu finden. CXCL9 wird schwach in portalem Endothel und stärker in LSEC exprimiert. Vor allem in entzündlichen Lebererkrankungen wie beispielsweise Hepatitis C wird die Expression von CXCL9 hoch reguliert und moduliert die Infiltration von Effektor T-Zellen [32]. In der nicht entzündeten Leber werden CXCL10 und CXCL11 selektiv durch LSEC sezerniert [30]. Durch die Gallengangsepithelien und LSEC wird CXCL12 sezerniert, welches an CXCR4 bindet und eine Funktion bei der Leberregeneration, der Entstehung von Fibrose bei PBC und der Tumorzellausbreitung in den Lebersinusoiden hat [33, 34]. CXCL12 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Kontrolle der lymphoiden Infiltrate im Portalfeld bei einer chronischen Hepatitis C Infektion [35].

1.4.3. Interaktion von Chemokin und Endothel

Leukozyten bewegen sich entlang eines löslichen Chemokingradienten (Chemotaxis) oder entlang immobilisierter Chemokine (Haptotaxis). Im Blutstrom würden lösliche Chemokine schnell fortgeschwemmt werden. Daher werden Chemokine an der Endotheloberfläche durch Glykosaminoglykane (GAG) immobilisiert [36]. GAG bilden den ubiquitären extrazellulären Bestandteil von Proteoglykanen an der Endothelzelloberfläche und werden je nach der Abfolge ihrer Untereinheiten in Hyaluronsäure-Typ, Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-Typ, Heparansulfat/Heparin-Typ und Keratansulfat-Typ unterschieden. Es handelt sich um Zuckerpolymere, die aus Disacchariduntereinheiten aufgebaut sind und aufgrund ihrer Sulfat- und Carboxygruppen eine hohe negative Ladung besitzen, welche es ermöglicht, basische Chemokine durch elektrostatische Wechselwirkungen zu binden. In der Leber machen Heparansulfatproteoglykane ca. 2/3 aller Proteoglykane aus, gefolgt von Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-tragenden Proteoglykanen [37]. Über die GAG-Synthese und –Sulfatierung können Endothelzellen die Chemokinbindung an der Endotheloberfläche gezielt verändern [36]. Eine weitere Interaktion von Chemokin und Endothel stellen die Chemokininternalisierung, der intrazelluläre Chemokintransport und die gezielte Präsentation

an der Endotheloberfläche dar. In Endothelzellen von Haut- und Lymphgefäßen konnte gezeigt werden, dass Chemokine über Endozytose aufgenommen und mittels Transzytose durch die Zellen transportiert werden (Modell der Chemokintranszytose) [38]. Moleküle und Mechanismen, die die Chemokinaufnahme und den Transport vermitteln, sind jedoch weitgehend ungeklärt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber ist essentiell für den Ablauf von hepatischen Immunreaktionen. Dabei findet die Transmigration in das Leberparenchym zum großen Teil über das Lebersinusendothel statt und wird wesentlich durch Chemokine gesteuert. Ob LSEC durch eine aktive Wechselwirkung mit Chemokinen einen gezielten Einfluss auf die T-Zell-Transmigration nehmen, ist nicht bekannt. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass LSEC im Gegensatz zu Endothelien aus Gehirn und lymphatischen Organen keine Barriere für die CD4⁺ T-Zell-Transmigration darstellen [39]. Weiterhin steigerte die Anwesenheit eines LSEC-Monolayer *in vitro* die Transmigrationsrate von CD4⁺ T-Zellen zu den Chemokinen CXCL12 und CXCL9 [39]. Eine Steigerung der Transmigration wurde jedoch nur beobachtet, wenn die Chemokine auf der basalen Seite des Endothel-Monolayer inkubiert wurden [39]. Daher wurde eine gezielte Interaktion von LSEC mit den Chemokinen vermutet, die über eine interzelluläre Diffusion von Chemokin auf die apikale Seite hinausgeht. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, über welche Mechanismen LSEC die chemokinabhängige T-Zell-Transmigration modulieren. Hierbei sollte die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen zu den Chemokinen CXCL12, CXCL9 und CXCL10 *in vitro* betrachtet werden. Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

- Modulieren LSEC die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen zu den Chemokinen CXCL9 und CXCL10?
- Welche Moleküle spielen bei der Chemokin-LSEC-Interaktion eine Rolle?
- Erfolgt die Chemokin-LSEC-Interaktionen nach dem Modell der Chemokintranszytose?

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum Verständnis der chemokinvermittelten Lymphozyteninvasion in das mikrovaskuläre System der Leber beitragen und Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention bei hepatischen Entzündungsreaktionen aufzeigen.

2. Methodik

2.1. Versuchstiere

Es wurden Wildtypstämme (WT) C57BL/6 (H-2^b) von den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (Charité Universitätsmedizin Berlin) oder von Charles River (Sulzfeld) sowie CXCR3^{-/-}-Mäuse (H-2^b) von PD Dr. Uta Höpken (Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) verwendet [40]. Die Tiere wurden artgerecht unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen entsprechend nationaler Richtlinien gehalten. Für die Organentnahme wurden die Tiere durch CO₂ und Genickbruch getötet. Eine Genehmigung der Tiertötung lag vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (Berlin) vor (Tötungsnummer: T 0183/07).

2.2. Reagenzien

Accutase™	PAA Laboratories, Cölbe
AcLDL-Bodipy® FL	Molecular Probes, Leiden NL
AMD 3100 Octahydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
β-Mercaptoethanol	GIBCO über Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Brefeldin A (Bref A)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Caspase – 3/7 Kit (Assay Puffer, 1M DTT, Caspase-3/7 Substrat)	ANA Spec, Fremont, USA
Chemokine: murines CXCL12, CXCL9, CXCL10	R&D Systems, Wiesbaden
Chlorpromazin (CPZ)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Chondroitinase ABC (Cho) aus <i>Proteus vulgaris</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Cytochalasin B (Cyt B)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM; mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin)	GIBCO über Invitrogen, Karlsruhe
Entellan®	Merck, Darmstadt
Ethanol	JT Baker, Mallinckrodt, Deventer, NL

Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert: 30 min, 56°C	Biochrom, Berlin
Filipin (Fili)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Formaldehyd (37%)	Carl Roth, Karlsruhe
Giemsa Stain Stock Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Heparinase I (Hep) aus Flavobacterium heparinum	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Hydroxyethylpiperazin- Ethansulfonsäure-Puffer-Lösung (HEPES; 1M)	Biochrom, Berlin
Histopaque®- 1083	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
L-Glutamin 200 mM	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
MicroBeads (anti-FITC)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Monensin (Mon)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumchlorat (NaClO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Biochrom, Berlin
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 10 mM)	Biochrom, Berlin
Nycodenz	Progen Biotechnik, Heidelberg
Nystatin (Nyst)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom, Berlin
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ Ionen	PAA Laboratories, Cölbe
Propidiumjodid (Pi)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Rosewell Park Memorial Institute Medium, RPMI (+ Glutamin + HEPES)	PAA Laboratories, Cölbe
RPMI (-Glutamin – Phenolrot)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Staurosporin (St)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Zählbeads (Fluoresbrite™ Microsphere)	Polysciences Incorporation, Warrington, PA, USA

2.3. Geräte und Materialien

CO ₂ -Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Deckgläser	Mensel Glas
Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmal-Spritzen und –Kanülen	B. Braun Melsungen, Melsungen
Inkubationsschüttler (TH 25)	Edmund Bühler (Tübingen)
Laminar-Flow-Werkbank (Hera Safe)	Thermo Electron Cooperation, Waltham, USA
MACS Säulen, - Magnete, -Ständer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikroskop für Migrationsassay	AxioImager Z1
Neubauer Zählkammer 0,100 mm Tiefe	Optic Labor
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Helmut Hund, Wetzlar
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Spectrofluorometer (Dual Scanning Microplate)	MTX Lab Systems
Spectra Max Gemini EM	
Transwell [®] -Einsätze für 24-Well-Platten, Porendurchmesser 5µm	Costar Corning Incorporated USA
Zellkulturplatten	Costar Corning Incorporated USA
Zellsiebe (Cellstrainer, 100 µm Poren)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge (Megafuge 2.0R)	Thermo Scientific, Schwerte

2.4 Antikörper und Fluorochrome

Tabelle 1: verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Absorptionsmaximum (λ in nm)	Emmissionsmaximum (λ in nm)
Indodicarbocyanin (Cy5)	650	670
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495	520
R-Phycoerythrin (PE)	564	575
Propidiumjodid (PI)	550	650

Tabelle 2: Fluorochrom-gekoppelte Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Herkunft
Maus CD45RB	16 A	Ratte IgG2a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CD146	ME-9F1	Ratte IgG2a	FITC	Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ), Berlin
Maus CD4	GK1.5	Ratte IgG2b	Cy5	DRFZ, Berlin

Tabelle 3: Antikörper für die Zellisolation mittels Panning

Spezifität	Klon	Isotyp	Herkunft
Maus CD11b	M1/70	Ratte IgG2b	DRFZ, Berlin
Maus CD16/32 Fcγ-Rezeptor II/III	2.4G2/75	Ratte IgG2b	DRFZ, Berlin
Ratte IgG (H+L), kreuzreaktiv zu Maus	polyklonal	Ziege IgG	Jackson Immuno Research Laboratory, West Grove, USA

2.5 Medien und Puffer

Caspase-3/7 Substrat Lösung	5ml Assay Puffer + 200µl 1M DTT + 50 µl Caspase -3/7 Substrat
Erythrozyten-Lyse-Medium	10 mM KHCO ₃ , 155 mM NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5
Fixierungslösung (PFA/PBS)	1xPBS, 2 g/l PFA, pH 7
Giemsa-Färbelösung	2,6 % Giemsa Stain Stock Solution in Aqua dest.
Komplett –DMEM (cDMEM)	DMEM, 10 % FCS, 2 % Natrium-Pyruvat, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % NEAA, 0,1 % β-Mercaptoethanol
Komplett-RPMI (cRPMI)	RPMI 1640 mit GlutaMAX-I™, 25 mM HEPES, 10 % FCS, 1 % Natrium-Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % β-Mercaptoethanol
Migrationsmedium	RPMI 1640 ohne Phenolrot + 5g/l BSA
Nycodenz (30%)	50 % Nycoprep™ Universal in Aqua dest.
PBS/BSA	1x PBS, 2 g/l BSA

Verdaumedium	RPMI 1640 mit GlutaMAX-I™, 25 mM HEPES, 5 % FCS, 0,05 % Collagenase Typ IV, 0,002 % DNase I
Waschmedium	cRPMI mit 5% FCS

2.6. Methoden

2.6.1 Aufreinigung von Zellen mittels Magnet-aktivierter Zellsortierung und Panning

Bei dem Verfahren der Magnet-aktivierten Zellsortierung (*Magnetic-activated cell sorting*, MACS) werden mit magnetischen Kügelchen (MicroBeads) gekoppelte Antikörper verwendet, um eine Zellpopulation anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle aus einem Zellgemisch zu isolieren. Die Zellsuspension wird mit den Antikörpern inkubiert, wobei diese spezifisch an die Oberflächenmoleküle der gesuchten Zellpopulation binden. Anschließend wird die Suspension auf eine ferromagnetische Säule im Magnetfeld gegeben. Die mit MicroBeads markierten Zellen werden im Magnetfeld der Säule zurückgehalten. Die Säule wird mehrfach gespült, um unmarkierte Zellen zu entfernen. Nach Entfernung des magnetischen Feldes können die MicroBeads-markierten Zellen aus der Säule eluiert werden [41].

Beim *Panning* wird die gewünschte Zellpopulation durch die schrittweise Depletion unerwünschter Zellpopulationen erhalten. Dabei werden Petrischalen mit einem Ziege-anti-Maus IgG Antikörper beschichtet (*Panningschalen*). IgG-exprimierende Zellen binden an diesen Antikörper und bleiben an der Platte haften. Auf diese Weise werden B-Zellen, welche auf ihrer Oberfläche IgG exprimieren, depletiert. Um weitere Zellpopulationen zu depletieren, wird die Zellsuspension mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle der unerwünschten Zellpopulationen inkubiert. Auch diese Antikörper-markierten Zellen blieben dann auf der Platte haften. Nicht gebundene Zellen werden abgenommen und enthalten die gewünschte Zellpopulation.

2.6.2. Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können Zellen nach ihrer Größe, Granularität und Immunfluoreszenz analysiert werden. Die Zellen werden im dünnen Flüssigkeitsstrahl an Laserstrahlen vorbeigeleitet. Das gestreute und emittierte Signal wird analysiert. Im *Foreward light scatter* (FSC, Vorwärtsstreulicht) bietet die Streuung in Richtung des einfallenden Laserstrahls einen Anhaltspunkt für die Größe der Zellen, im *Sideward light scatter* (SSC, Seitwärtsstreulicht) ist die Brechung des Lichtstrahls im 90° Winkel ein Äquivalent für die Struktur und Granularität der Zelle. Weitere Detektoren erkennen die Emission von

Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge. Die Zellen werden dafür mit fluorochromgekoppelten Antikörpern inkubiert, die gegen spezifische Oberflächenmoleküle der Zellen gerichtet sind. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden vor Verwendung austitriert und in optimalen Konzentrationen verwendet. Das verwendete Durchflusszytometer FACSCanto II verfügt über drei Laser zur Anregung von Fluorochromen (violett: 405 nm, blau 488 nm, rot: 633 nm) und kann simultan bis zu sechs unterschiedliche Fluoreszenzen detektieren. Für die Auswertung der Messungen am Durchflusszytometer wurde das Programm FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, USA) verwendet. Die Anzahl der gemessenen Zellen in % oder Fluoreszenzintensitäten wurden im *Dot Plot* (Zweipunktediagramm) oder Histogramm dargestellt.

2.6.3. Isolation von Lebersinusendothelzellen

LSEC wurden zur Kultivierung als Endothelzell-*Monolayer ex vivo* aus den Lebern der Versuchstiere isoliert und dann im Transmigrationsassay, AcLDL-Assay und Apoptose-Assay verwendet. Zur schrittweisen Aufreinigung wurden die Dichtegradientenzentrifugation und die Zellisolation mittels MACS verwendet. Anschließend wurde die Reinheit der LSEC im Durchflusszytometer überprüft und die Zellen kultiviert.

Die Lebern 8-10 Wochen alter Mäuse wurden freigelegt. Vor der Entnahme wurden ca. 5 ml Verdaumedium in die Pfortader injiziert, um Blut aus den Gefäßen zu spülen. Anschließend wurde die Leber entnommen, zerkleinert und im Schüttler bei 200 rpm für 15 min bei 37°C in Verdaumedium inkubiert. Das Verdaumedium bricht durch enthaltene Collagenase und DNase die Gewebestrukturen auf. Die Gewebemasse wurde mittels eines Spritzenkolbens durch ein feines Metallsieb gepresst, über ein Zellsieb (Porengröße 100 µm) gegeben, in cRPMI resuspendiert und 5 min bei 300 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Dabei setzten sich größere Gewebebestandteile am Boden des Gefäßes ab. Der Überstand wurde abgenommen und für 8 min bei 1700 rpm bei RT zentrifugiert. Um enthaltene Erythrozyten zu entfernen, wurde die Suspension für 5 min mit Erythrozyten-Lyse-Puffer bei 4°C inkubiert und die lysierten Erythrozyten nach Zentrifugation in cRPMI bei 1300 rpm abgetrennt. Die Entfernung der Hepatozyten erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Zellsuspension wurde in einer 26 %igen Nycodenzlösung (Dichte =1,136 g/l) resuspendiert, unter cRPMI geschichtet und für 20 min bei 2500 rpm ohne Bremse bei RT zentrifugiert. In der Interphase des Gradienten reicherten sich die nicht-parenchymatischen Zellen (NPC) an. Die NPC wurden entnommen und mit PBS/BSA gewaschen. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit

Trypanblau bestimmt. Trypanblau wird nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen, die sich dunkelblau verfärben und dadurch von vitalen Zellen unterschieden werden können.

Anschließend erfolgte die Aufreinigung der LSEC mittels MACS. Hier konnten LSEC durch das spezifische Oberflächenmolekül CD146 identifiziert werden [42]. Die aus NPC bestehende Zellsuspension wurde in PBS/BSA resuspendiert (1×10^8 NPC/ml) und mit anti-CD146-FITC Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und in PBS/BSA resuspendiert (2×10^8 NPC/ml) und mit anti-FITC-Microbeads für 15 min bei 4°C inkubiert. Unspezifische Bindungen des anti-CD146 Antikörpers an Fc-Rezeptoren wurden durch Zugabe von $1 \mu\text{g}$ anti-Fc γ -Rezeptor II/III Antikörper (anti-Maus CD16/CD32) auf 1×10^6 NPC verhindert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen. Die Zellsuspension wurde auf die ferromagnetische Säule gegeben. Durch dreimaliges Spülen der Säule mit PBS/BSA wurden ungebundene, CD146 $^-$ Zellen ausgewaschen. Nach Entfernung des Magnetfeldes konnten durch erneute Spülung der Säule mit PBS/BSA die MicroBeads-tragenden CD146 $^+$ LSEC isoliert werden. Anschließend wurde die Reinheit der LSEC am Durchflusszytometer überprüft.

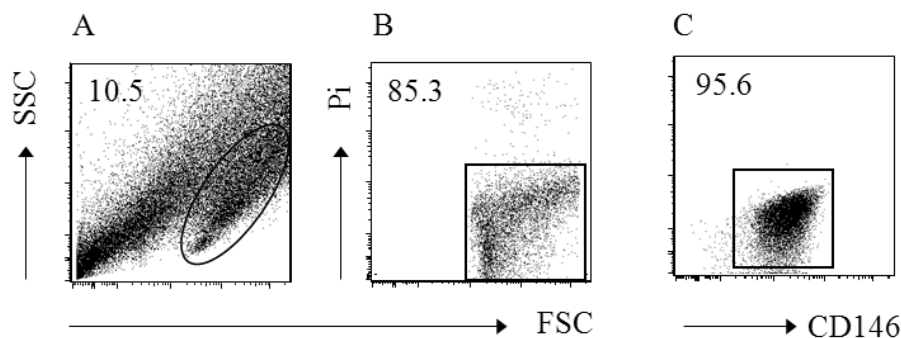


Abb. 3: Analyse der LSEC am Durchflusszytometer. LSEC wurden nach Isolation am Durchflusszytometer analysiert. (A) LSEC wurden anhand ihrer Größe und Granularität im FSC und SSC erkannt. (B) Pi-negative Zellen wurden als vital gewertet. (C) Als LSEC wurde die CD146 positive Fraktion identifiziert. Die Zahlen in den Dot Plots zeigen die Anzahl der Events in den gelegten Gates. Die Abbildung zeigt *Dot Plots* eines repräsentativen Experiments.

Die Erkennung der LSEC erfolgt über das CD146-Epitop, an das ein mit dem Fluorochrom FITC gekoppelter Antikörper gebunden war. Die Inkubation mit dem anti-CD146-FITC Antikörper war bereits vor der MACS erfolgt. Um tote Zellen im Durchflusszytometer von der lebenden Zellpopulation zu unterscheiden, wurde kurz vor der Messung $5 \mu\text{l}$ Propidiumjodid (Pi) auf $500 \mu\text{l}$ der gefärbten Zellen pipettiert. Dieses Fluorochrom durchdringt nur die porösen Zellmembranen von toten oder apoptotischen Zellen. Zellen mit hohem Pi-Signal wurden als tot erkannt. Als lebende LSEC wurden alle Zellen mit geringem Pi-Signal und hohem FITC-Signal im Durchflusszytometer identifiziert (Abb. 3).

Bei einer Reinheit der CD146⁺ Population von mindestens 90% wurden die isolierten LSEC in Komplet-DMEM (cDMEM) zur Kultivierung aufgenommen. Mit dem beschriebenen Isolationsverfahren konnten im Durchschnitt 2×10^6 Zellen aus einer Leber isoliert werden.

2.6.4. Isolation von CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen wurden *ex vivo* aus Milzen von WT-Mäusen isoliert und für Transmigrationsassays verwendet. Dafür wurden die Milzen aus den Versuchstieren entnommen und mittels eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt. Nach Passage der Suspension durch ein Zellsieb entstand eine Einzelzellsuspension. Durch einen Gradienten wurden mononukleäre Zellen angereichert. Die Einzelzellsuspension wurde hierfür über das Trennmedium Histopaque[®]-1083 geschichtet und bei 2000 rpm und RT ohne Bremse für 20 min zentrifugiert. Erythrozyten und nicht vitale Zellen besitzen eine höhere Dichte als Histopaque[®]-1083 und sinken bei der Zentrifugation ab. In der Interphase konnten mononukleäre Zellen abgenommen werden. Aus diesen wurden CD4⁺ T-Zellen durch Depletion unerwünschter Zellpopulationen angereichert.

Panningschalen waren durch Inkubation von Petrischalen mit Ziege-anti-Maus IgG Antikörpern (8 ml pro Schale, 50 µg/ml in PBS) bei 4°C über 24 h hergestellt worden. Vor Verwendung wurde die Antikörperlösung abgenommen und die *Panningschalen* mit PBS dreimal gespült. Auf die *Panningschalen* wurde die Zellsuspension in cRPMI für 20 min bei RT gegeben. Dabei adhärten IgG-exprimierende B-Zellen an die IgG-Antikörper, welche an der Plattenoberfläche hafteten. Nicht adhärente Zellen wurden im Überstand abgenommen und anschließend mit PBS/BSA gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm für 10 min). Die von B-Zellen depletierte Zellsuspension wurde mit einem anti-CD8, anti-CD11b und anti-Fcγ-Rezeptor II/III Antikörpermix (*Panning-Mix*) inkubiert. Diese Antikörper binden an CD8⁺ Zellen, Monozyten, Granulozyten, Makrophagen, DC, NKT-Zellen und unreife B-Zellen. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt. In einem zweiten *Panningschritt* adhärten die so mit IgG gekennzeichneten Zellen ebenfalls fest an die *Panningschalen*. Im Überstand reicherten sich CD4⁺ T-Zellen an. Mit dem beschriebenen Anreicherungsverfahren konnten im Durchschnitt 1×10^7 Zellen aus einer Milz isoliert werden.

Um den Anteil an CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen, erfolgte die Färbung der Zellen mit fluorochromgekoppelten anti-CD4- und anti-CD45RB-Antikörpern von $2,5 \times 10^6$ Zellen in 500 µl Migrationsmedium für 20 min bei 4°C und die Analyse am Durchflusszytometer (Abb. 4). Als CD4⁺ T-Zellen wurden alle Zellen bezeichnet, die im Durchflusszytometer hoch positiv für den CD4-Cy5 Antikörper waren und ein niedriges Pi-Signal zeigten. Nach

Antigenkontakt entwickelt sich ein Teil der CD4⁺ T-Zellen zu Memory-Zellen, die über Jahre stabil sind und sich durch Antigene sehr viel leichter und schneller aktivieren lassen als naive T-Zellen. Naive CD4⁺ T-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expression des Oberflächenmoleküls CD45RB aus, welches bei der Differenzierung zu Memory-T-Zellen herunter reguliert wird [1]. Als Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen wurden daher die CD4⁺ Zellen bezeichnet, die ein niedriges CD45RB-Signal zeigten, als naive CD4⁺ T-Zellen entsprechend die Population mit hohem CD45RB-Signal. Mittels *Panning* konnten CD4⁺ T-Zellen mit einer Reinheit von 75-83 % isoliert werden.

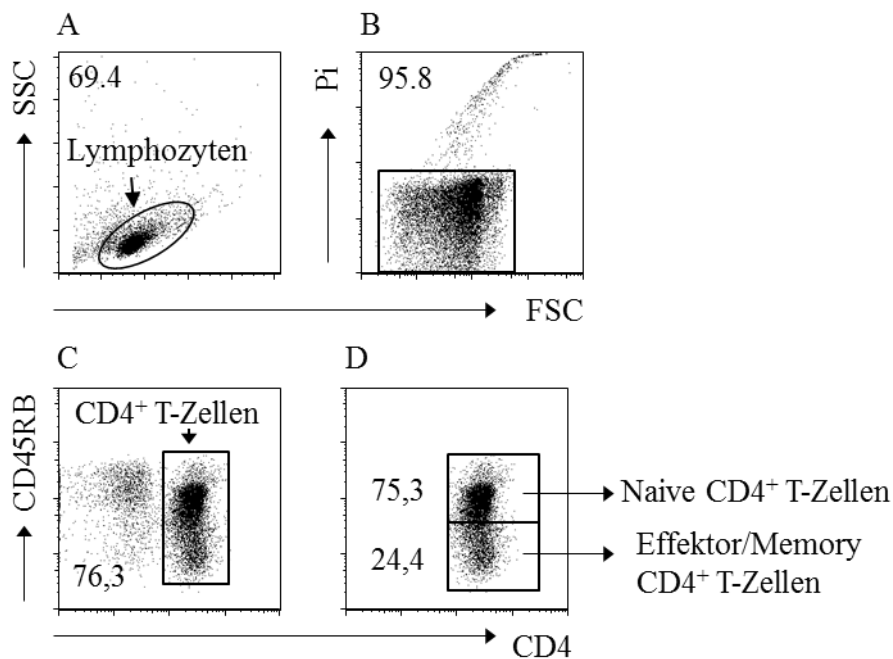


Abb. 4: Analyse von CD4⁺ T-Zellen am Durchflusszytometer. Nach Abnahme von der *Panning*platte wurde die Zellsuspension mit anti-CD4 und anti-CD45RB Antikörper gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. (A) zeigt die Gatesetzung für die Lymphozytenpopulation. Die PI Population (B), die hoch positiv für CD4 war (C), wurde weiter in CD45RB-hoch und -niedrig positive Zellpopulationen unterteilt (D). Die Zahlen in den Dot Plots zeigen die Anzahl der Events in den gelegten Gates. Die Abbildung steht repräsentativ für die Reinheiten der durchgeführten CD4⁺ T-Zell-Isolationen.

2.6.5. Transmigrationsassay

Durchführung der Transmigrationsassays

Mittels des Transmigrationsassays wurde die Migrationsrate von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-*Monolayer* bestimmt. Hierfür wurden Transwell[®]-Filtereinsätze in 24-Well-Platten von Corning Costar[®] verwendet. Deren Boden besteht aus einer Polycarbonat-Membran, die mit 5 µm großen Poren durchsetzt sind. Die Transwell[®]-Einsätze wurden vor dem Aussähen von LSEC mit 0,2 % Gelatine für 30 min inkubiert und anschließend mit PBS/BSA gewaschen. Danach wurden *ex vivo* isolierte LSEC auf den Transwell[®]-Filtereinsätzen (5×10^5 in 200 µl cDMEM pro

Transwell[®]) über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Vor einem Transmigrationsassay wurde der Zelllayer mit PBS/BSA gewaschen, um nicht adhären Zellen zu entfernen und für eine Stunde in cRPMI inkubiert.

Für die Transmigration wurden 5×10^5 CD4⁺ T-Zellen in 100 µl Migrationsmedium in die obere Transwell[®]-Kammer gegeben. In die untere Kammer wurden 600 µl Migrationsmedium pipettiert. Die Zeit für die Transmigration der CD4⁺ T-Zellen betrug 90 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Die gleiche Anzahl von CD4⁺ T-Zellen (5×10^5 CD4⁺ T-Zellen in 600 µl Migrationsmedium) wurde in eine 24-Well-Platte pipettiert und ebenfalls für 90 min inkubiert. Diese als *Input* bezeichneten Proben wurden später bei der Berechnung der Transmigrationsrate als Ausgangszellzahl verwendet. Sie stellt den Maximalwert der Transmigration dar, bei dem 100 % aller CD4⁺ T-Zellen von der oberen in die untere Transwell[®]-Kammer migrieren.

Quantifizierung der transmigrierten CD4⁺ T-Zellen

Die Analyse der migrierten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurden die CD4⁺ T-Zellen durch Markierung mit Antikörpern gegen das CD4- und CD45RB-Oberflächenmolekül identifiziert (Abb. 4). Für die Färbung wurden 500 µl Migrationsmedium mit den migrierten Zellen aus der unteren Transwell[®]-Kammer sorgfältig resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Vor dem Pipettieren der migrierten Zellen wurden in die FACS-Röhrchen 10 µl Fluoresbrite[™] Microspheres Zählbeads in PBS vorgelegt. Anschließend wurden anti-CD4 und anti-CD45RB Antikörper sowie anti-Fcγ-Rezeptor II/III und Ratten-IgG in PBS/BSA zugegeben. Die Zellen wurden mit dem Antikörpermix für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte ohne vorhergehendes Waschen der Zellen und nach Zugabe von Pi.

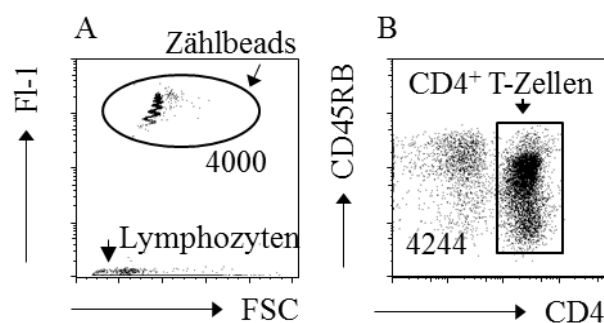


Abb. 5: Berechnung der Transmigrationsrate von CD4⁺ T-Zellen mittels Fluoresbrite[™] Microsphere Zählbeads. Die migrierten Zellen wurden mit anti-CD4 Antikörper gefärbt und mit einer definierten Anzahl an fluoreszierenden Zählbeads versetzt. In der Analyse am Durchflusszytometer konnten die Zählbeads getrennt von den übrigen Zellen detektiert werden (A). Die Messung wurde nach 4000 detektierten Zählbeads beendet und die Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen zu diesem Zeitpunkt wurde bestimmt (B). Die Zahlen in den Dot Plots zeigen die Anzahl der Events in den gelegten Gates.

Mittels der fluoreszierenden Zählbeads erfolgte die Bestimmung der Transmigrationsrate. Die Zählbeads können aufgrund ihrer Größe und der starken Fluoreszenzintensität im Fluoreszenz-Detektionskanal 1 (FL-1) getrennt von den Zellen detektiert werden (Abb. 5). Nach der Detektion von 4000 Zählbeads wurde die Messung am Durchflusszytometer gestoppt und der Anteil an transmigrierten CD4⁺ T-Zellen konnte aus dem Verhältnis von CD4⁺ T-Zellzahl zu den gemessenen Zählbeads nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\text{migrierte CD4}^+ \text{ T-Zellen} = \frac{6/5 * \text{CD4}^+ \text{ T-Zellzahl} * \text{Zählbeadkonzentration}}{\text{Zahl der Zählbeads}}$$

Die CD4⁺ T-Zellzahl und Zahl der Zählbeads aus der obigen Gleichung wurden wie beschrieben am Durchflusszytometer bestimmt. Die notwendige Zählbeadkonzentration wurde zuvor mittels der Zählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. So konnte die Zellzahl der transmigrierten Gesamt CD4⁺ T-Zellen, Effektor/Memory oder naiven CD4⁺ T-Zellen ermittelt werden. Diese Zellzahl wurde ins Verhältnis zur Ausgangszellzahl gesetzt und als Transmigrationsrate in % des *Input* angegeben.

$$\text{Transmigrationsrate (in \% des Input)} = \frac{\text{migrierte CD4}^+ \text{ T-Zellen} * 100}{\text{migrierte CD4}^+ \text{ T Zellen des Input}}$$

Inkubation des LSEC-Monolayers im Transmigrationsassay

Je nach Fragestellung erfolgte eine Inkubation des LSEC-Monolayers vor der Transmigration mit Inhibitoren bzw. Enzymen, die mögliche Zielstrukturen der Chemokinaufnahme, des intrazellulären Transports oder der Chemokinimmobilisation blockierten. Pro Ansatz wurden jeweils Triplikate gemessen. Die Inkubation fand bei 37°C und 5% CO₂ vor der Transmigration statt, anschließend wurden die Transwell[®]-Einsätze mit dem LSEC-Monolayer in PBS/BSA gründlich gewaschen und in eine frische Lochplatte umgesetzt, um eine Auswirkung von Rückständen der Substanzen zu minimieren.

Die Enzyme Heparinase I (Hep) und Chondroitinase ABC (Cho) sind in der Lage sulfatierte Disaccharideinheiten von GAG abzuspalten [43-45]. Natriumchlorat (NaClO₃) bewirkt durch Enzyminhibition die Synthese von geringer sulfatierten GAG [46]. Die Inkubation des LSEC-Monolayers mit Hep (1 U/ml) erfolgte für 2 h, die Inkubation mit Cho (1 U/ml) für 1 h jeweils in cDMEM in der oberen und unteren Kammer. Die Behandlung mit NaClO₃ (10 nM) erfolgte für 4 h in cDMEM in der oberen Transwell[®]-Kammer. Clathrin-vermittelter Transport in

Endothelzellen kann durch die kationischen, amphiphilen Substanzen Chlorproamzin (CPZ) und Monensin (Mon) blockiert werden. Die Inhibition beruht auf dem Verlust der Bindung von Clathrin mit dem AP2-Adaptor-Komplex [47]. LSEC-*Monolayer* wurden mit Mon (25 μM) oder CPZ (50 μM) in cDMEM für 2 h in der unteren Transwell[®]-Kammer behandelt. Die polyenen Antimykotika Filipin (Fili) und Nystatin (Nyst) bewirken eine tiefgreifende Deformation der Struktur von Caveolae und behindern sie in ihrer Funktion [48, 49]. LSEC-*Monolayer* wurden mit Nyst (30 μM) oder Fili (30 μM) in cDMEM für 2 h von der unteren Transwell[®]-Kammer inkubiert. Zytoskelett-abhängige Vesikel-Transportprozesse in LSEC wurden mittels Brefeldin A (Bref A) und Cytochalasin B (Cyt B) geblockt. Beide Substanzen stören das Aktinskelett und die Aktinpolymerisation [47]. LSEC-*Monolayer* wurden für 2 h mit Cyt B (10 $\mu\text{g/ml}$) oder Bref A (10 $\mu\text{g/ml}$) in cDMEM von der unteren Transwell[®]-Kammer behandelt und dann mit PBS/BSA gespült. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird durch den Antagonisten AMD3100 (Plerixafor[®]) spezifisch antagonisiert und somit die Bindung des Liganden CXCL12 an den Rezeptor verhindert [50]. LSEC-*Monolayer* wurden mit AMD3100 (5 $\mu\text{g/ml}$) in cDMEM für 1 h von der unteren Transwell[®]-Kammer inkubiert.

Die Inkubation der LSEC-*Monolayer* mit Chemokinen erfolgte von der unteren Transwell[®]-Kammer. Dabei wurden CXCL12 (0,008 bis 2,4 $\mu\text{g/ml}$), CXCL9 (1,25 $\mu\text{g/ml}$) und CXCL10 (0,1 $\mu\text{g/ml}$) in cDMEM verwendet. Diese wurden entweder vor der Transmigrationszeit (Vorinkubation) für 2 Stunden oder während der Transmigrationszeit in die untere Kammer des Transwells[®] gegeben. Die Abfolge der einzelnen Inkubationsschritte ist schematisch in Abb. 6 dargestellt.

Überprüfung der Ausbildung und Morphologie des LSEC-Monolayer

Die Morphologie des LSEC-*Monolayer* wurde nach jedem Transmigrationsassay nach Fixierung und Färbung der LSEC auf den Transwell[®]-Filtereinsätzen am AxioImager Z1 Mikroskop überprüft. Der *Monolayer* wurde gewaschen und für 24 h durch Bedampfung mit 37% Formaldehydlösung fixiert. Danach erfolgte für 15 min eine Färbung mit 5% Giemsa-Lösung in Aqua dest. Anschließend wurden die Transwell[®]-Membranen von den Transwell[®]-Einsätzen gelöst und auf Objektträgern in Entellan[®] eingebettet. Diese wurden 24 h an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend konnten Zellmorphologie und Zelldichte der LSEC am Mikroskop überprüft werden.

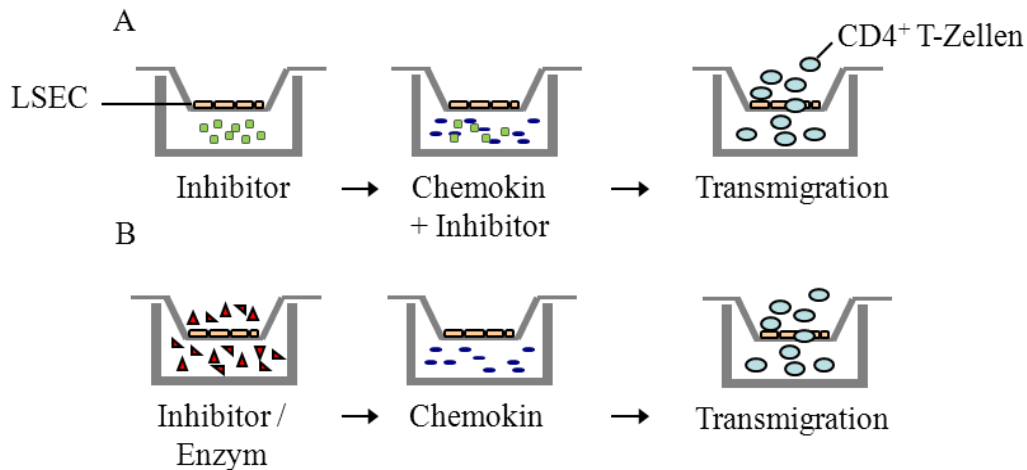


Abb. 6: Schematischer Ablauf der Inkubation des LSEC-Monolayer vor der CD4⁺ T-Zell Transmigration. Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Inkubationsschritte vor der Transmigration. LSEC-Monolayer wurden auf den Transwell[®]-Membranen kultiviert. Es erfolgte eine Vorinkubation des Inhibitor/ Enzyms von der unteren (A) oder oberen und unteren Transwell-Kammer (B). Die anschließende Inkubation des Chemokins erfolgte von der unteren Transwellkammer in Anwesenheit des Inhibitors (A) oder ohne Inhibitor (B). Es folgte die Transmigration nach ausführlichem Waschen des LSEC-Monolayers.

2.6.6. AcLDL-Assay

Zu den von LSEC exprimierten Endozytoserezeptoren gehört der *Macrophage scavenger receptor A* (MSR-A) [51], welcher in LSEC die Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein (AcLDL) in Clathrin-ummantelte Vesikel vermittelt [52]. Die Messung der AcLDL-Aufnahme in LSEC wurde als Reinheitskontrolle und Parameter für die Endozytosekapazität der LSEC verwendet. Es wurde an das Fluorochrom FITC gekoppeltes AcLDL verwendet. Zellen, die AcLDL aufgenommen hatten, waren im Durchflusszytometer als FITC⁺ darstellbar.

Für AcLDL-Assays wurden LSEC auf 24-Well-Platten kultiviert. Diese wurden zuvor mit 0,2% Gelatine beschichtet und je 1×10^6 LSEC pro 24-Well in 1 ml cDMEM ausgesät. Die LSEC adhärten über Nacht und wurden am folgenden Tag mit PBS/BSA gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

Um die AcLDL-Aufnahme zu messen, wurden LSEC für 2 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ FITC-konjugiertem AcLDL bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Inkubation wurde der *Monolayer* mit PBS/BSA mehrmals gründlich gewaschen und anschließend durch Behandlung mit dem Enzym Accutase[™] für 10 min bei 37°C von der Platte gelöst. Der prozentuale Anteil FITC⁺ Zellen wurde am Durchflusszytometer bestimmt. Eine Diskrimination von toten und lebenden Zellen wurde durch Zugabe von PI erreicht. Der Geometrische Mean der Fluoreszenzintensität der PI FITC⁺ Zellfraktion wurde gemessen und zeigte die Aufnahme des FITC-gekoppelte AcLDL in LSEC.

2.6.7. Apoptose-Assay

Zur Bestimmung der Apoptoserate von LSEC wurde deren Caspase-3 und -7 Aktivität in Kultur mit dem Apoptose-Kit von ANA Spec gemessen. Caspasen sind eine Gruppe von Proteasen, die während der Apoptose kaskadenartig in großen Mengen aktiviert werden. Sie sind für die Spaltung von Substraten verantwortlich, die den programmierten Zelltod auslösen [53]. Als Indikator für die Enzymaktivität wurde das an das Fluorochrom AFC (7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin) gekoppelte Peptid AC-Sp-Glu-Val-Asp verwendet. Sind die Caspasen 3 und 7 aktiv, wird AFC vom Peptid abgespalten. Das Fluorochrom wird mit Licht der Wellenlänge 380 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal bei einer Wellenlänge von 500 nm detektiert. Als Positivkontrolle für eine Apoptosereaktion wurde Staurosporin verwendet, welches Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen induziert [54]. LSEC wurden hierfür vor dem Apoptose-Assay für 4 h mit 0,2 mg/ml Staurosporin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Für einen Apoptose-Assay wurden 1×10^5 LSEC in 100 µl cDMEM über Nacht in 96-Well-Platten kultiviert. Nach ausführlichem Waschen der LSEC wurden 100 µl cDMEM und 50 µl der Caspase-3/7 Substrat-Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 60 Sekunden auf dem Schüttler gemischt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte mit dem Spectrofluorometer. Es wurde sowohl eine Kinetik- als auch eine Endpunktmessung durchgeführt.

2.6.8. Berechnung und Statistik

Für die Kalkulation der Transmigrationsraten wurde das Programm Excel (Microsoft) und für die Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse GraphPad Prism 5 verwendet. Um die Gleichheit der Verteilung zweier Stichproben zu testen, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test benutzt. Es wurden folgende Signifikanzniveaus als Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt: ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie und Endozytosefähigkeit kultivierter LSEC

Die chemokinabhängige Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC-*Monolayer* wurde mittels Transmigrationsassays analysiert. LSEC, die spezifisch durch den Endothelmarker CD146 identifiziert werden können, wurden über Nacht auf Transwell®-Filtereinsätzen kultiviert. Da bekannt ist, dass nur $CD146^+$ Endothelzellen adhären, konnten andere NPC durch Waschen entfernt werden. Der verbliebene *Monolayer* bestand nur aus $CD146^+$ Endothelzellen [55]. Eine Voraussetzung zur Durchführung dieser Versuche war, dass die LSEC-*Monolayer* auf den Transwell®-Filtereinsätzen funktionsfähig waren. Um die Intaktheit des *Monolayers* zu überprüfen, wurden die kultivierten LSEC am Lichtmikroskop untersucht. Nur wenn die morphologischen Kriterien für intakte LSEC wie ausgestreckte Zellfortsätze und geschlossene Zellkontakte erfüllt waren (Abb. 7A), wurden Transmigrationsexperimente durchgeführt.

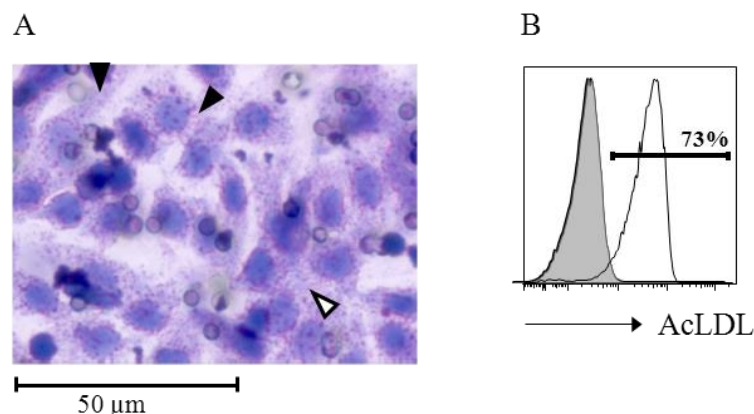


Abb. 7: Morphologie und Funktionalität von *in vitro* kultivierten LSEC. (A) Auf Transwell®-Membranen kultivierte LSEC wurden fixiert, mittels Giemsalösung angefärbt und am Lichtmikroskop untersucht. Dargestellt ist der LSEC-*Monolayer*. Die Poren der Transwell®-Membranen sind als runde Ausstanzungen unter dem Zell-*Monolayer* sichtbar, intakte Zellkontakte (\triangleright) und Zellfortsätze (\blacktriangleright) sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Abbildung steht repräsentativ für 20 unabhängige Experimente. (B) Auf Zellkulturplatten kultivierte LSEC-*Monolayer* wurden mit AcLDL-FITC für 120 min bei 37°C inkubiert, mit Accutase abgelöst und anschließend am Durchflusszytometer analysiert. Das Histogramm steht repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Schmale Linie: Inkubation mit AcLDL-FITC, grau schraffierte Fläche: keine Inkubation mit AcLDL-FITC.

Nach erfolgter Transmigration wurden die LSEC am Lichtmikroskop erneut auf eine eventuelle Schädigung des *Monolayers* durch die Inkubations- und Waschschriffe überprüft.

Als Kriterium für ihre Funktionalität sollten die LSEC auch nach Isolation und Kultivierung über Nacht eine hohe Kapazität zur Endozytose haben [56]. Dies wurde durch die Messung der Aufnahme von FITC-gekoppeltem AcLDL in LSEC am Durchflusszytometer überprüft. Abbildung 7B zeigt exemplarisch die AcLDL-Aufnahme in LSEC. Von den über Nacht

kultivierten LSEC nahmen $73 \pm 13\%$ AcLDL-FITC auf. Nach morphologischen Kriterien und Beurteilung der Endozytosekapazität ergab sich somit ein funktionsfähiger LSEC-Monolayer nach Kultur auf Transwell®-Einsätzen über Nacht.

3.2 Konzentrationsabhängigkeit der CXCL12-vermittelten CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer

Vorarbeiten zeigten, dass die CXCL12-vermittelte Transmigration von CD4⁺ T-Zellen im Transwell®-System durch einen LSEC-Monolayer verstärkt wird [39]. Es sollte untersucht werden, ob die transmigrationssteigernde Wirkung des LSEC-Monolayers in Abhängigkeit von einer bestimmten CXCL12-Konzentration auftritt. Die Transmigrationsraten durch LSEC-Monolayer und endothelfreie Filtermembranen wurden im Transmigrationsassay verglichen, um die LSEC-spezifische Wirkung auf die CXCL12-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration zu erfassen. So konnte zwischen einer endothelunabhängigen Wirkung des Chemokins (Chemotaxis) und dem Effekt des LSEC-Monolayers differenziert werden.

In Transwell®-Systemen mit und ohne LSEC-Monolayer wurde CXCL12 in Konzentrationen von 0,008 µg/ml bis 2,4 µg/ml in die untere Kammer und CD4⁺ T-Zellen in die obere Transwell®-Kammer gegeben und nach 90 Minuten die Transmigrationsrate am Durchflusszytometer bestimmt. Die konzentrationsabhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration ist in Abbildung 8 dargestellt. Auch chemokinunabhängig fand eine Migration der CD4⁺ T-Zellen von der oberen in die untere Transwell®-Kammer statt, welche im Folgenden als Spontanmigration bezeichnet wird. Die CXCL12-abhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch den LSEC-Monolayer war bis zu einer Chemokinkonzentration von 0,24 µg/ml signifikant höher als im endothelfreien System. Während sich die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen im endothelfreien System bis zu einer CXCL12-Konzentration von 0,024 µg/ml im Bereich der Spontanmigration bewegte, trat durch den LSEC-Monolayer bereits bei einer Chemokinkonzentration von 0,008 µg/ml eine deutlich erhöhte Transmigration auf. Die Transmigrationsrate von CD4⁺ T-Zellen durch endothelfreie Transwell®-Membranen erreichte ihr Maximum bei einer Chemokinkonzentration von 0,8 µg/ml und sank bei höheren Konzentrationen wieder ab. Die höchste Steigerung der CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer erfolgte bei einer CXCL12-Konzentration von 0,24 µg/ml. Höhere Chemokinkonzentrationen bewirkten auch hier eine geringere Transmigration. Die Steigerung der CXCL12-vermittelten Transmigration durch den LSEC-Monolayer im Vergleich zu endothelfreien Membranen zeigte sich somit vor allem bei niedrigen CXCL12-Konzentrationen.

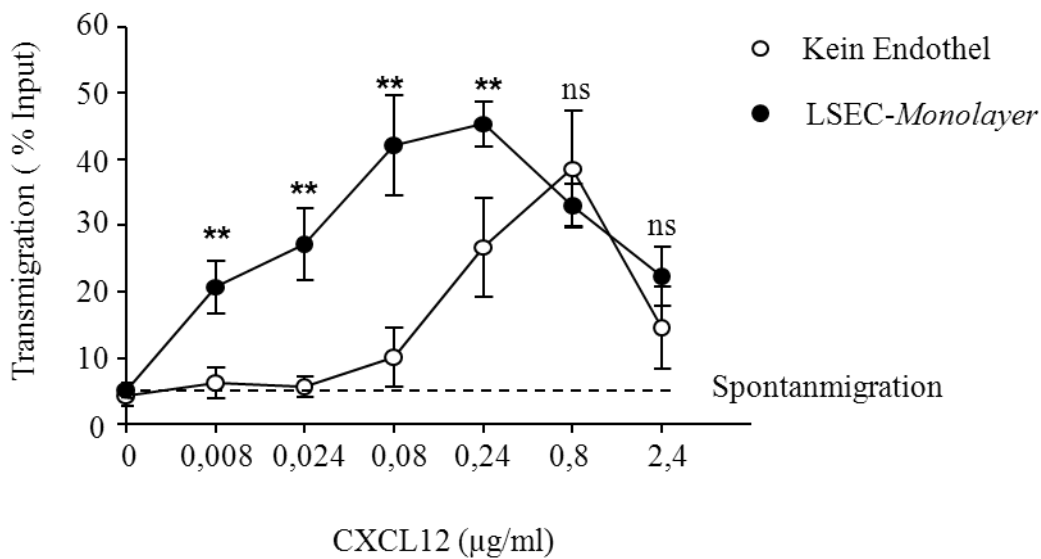


Abb. 8: CXCL12-abhängige Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen. LSEC-Monolayer wurden auf Transwell®-Filtereinsätzen kultiviert. $CD4^+$ T-Zellen wurden in die obere Kammer des Transwell®-Systems gegeben und die Transmigration über endothelfreien Transwell®-Membranen und LSEC-Monolayer verglichen. CXCL12 war in der unteren Transwell®-Kammer vorhanden. Nach 90 min wurden in die untere Kammer transmigrierte $CD4^+$ T-Zellen abgenommen, mit Zählbeads versetzt und nach Markierung mit einem anti- $CD4$ Antikörper am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Transmigrationsrate von $CD4^+$ T-Zellen als % des *Input*. Die gestrichelte Linie zeigt die Spontanmigration. Die Abbildung zeigt Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) der Transmigrationsraten von 4 unabhängigen Experimenten mit ** = $p < 0,01$; ns = nicht signifikant.

3.3. Transmigration durch den LSEC-Monolayer nach Chemokin-Vorinkubation

LSEC steigern die Wirkung von CXCL12, wenn das Chemokin in der unteren Transwell®-Kammer während der Transmigration vorhanden ist. Ein Chemokingradient, bei dem das Chemokin während der Transmigration ständig löslich präsent ist, ist jedoch *in vivo* unwahrscheinlich. Hier bewirkt der Blutfluss eine ständige Verdünnung löslicher Substanzen [57]. Viele perivaskuläre Zellen produzieren vor allem unter entzündlichen Bedingungen Chemokine. Damit diese Chemokine lokal auf T-Zellen im Blutstrom wirken können, müssen sie durch das Endothel transportiert und auf dem Endothel immobilisiert werden. Es sollte untersucht werden, ob LSEC die Chemokinwirkung auf $CD4^+$ T-Zellen auch verstärken, wenn die Zellen basolateral mit dem Chemokin vorinkubiert werden, d.h. ob eine Internalisierung, Transzytose und Immobilisierung des Chemokins an der Endotheloberfläche stattfindet. In Transwell®-Filtereinsätzen wurden LSEC-Monolayer oder endothelfreie Transwell®-Membranen von der unteren Kammer zunächst für 120 min mit dem Chemokin CXCL12 vorinkubiert und danach ausführlich gewaschen, bevor $CD4^+$ T-Zellen in die obere Kammer zugegeben und die

Transmigration analysiert wurde. Die Steigerung der CXCL12-vermittelten Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen durch den LSEC-Monolayer war signifikant höher als die Transmigration über gleichermaßen vorbehandelte endothelfreie Membranen (Abb. 9).

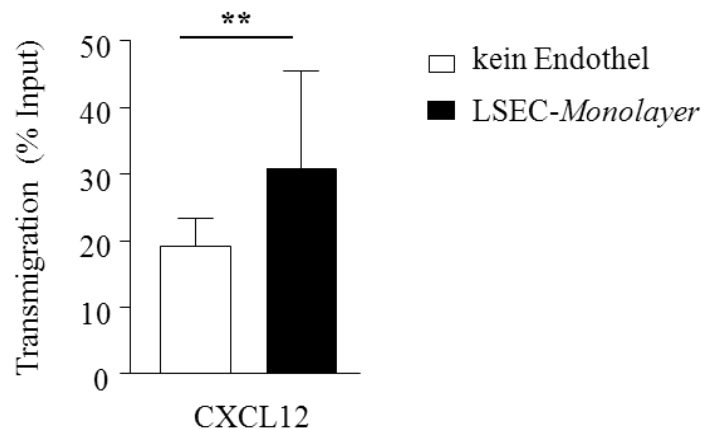


Abb. 9: Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen nach CXCL12-Vorinkubation. Auf Transwell®-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen wurden mit CXCL12 in der unteren Kammer für 120 min inkubiert und danach gründlich gewaschen. Es folgte die Zugabe von $CD4^+$ T-Zellen in die obere Kammer und die Analyse der Transmigration am Durchflusszytometer wie in Abb. 8 beschrieben. Dargestellt ist die Transmigrationsrate von $CD4^+$ T-Zellen als % des *Input*. Die Abbildung zeigt MW \pm SD der Transmigrationsraten von 3 unabhängigen Experimenten mit ** = $p < 0,01$.

Bei der Rekrutierung von T-Zellen in das entzündete Leberparenchym spielt das Chemokin CXCL9 eine entscheidende Rolle [32]. Für CXCL9 ist ebenso wie für CXCL12 eine transmigrationssteigernde Wirkung durch den LSEC-Monolayer gezeigt worden, wenn CXCL9 während der Transmigration in der unteren Kammer präsent ist [39]. Es sollte überprüft werden, inwiefern LSEC eine Fähigkeit zur Transzytose und Immobilisierung von CXCL9 haben. Wie für CXCL12 beschrieben, wurden LSEC-Monolayer mit CXCL9 basolateral vorinkubiert, bevor die Zugabe von $CD4^+$ T-Zellen erfolgte. Da der Chemokinrezeptor für CXCL9 - CXCR3 - nur auf Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen und nicht auf naiven $CD4^+$ T-Zellen exprimiert wird [58], erfolgte eine Analyse der Transmigration von $CD4^+$ T-Zell-Subpopulationen. Abbildung 10 zeigt die Transmigrationsraten durch LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen für Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen und naive $CD4^+$ T-Zellen. Die Vorinkubation mit CXCL9 steigerte sowohl die Transmigration der Effektor/Memory Zellen über endothelfreie Transwell®-Membranen als auch über den LSEC-Monolayer. Die Steigerung der Transmigrationsrate über den LSEC-Monolayer war im Vergleich zu den endothelfreien Transwell®-Membranen jedoch signifikant höher (Abb. 10A).

Eine Steigerung der Transmigration von naiven $CD4^+$ T-Zellen durch CXCL9 wurde erwartungsgemäß nicht beobachtet (Abb. 10B). Daher ist in folgenden Experimenten mit CXCL9 nur die Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zell-Subpopulation dargestellt.

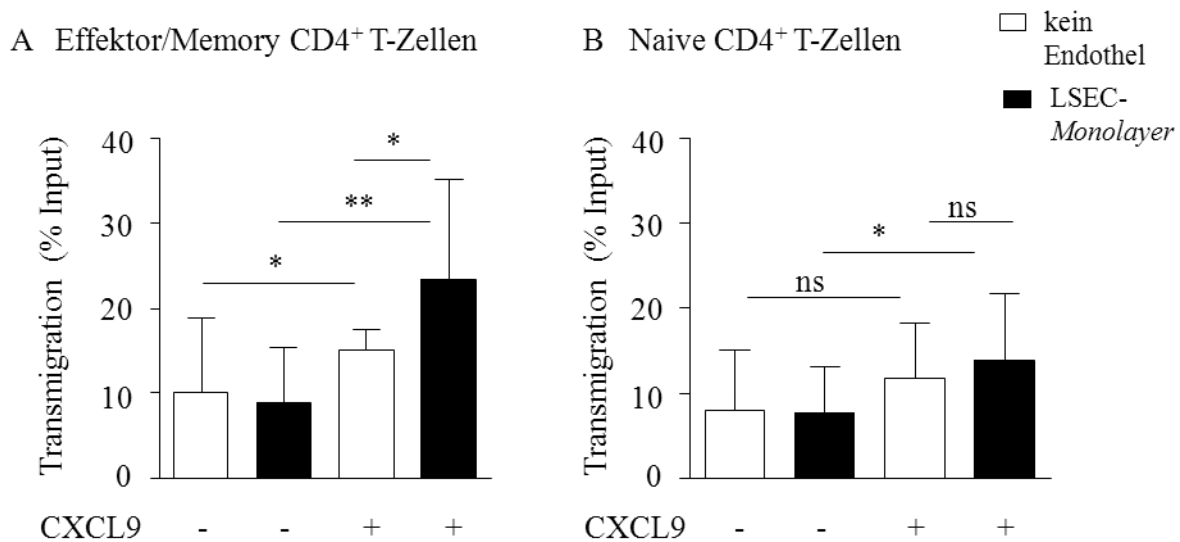


Abb. 10: Transmigration von Effektor/Memory und naiven $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen nach CXCL9-Vorinkubation. Auf Transwell®-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell®-Membranen wurden mit CXCL9 von der unteren Kammer für 120 min inkubiert und danach gründlich gewaschen. $CD4^+$ T-Zellen wurden in die obere Transwell®-Kammer gegeben. Nach 90 min wurden die transmigrierten $CD4^+$ T-Zellen aus der unteren Kammer abgenommen, mit Zählbeads versetzt und nach Markierung mit anti-CD4 und anti-CD45RB Antikörper am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Transmigrationsrate von (A) Effektor/Memory und (B) naiven $CD4^+$ T-Zellen als % des *Input*. Die Abbildung zeigt MW \pm SD der Transmigrationsraten von 4 unabhängigen Experimenten mit * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns = nicht signifikant.

Das Chemokin CXCL10 ist bei der Entstehung von T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktionen in der Leber entscheidend und wirkt ebenso wie CXCL9 über den CXCR3-Rezeptor [31]. Daher wurde untersucht, ob LSEC CXCL10 durch Transzytose und Immobilisierung zur Verfügung stellen können und dadurch eine Verstärkung der Transmigration bewirken. Die CXCL10-Vorinkubation bewirkte im Vergleich eine deutliche Steigerung der Transmigrationsrate von Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen endothelfreie Membranen und LSEC-Monolayer zeigte (Abb. 11A). Abbildung 11B zeigt, dass, wie auch bei CXCL9 beobachtet, die Transmigration von naiven $CD4^+$ T-Zellen durch CXCL10 nicht beeinflusst wurde.

Zusammenfassend steigert eine basolaterale Vorinkubation des LSEC-Monolayer mit CXCL9 und CXCL12 die $CD4^+$ T-Zell-Transmigration signifikant. Der Vergleich mit endothelfreien Transwells zeigte, dass die Transmigrationssteigerung spezifisch in Anwesenheit von LSEC

auftrat. Für CXCL10 bewirkte die Anwesenheit von LSEC keine zusätzliche Transmigrationssteigerung.

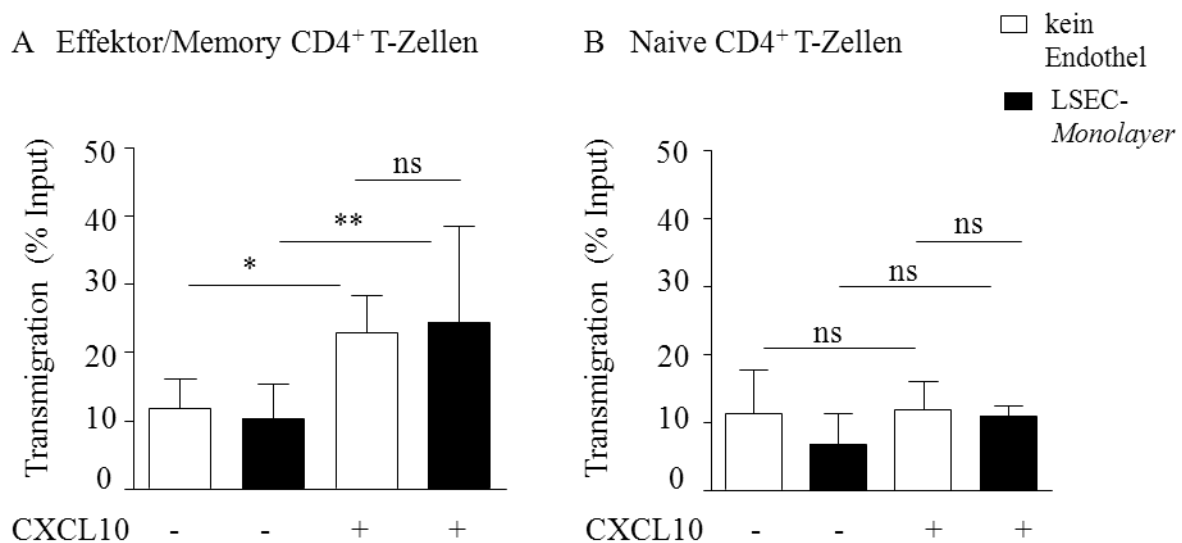


Abb. 11: Transmigration von Effektor/Memory und naiven CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-Monolayer und endothelfreie Transwell[®]-Membranen nach CXCL10-Vorinkubation. Auf Transwell[®]-Filtereinsätzen kultivierte Endothel-Monolayer und endothelfreie Transwell[®]-Membranen wurden mit CXCL10 von der unteren Kammer für 120 min inkubiert und danach gründlich gewaschen. Es erfolgte die Messung der CD4⁺ T-Zell-Transmigration wie in Abb. 10 beschrieben. Dargestellt ist die Transmigrationsrate von (A) Effektor/Memory und (B) naiven CD4⁺ T-Zellen als % des *Input*. Die Abbildung zeigt MW ± SD der Transmigrationsraten von 6 unabhängigen Experimenten mit * = p < 0,05; ns = nicht signifikant.

3.4. Inhibition intrazellulärer Transportwege in LSEC und Auswirkung auf die CD4⁺ T-Zell-Transmigration

Der Mechanismus, der der transmigrationsfördernden Wirkung von LSEC zu Grunde liegt, ist nicht bekannt. Endothelien können die Transmigration von T-Zellen durch die spezifische Internalisierung und gezielte Freisetzung von Chemokinen modulieren [38]. Es sollte analysiert werden, ob LSEC die CXCL9- und CXCL12-abhängige Transmigration durch einen solchen Mechanismus verstärken.

Die Internalisierung von Chemokinen in Endothelzellen kann auf verschiedenen Vesikel-vermittelten Wegen erfolgen. F-Aktin gecoatete Vakuolen können entweder Mikropartikel (Phagosomen) oder Flüssigkeit (Makropinosomen) aufnehmen [59]. Weiterhin können Moleküle mittels separater Membran-gebundener Trägervesikel (Caveolae) internalisiert und durch die Zelle transportiert werden (Transzytose) [60].

Es sollte untersucht werden, ob die Blockade der klassischen intrazellulären Internalisierungs- und Transportwege in LSEC einen Einfluss auf die chemokinabhängige transendotheliale Migration der CD4⁺ T-Zellen hat.

Für die Analysen wurden die Transportinhibitoren Nyst, Fili, Bref A, Cyt B, Mon und CPZ verwendet. Fili und Nyst bewirken eine tiefgreifende Deformation der Caveolae-Struktur und behindern sie in ihrer Funktion [48, 61]. Mon und CPZ inhibieren den Transport in Clathrin-ummantelten Vesikeln [47, 62]. Bref A und Cyt B verursachen eine Inhibition von Transportvesikeln durch die Störung von Aktinfilamenten des Zytoskellets [47]. Es wurden Transmigrationsassays durchgeführt, bei denen auf Transwell[®]-Membranen kultivierte LSEC-*Monolayer* bei der Chemokinvorinkubation auch mit Transportinhibitoren behandelt wurden, bevor die CD4⁺ T-Zellen für die Messung der Transmigration zugegeben wurden. Die Vorinkubation der LSEC-Monolayer mit den Inhibitoren sollte eine direkte Wirkung der Substanzen auf die CD4⁺ T-Zellen verhindern.

Die Behandlung der LSEC-*Monolayer* mit Nyst, Fili, Cyt B oder Bref A bewirkte keine signifikante Änderung der CD4⁺ T-Zell-Transmigration im Vergleich zu unbehandelten LSEC. Dies war sowohl bei der CXCL12-vermittelten als auch bei der CXCL9-vermittelten Transmigration der Fall (Abb. 12). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der LSEC mit Mon und CPZ zu einer signifikanten Verminderung der CXCL12- und CXCL9-abhängigen CD4⁺ T-Zell-Transmigration im Vergleich zu unbehandelten LSEC. Dieser Effekt war für Mon und CPZ bei CXCL9 gleich groß, bei CXCL12 für Mon signifikant stärker als bei CPZ (Abb. 12).

Um zu analysieren, ob Mon und CPZ tatsächlich eine Blockade der Clathrin-Internalisierung bewirken, wurde die Wirkung der Transportinhibitoren auf die AcLDL-Aufnahme in LSEC untersucht, da diese durch Clathrin-ummantelte Vesikel vermittelt wird [52]. Auf Zellkulturplatten kultivierte LSEC wurden mit je einem Transportinhibitor behandelt. Anschließend fand die Inkubation mit Inhibitor und FITC-gekoppeltem AcLDL statt. Die Aufnahme von AcLDL-FITC in LSEC wurde schließlich am Durchflusszytometer überprüft.

Es zeigte sich, dass die Inhibitoren unterschiedlich auf die AcLDL-FITC Aufnahme in LSEC wirkten. Mon und CPZ reduzierten den prozentualen Anteil AcLDL-FITC-positiver LSEC signifikant von 73 ± 13 % auf 37 ± 2 % bzw. 45 ± 10 % (Abb. 13A, B). Auch die Inkubation des LSEC-*Monolayers* mit Nyst verringerte den prozentualen Anteil an AcLDL-FITC-positiven LSEC auf 55 ± 5 %, während die Inkubation mit Fili (67 ± 3 %), Cyt B (60 ± 2 %) und Bref A (74 ± 12 %) keine Auswirkung auf die Aufnahme von AcLDL-FITC in LSEC hatte (Abb. 13B).

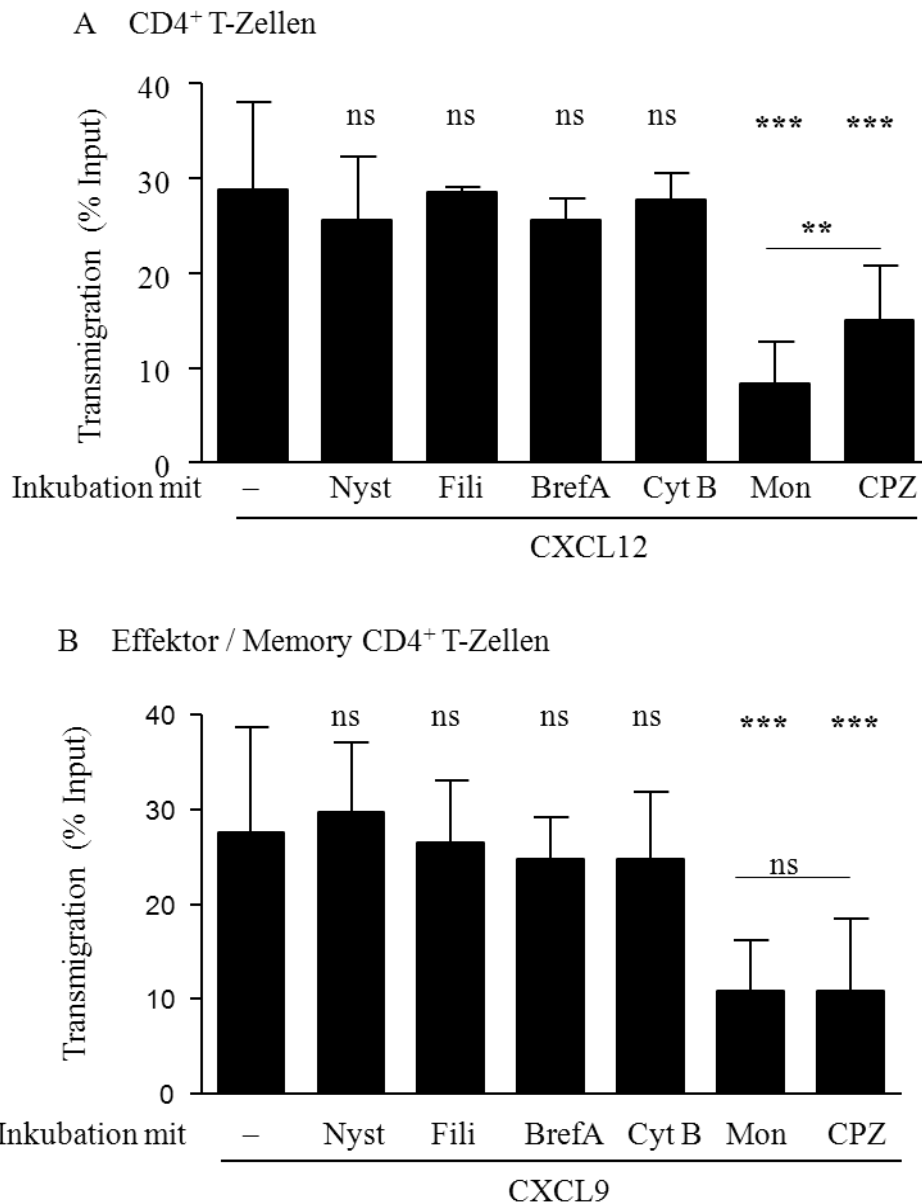


Abb. 12: Chemokinabhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer nach Vorinkubation von LSEC mit Transportinhibitoren. Auf Transwell®-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-Monolayer wurden mit den Transportinhibitoren Nyst, Fili, Bref A, CytB, Mon oder CPZ für 10 min von der unteren Transwell®-Kammer inkubiert und gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Transportinhibitor und dem Chemokin CXCL12 oder CXCL9 für 120 min von der unteren Transwell®-Kammer. Der LSEC-Monolayer wurde gewaschen und CD4⁺ T-Zellen wurden in die obere Transwell®-Kammer gegeben. Nach 90 min wurde die Transmigrationsrate wie in Abb. 10 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Transmigrationsraten von (A) Gesamt-CD4⁺ T-Zellen und (B) Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen als % des *Input* ohne und nach Inkubation mit Transportinhibitoren und CXCL12 bzw. CXCL9. Die Abbildung zeigt MW ± SD der Transmigrationsraten von jeweils 4 unabhängigen Experimenten mit ns = nicht signifikant; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

Es lässt sich somit feststellen, dass die als spezifisch für Clathrine beschriebenen Inhibitoren CPZ und Mon in LSEC eine Reduktion der Clathrin-vermittelten Internalisierung von AcLDL-FITC bewirkten. Auch durch Nyst wurde die Internalisierung reduziert, während Fili, Cyt B und Bref A keinen Effekt auf die Internalisierung von AcLDL-FITC in LSEC hatten.

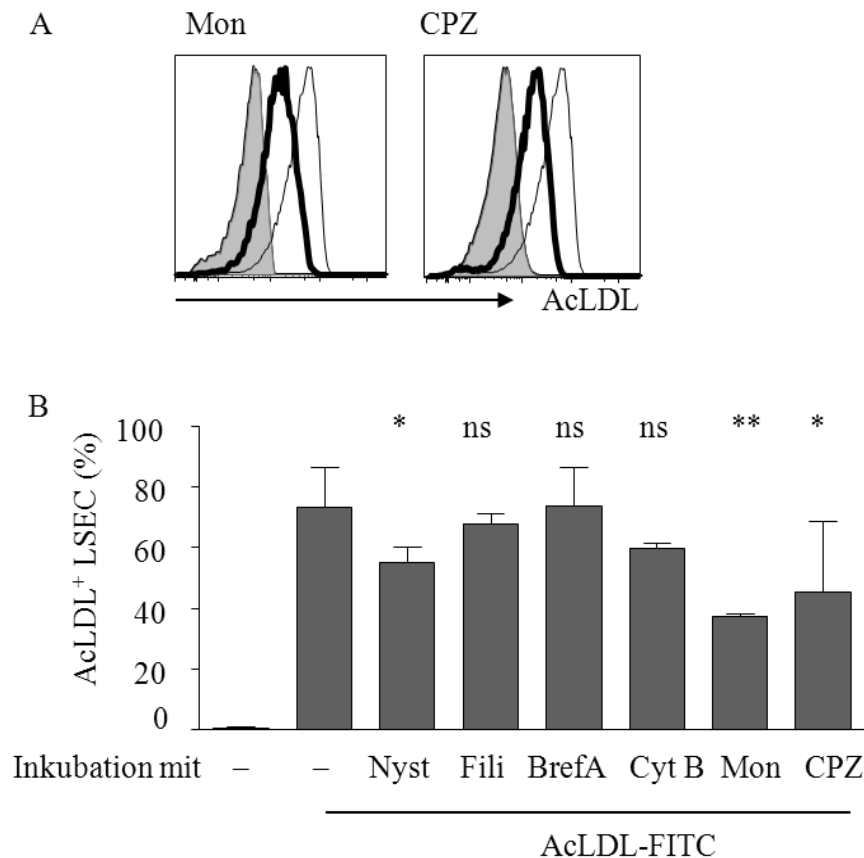


Abb. 13: Wirkung von Transportinhibitoren auf die AcLDL-FITC Aufnahme in LSEC. LSEC-Monolayer wurden auf Zellkulturplatten über Nacht kultiviert und dann mit Nyst, Fili, Bref A, Cyt B, Mon oder CPZ für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit Inhibitor und AcLDL-FITC für 120 min bei 37°C inkubiert, mit Accutase abgelöst und am Durchflusszytometer analysiert. (A) Dargestellt sind LSEC nach AcLDL-Inkubation (schmale Linie), nach AcLDL- und Mon bzw. CPZ-Inkubation (verstärkte Linie) sowie unbehandelte LSEC (grau schraffierte Fläche). Die Histogramme zeigen repräsentative Ergebnisse von 2 Experimenten. (B) Verglichen wurde der prozentuale Anteil AcLDL-FITC-positiver LSEC mit und ohne Behandlung mit Transportinhibitoren. Die Abbildung zeigt MW \pm SD der AcLDL-FITC-positiven Zellen von 3 unabhängigen Experimenten ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Zusätzlich sollte kontrolliert werden, ob die Reduktion der CXCL12- und CXCL9-vermittelten Transmigration durch CPZ und Mon durch eine von den Substanzen verursachte Schädigung des LSEC-Monolayer oder Beeinträchtigung der CD4⁺ T-Zell-Mobilität verursacht wird. Eine mögliche zellschädigende Wirkung der Inhibitoren auf die LSEC wurde durch die Messung der Caspase-3/7-Aktivität im Apoptose-Assay getestet. Caspasen werden im Rahmen der Apoptose aktiviert. Im verwendeten Assay führt eine vermehrte Caspaseaktivität zur Abspaltung des Fluorochroms AFC vom Trägerprotein und einem erhöhten AFC-Fluoreszenzsignal im Spektrofluorometer. LSEC wurden mit Staurosporin (St) oder Transportinhibitoren behandelt und die Fluoreszenzaktivität von AFC im Spektrofluorometer anschließend gemessen. St induziert Apoptose durch Aktivierung von Caspasen [63]. Die Behandlung der LSEC mit St führte zu einer deutlich gesteigerten AFC-Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz dazu zeigte sich

nach Inkubation der LSEC mit den Transportinhibitoren keine erhöhte Caspase-Aktivität (Abb. 14A). Die Inkubation mit den Transportinhibitoren induzierte in LSEC somit keine apoptotischen Signalwege.

Die Spontanmigration wurde als ein Maß für die chemokinunabhängige Migration von CD4⁺ T-Zellen über behandelte und unbehandelte LSEC verglichen. Es sollte analysiert werden, inwiefern Rückstände der Transportinhibitoren an den LSEC die Mobilität der CD4⁺ T-Zellen beeinflussen. Eine geringere Mobilität der CD4⁺ T-Zellen zeigt sich anhand einer verminderten Spontanmigration. LSEC wurden von der unteren Kammer mit Mon oder CPZ behandelt und anschließend die Transmigrationsrate von CD4⁺ T-Zellen gemessen. Die Spontanmigration der CD4⁺ T-Zellen war nach Behandlung der LSEC-*Monolayer* mit CPZ oder Mon vergleichbar mit der durch unbehandelte LSEC (Abb.14B). Zusätzlich wurde in einem Pilotversuch untersucht, ob CD4⁺ T-Zellen, die mit CPZ-behandelten LSEC in Kontakt gekommen waren, ein verändertes chemokinabhängiges Transmigrationsverhalten zeigten. Dafür wurden LSEC mit CPZ inkubiert und gewaschen. Dann wurden CD4⁺ T-Zellen auf das behandelte Endothel in die obere Transwell[®]-Kammer gegeben. Diese wurden nach 90 min abgenommen und auf einen mit CXCL12 vorinkubierten LSEC-*Monolayer* in ein neues Transwell[®] gegeben. Die Transmigration dieser transferierten Zellen wurde mit CD4⁺ T-Zellen verglichen, die nicht mit CPZ-behandelten LSEC in Kontakt gekommen waren. CD4⁺ T-Zellen mit und ohne Kontakt zu CPZ-behandelten LSEC zeigten eine gleich starke CXCL12-abhängige Transmigration durch LSEC-*Monolayer* (Abb. 14 C).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die spezifische Inhibition der Clathrin-abhängigen Internalisierung in LSEC die CXCL12- und CXCL9-abhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen reduziert. Eine Schädigung der LSEC oder CD4⁺ T-Zellen wurde nicht nachgewiesen. Inhibitoren des Caveolae-Transports oder des Aktin-Zytoskeletts hatten keinen Einfluss auf die chemokinvermittelte Transmigration von CD4⁺ T-Zellen über den LSEC-*Monolayer*.

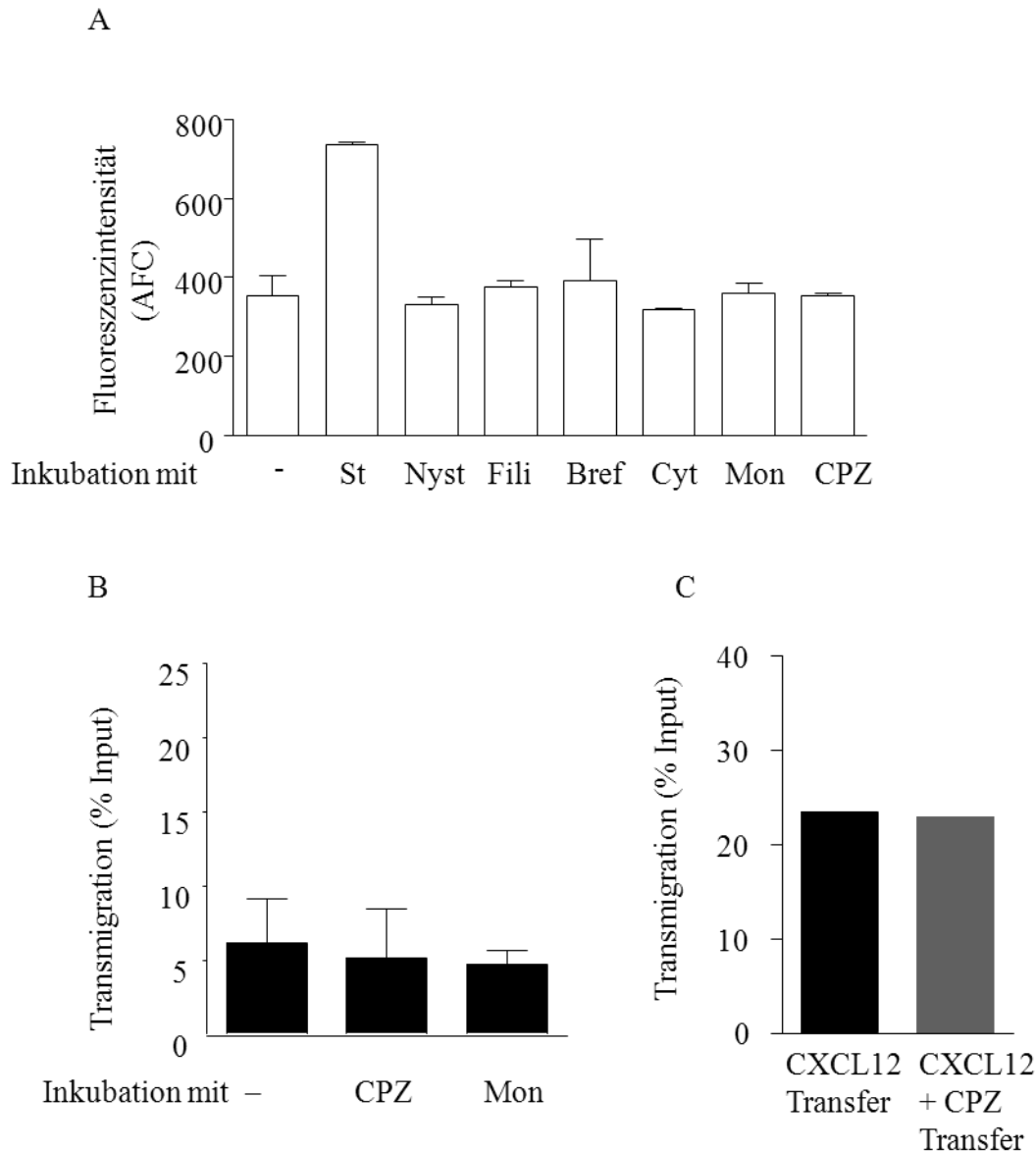


Abb. 14: Einfluss von Transportinhibitoren auf die Apoptoserate in LSEC, die Spontanmigration von CD4⁺ T-Zellen und die CD4⁺ T-Zell-Mobilität. (A) *Ex vivo* isolierte LSEC wurden auf 96-Well-Platten kultiviert und mit St für 4 h oder Nyst, Fili, Bref A, Cyt B, Mon sowie CPZ für 2 h bei 37°C behandelt. Nach Waschen des *Monolayer* wurde Caspase-3/7-Substrat auf die Zellen gegeben. Die Fluoreszenzintensität des AFC wurde am Spektrofluorometer über 2 Stunden gemessen. Dargestellt ist die AFC-Fluoreszenzintensität von behandelten und unbehandelten LSEC als Endpunktmessung in MW \pm SD von 2 unabhängigen Experimenten. (B) Auf Transwell[®]-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-*Monolayer* wurden mit den Transportinhibitoren Mon oder CPZ für 120 min von der unteren Transwell[®]-Kammer inkubiert und gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von CD4⁺ T-Zellen in die obere Transwell[®]-Kammer. Nach 90 min wurde die Transmigrationsrate wie in Abb. 10 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Transmigrationsraten von CD4⁺ T-Zellen als % des *Input* ohne und nach Inkubation mit Transportinhibitoren als MW \pm SD von 2 unabhängigen Experimenten. (C) Auf Transwell[®]-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-*Monolayer* wurden für 120 min von der unteren Transwell[®]-Kammer mit CPZ inkubiert und gewaschen. CD4⁺ T-Zellen wurden in die obere Transwell[®]-Kammer auf mit CPZ vorinkubierte LSEC-*Monolayer* (CXCL12+CPZ Transfer) oder nicht-vorinkubierte LSEC-*Monolayer* (CXCL12 Transfer) gegeben und nach 90 min von der oberen Kammer wieder abgenommen und auf einen frischen LSEC-*Monolayer* gegeben. Dieser war zuvor für 120 min mit CXCL12 von der unteren Transwell[®]-Kammer inkubiert worden. Nach 90 min wurden die transmigrierten T-Zellen aus der unteren Transwell[®]-Kammer abgenommen und die Transmigrationsrate wie in Abb. 10 beschrieben als % des *Input* quantifiziert. Die Abbildung zeigt Einzelmessungen eines Pilotversuchs.

3.5. Rolle von Chemokinrezeptoren in LSEC bei der CD4⁺ T-Zell Transmigration

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Clathrin-Vesikeln in LSEC die CXCL12- und CXCL9-vermittelte Transmigration deutlich reduziert. Es wurde daher ein Zusammenhang zwischen der Chemokinwirkung und Clathrin-abhängiger Internalisierung der Chemokine vermutet. Nun sollten Moleküle identifiziert werden, die die Bindung und Internalisierung der Chemokine in die Vesikel vermitteln könnten. Die Clathrin-abhängige Internalisierung läuft in vielen Endothelien Rezeptor-vermittelt ab [64]. Spezifische Rezeptoren, die Chemokine binden, sind die G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren. Daher wurde die Auswirkung der Blockade der endothelialen Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR3 auf die CXCL12- bzw. CXCL9-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration analysiert.

3.5.1. CXCR4

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die CXCR4-CXCL12-Interaktion auf die chemokinabhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer hat, wurden Transmigrationsassays durchgeführt. AMD3100 ist ein spezifischer Antagonist des CXCL12-Rezeptors CXCR4 [50]. Auf Transwell[®]-Membranen kultivierte LSEC wurden mit AMD3100 für 1 h in der unteren Transwell[®]-Kammer behandelt, bevor eine Inkubation mit CXCL12 von der unteren Kammer und anschließend die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen erfolgten.

Die Behandlung von LSEC mit AMD3100 vor der Chemokininkubation führte zu einer signifikanten Reduktion der CXCL12-vermittelten CD4⁺ T-Zell Transmigration (Abb. 15A).

Es sollte analysiert werden, ob die Reduktion der Transmigration durch eine verminderte Vitalität der LSEC-Monolayer verursacht wurde. Dafür wurden LSEC zunächst mit AMD3100 inkubiert und anschließend wie in Abbildung 14 beschrieben die Fluoreszenzintensität von AFC als Maß für die Caspaseaktivität gemessen. Durch die Behandlung mit AMD3100 wurde keine gesteigerte Caspaseaktivität im Vergleich zu unbehandelten LSEC festgestellt (Abb. 15B).

Ob AMD3100 auch chemokinunabhängig die Mobilität von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC beeinflusst, wurde mittels Messung der Spontanmigration durch AMD3100-vorinkubierte LSEC bestimmt. Diese war gegenüber der Spontanmigration über unbehandelte LSEC nicht verändert (Abb. 15C). Die Blockade von endothelialem CXCR4 mit AMD3100 verringerte somit die CXCL12-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch den LSEC-Monolayer ohne eine Schädigung von LSEC oder CD4⁺ T-Zellen zu bewirken.

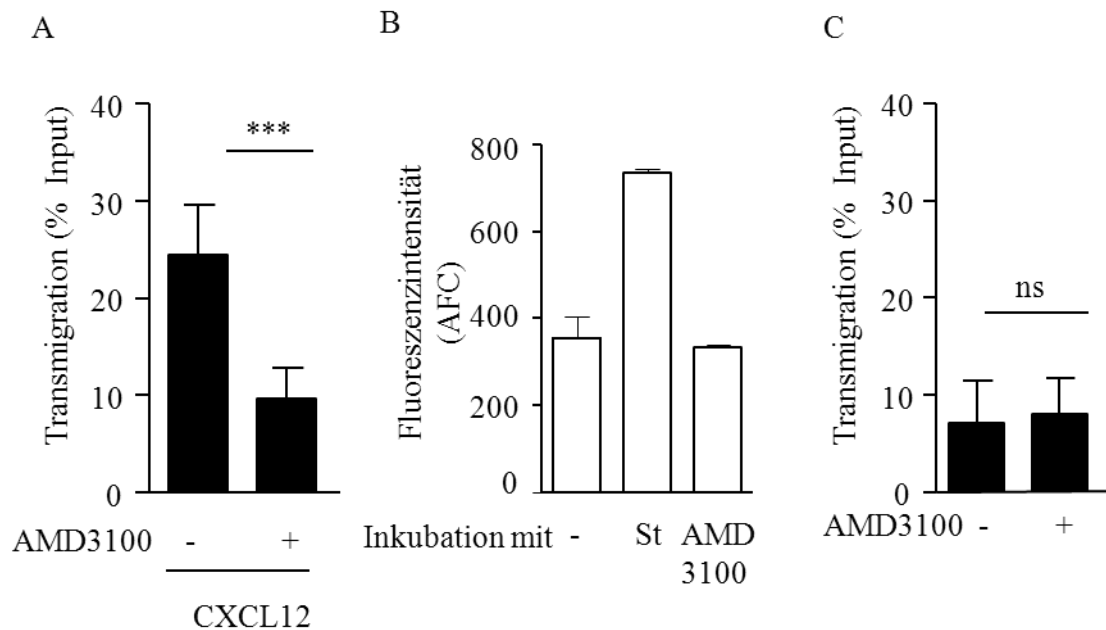


Abb. 15: Einfluss von CXCR4 auf die CXCL12-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer. (A) Auf Transwell[®]-Membranen kultivierte LSEC wurden für 1 h bei 37°C in der unteren Transwell[®]-Kammer mit AMD3100 behandelt, gewaschen und anschließend für 120 min bei 37°C mit CXCL12 von der unteren Transwell[®]-Kammer vorinkubiert. Nach ausführlichem Waschen wurde die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen über behandelte und unbehandelte LSEC wie in Abb. 9 beschrieben quantifiziert. Die Abbildung zeigt MW ± SD der Transmigrationsraten von CD4⁺ T-Zellen als % des *Input* von 4 unabhängigen Experimenten mit *** = $p < 0,001$. (B) LSEC wurden auf 96-Well-Platten kultiviert und mit AMD3100 für 1 h bei 37°C behandelt. Nach Waschen des *Monolayer* wurde Caspase-3/7-Substrat auf die Zellen gegeben. Die Fluoreszenzintensität des bei Caspaseaktivität frei werdenden AFC wurde am Spektrofluorometer über 2 h gemessen. Dargestellt ist die AFC-Fluoreszenzintensität von behandelten und unbehandelten LSEC in MW ± SD von 2 unabhängigen Experimenten. (C) Auf Transwell[®]-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-Monolayer wurden mit AMD3100 für 1 h von der unteren Transwell[®]-Kammer inkubiert und gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von CD4⁺ T-Zellen in die obere Transwell[®]-Kammer. Nach 90 min wurde die Transmigrationsrate wie in Abb. 9 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Transmigrationsraten von CD4⁺ T-Zellen als % des *Input* ohne und nach Inkubation mit AMD3100 als MW ± SD von 4 unabhängigen Experimenten mit ns = nicht signifikant.

3.5.2. CXCR3

Um die Rolle von CXCR3 bei der CXCL9-vermittelten CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC zu untersuchen, wurden LSEC aus Mäusen isoliert, die den CXCR3-Rezeptor nicht exprimieren (CXCR3^{-/-}). In Transmigrationsassays wurde analysiert, ob der fehlende CXCR3-Rezeptor auf LSEC eine Auswirkung auf die CXCL9-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch den LSEC-Monolayer hat. LSEC wurden aus CXCR3^{-/-} und Wildtyp (WT)-Mäusen isoliert und auf Transwell[®]-Membranen kultiviert. Zunächst wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Endothelien chemokinunabhängig die Transmigration beeinflussen. Die Spontanmigration über beide Endothelien zeigte jedoch keinen Unterschied (Abb. 16A). Um die chemokinabhängige Transmigration zu beurteilen, wurden die LSEC-Monolayer auf den Transwell[®]-Filtereinsätzen mit CXCL9 von der unteren Kammer vorinkubiert und anschließend

die Transmigration von Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der $CD4^+$ T-Zell-Transmigration durch $CXCR3^{-/-}$ -LSEC (Abb. 16A). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Transmigrationsrate durch $CXCR3^{-/-}$ LSEC und WT-LSEC konnte nicht festgestellt werden.

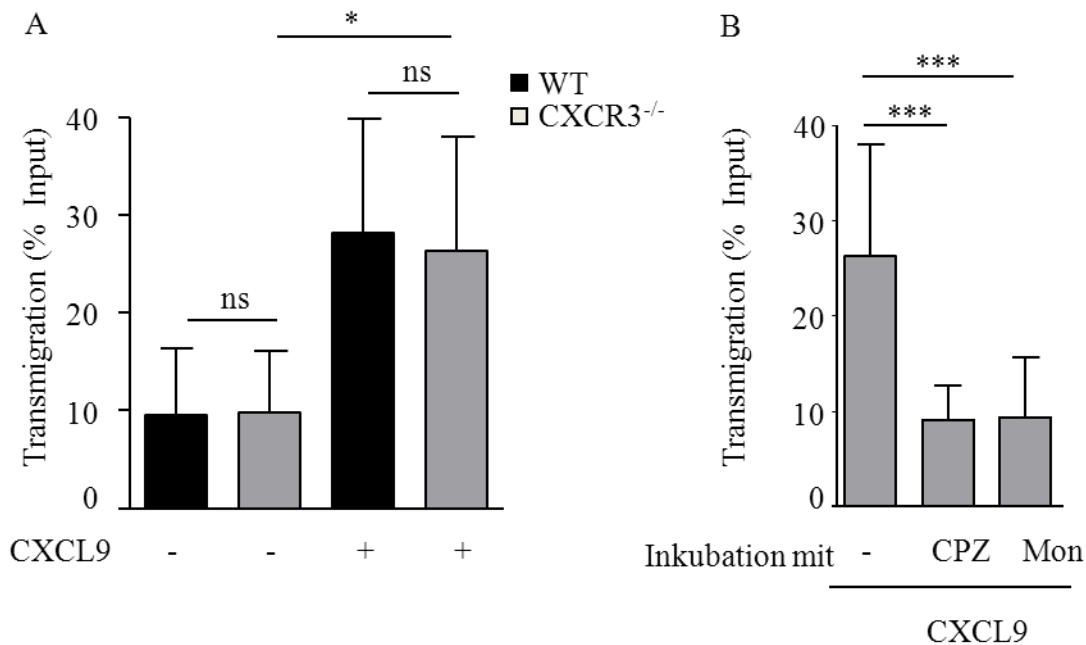


Abb. 16: CXCL9-vermittelte Transmigration von Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen durch $CXCR3^{-/-}$ und WT LSEC-Monolayer. (A) Auf Transwell®-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-Monolayer aus WT-Mäusen und $CXCR3^{-/-}$ -Mäusen wurden wie in Abb. 10 beschrieben mit CXCL9 vorinkubiert und anschließend die Transmigrationsrate von Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen bestimmt. (B) LSEC-Monolayer aus $CXCR3^{-/-}$ Mäusen wurden auf Transwell®-Filtereinsätzen wie in Abb. 12 beschrieben zunächst mit Mon bzw. CPZ und dann mit CXCL9 inkubiert. Anschließend wurde die Transmigrationsrate von Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Transmigrationsraten von Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen als % des *Input*. Die Abbildungen zeigen MW \pm SD der Transmigrationsraten von je 3 unabhängigen Experimenten mit * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant.

Es sollte nun analysiert werden, ob in $CXCR3^{-/-}$ -LSEC Clathrine eine Rolle bei der chemokinabhängigen Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen spielen. Dazu wurden auf Transwell®-Membranen kultivierte $CXCR3^{-/-}$ -LSEC mit Mon oder CPZ vorbehandelt und Transmigrationsversuche durchgeführt. Die CXCL9-abhängige Transmigration von Effektor/Memory $CD4^+$ T-Zellen durch $CXCR3^{-/-}$ -LSEC war nach Vorinkubation der $CXCR3^{-/-}$ -LSEC mit CPZ bzw. Mon signifikant reduziert (Abb. 16B).

Es wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von CXCR3 auf LSEC keinen Einfluss auf die chemokinunabhängige oder CXCL9-vermittelte Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen hatte. Allerdings bewirkte wie auch in WT-LSEC die Blockade von Clathrin-abhängigen Transportwegen eine Reduktion der chemokinabhängigen Transmigration.

3.6. Rolle von Glykosaminoglykanen bei der CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer

Durch die Immobilisierung von Chemokinen an Glykosaminoglykanen (GAG) auf der Endothelzelloberfläche kann die Wirksamkeit von Chemokinen moduliert werden [65]. Es sollte untersucht werden, ob eine Interaktion von Chemokinen mit GAG auch bei der CXCL12- und CXCL9-vermittelten Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC eine Rolle spielt. Hierfür wurden Transmigrationsassays durchgeführt und die Transmigrationsrate von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-Monolayer nach Inkubation des LSEC-Monolayers mit Heparinase I (Hep), Chondroitinase ABC (Cho) oder Natriumchlorat (NaClO₃) gemessen. Die Enzyme Hep und Cho spalten sulfatierte Disacharideinheiten der GAG ab und NaClO₃ bewirkt die Synthese von desulfatierten GAG [43, 45, 46].

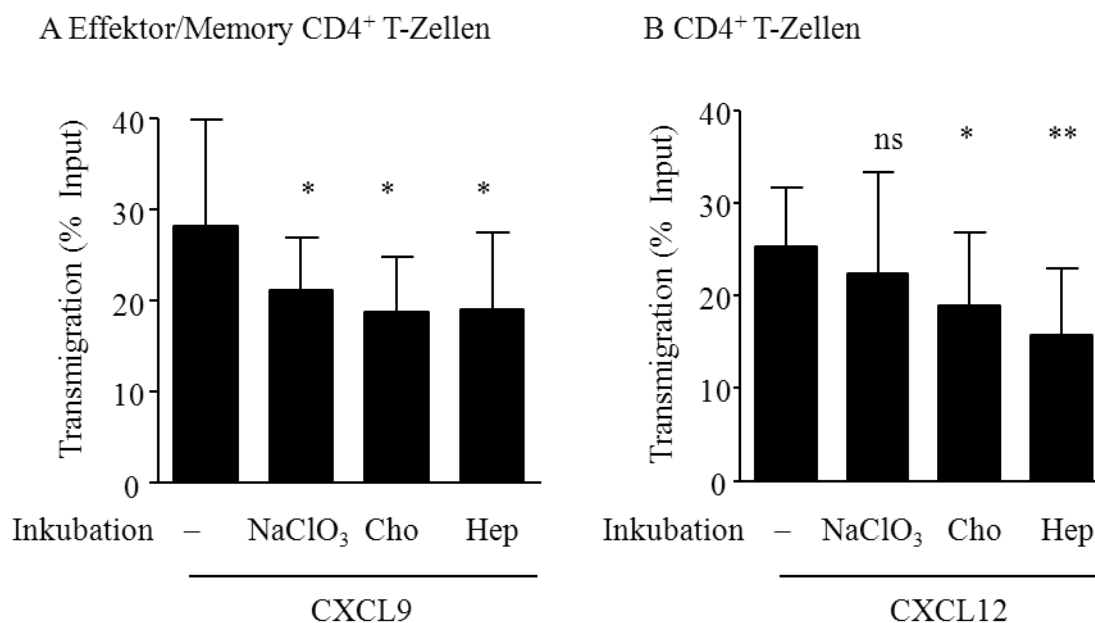


Abb. 17: Einfluss von GAG auf die chemokinabhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-Monolayer. Auf Transwell®-Filtereinsätzen kultivierte LSEC-Monolayer wurden mit NaClO₃ für 4 h in der oberen Transwell®-Kammer, Cho für 1 h oder Hep für 2 h von der oberen und unteren Transwell®-Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte nach ausführlichem Waschen die Inkubation mit CXCL12 oder CXCL9 für 120 min von der unteren Transwell®-Kammer. Der LSEC-Monolayer wurde gewaschen und CD4⁺ T-Zellen wurden in die obere Transwell®-Kammer gegeben. Nach 90 min wurde die Transmigrationsrate wie in Abb. 10 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Transmigrationsraten von (A) Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen nach CXCL9-Vorinkubation bzw. (B) CD4⁺ T-Zellen nach CXCL12-Vorinkubation ohne und nach NaClO₃-, Cho- oder Hep-Vorbehandlung als % des Input. Die Abbildung zeigt MW ± SD der Transmigrationsraten von jeweils 4 unabhängigen Experimenten mit ns = nicht signifikant, * = p < 0,05 und ** = p < 0,01.

Durch die reduzierte Anzahl von Sulfatseitenketten verringert sich die Anzahl potentieller Bindungsstellen von Chemokin und GAG [66, 65]. Auf Transwell[®]-Membranen kultivierte LSEC-*Monolayer* wurden vor der Analyse der Transmigration mit den Enzymen bzw. NaClO₃ und anschließend mit CXCL12 bzw. CXCL9 behandelt. Durch die Inkubation der LSEC-*Monolayer* mit Hep und Cho wurden sowohl die CXCL9-vermittelte als auch die CXCL12-vermittelte CD4⁺ T-Zell-Transmigration signifikant verringert (Abb. 17). Die CXCL9-vermittelte Transmigration verringerte sich nach Inkubation mit NaClO₃ signifikant, während die CXCL12-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration nicht verändert war.

Eine mögliche zellschädigende Wirkung der Agenzien auf die LSEC wurde durch Messung der Apoptoserate in LSEC nach Vorbehandlung bestimmt. Nach Behandlung der LSEC mit Hep, Cho oder NaClO₃ zeigte sich jedoch keine Steigerung der Caspaseaktivität im Vergleich zu unbehandelten LSEC (Abb. 18A). Die Funktionalität der LSEC nach Behandlung mit den Substanzen wurde im AcLDL-Assay untersucht. Hierfür wurden auf Zellkulturplatten kultivierte LSEC wie bereits beschrieben mit Hep, Cho oder NaClO₃ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von AcLDL-FITC und die Bestimmung des prozentualen Anteils von AcLDL-FITC-positiven LSEC am Durchflusszytometer. 72 ± 2 % der LSEC waren nach Inkubation mit Hep AcLDL-FITC positiv, 70 ± 8 % nach Inkubation mit Cho und 74 ± 3 % nach Inkubation mit NaClO₃ (Abb. 18B). Damit ergab sich keine signifikante Änderung der AcLDL-FITC Aufnahme im Vergleich zu unbehandelten LSEC.

Um zu testen, ob die Substanzen einen chemokinunabhängigen Effekt auf die CD4⁺ T-Zell-Transmigration haben, wurde die Spontanmigration von CD4⁺ T-Zellen über behandelte und unbehandelte LSEC verglichen. Es wurde kein Effekt der Substanzen auf die chemokinunabhängige Transmigration festgestellt (Abb. 18C).

Die Störung der GAG-Sulfatierung führte somit zu einer deutlichen Verringerung der chemokinabhängigen Transmigration durch LSEC-*Monolayer*. Chemokinunabhängige Effekte auf die T-Zellen, eine gesteigerte Apoptoserate oder Einschränkungen der Endozytosekapazität wurden nicht beobachtet.

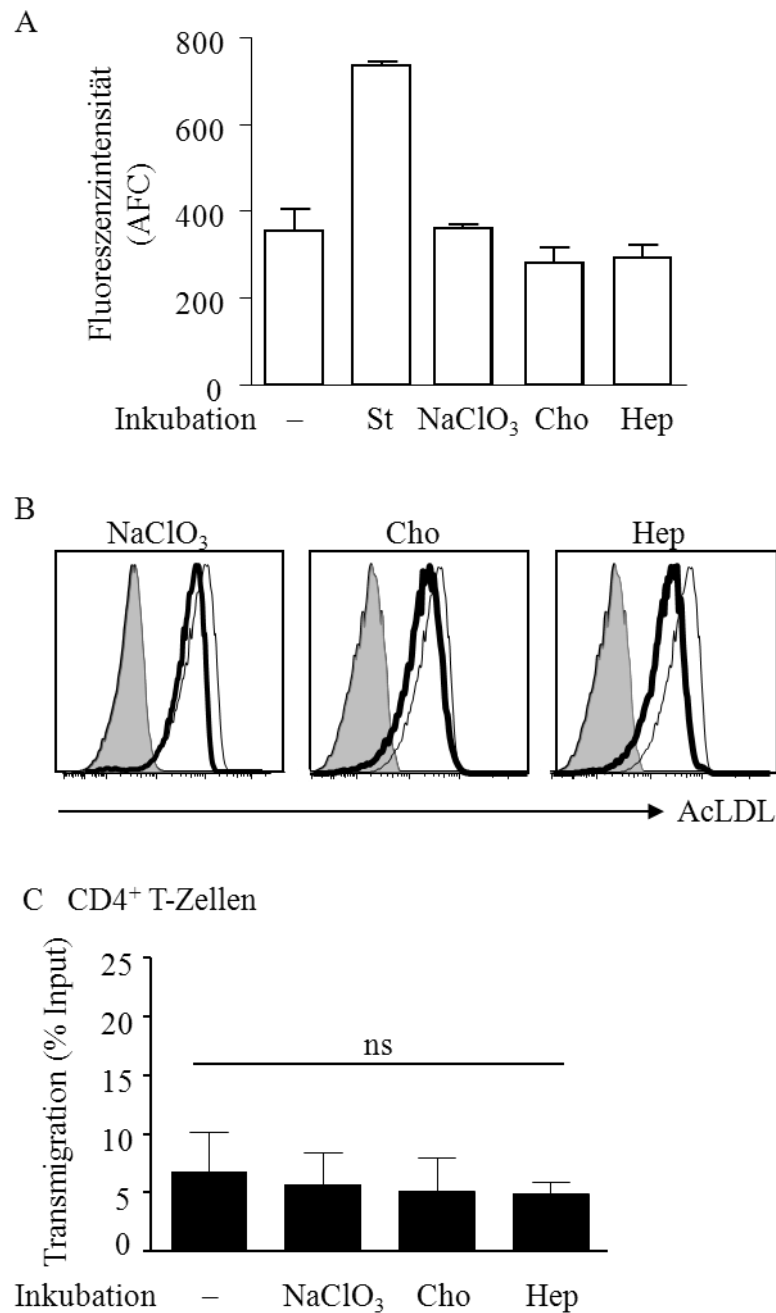


Abb. 18: Wirkung von Hep, Cho und NaClO₃ auf die Induktion von Apoptose sowie Funktionalität der LSEC und CD4⁺ T-Zellen. (A) *Ex vivo* isolierte LSEC wurden über Nacht in 96-Well-Platten kultiviert und dann mit St für 4 h, Hep für 2 h, Cho für 1 h oder NaClO₃ für 4 h bei 37°C inkubiert. Ein Apoptose-Assay wurde wie in Abb. 14A beschrieben durchgeführt. Die MW ± SD der AFC-Fluoreszenzaktivität von 2 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. (B) LSEC-Monolayer wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und mit Hep, Cho oder NaClO₃ wie unter A) beschrieben inkubiert. Nach Waschen des Monolayer erfolgte die Inkubation mit AcLDL-FITC für 2 h bei 37°C. Der Endothel-Monolayer wurde mit Accutase abgelöst und am Durchflusszytometer analysiert. Die AcLDL-FITC-Aufnahme unbehandelter LSEC wurde mit der Aufnahme vorbehandelter LSEC verglichen. Die Anzahl AcLDL-FITC positiver Zellen ist im Histogramm dargestellt. Die Histogramme stehen repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. Dargestellt sind LSEC nach AcLDL Inkubation (schmale Linie), nach AcLDL- und NaClO₃/Hep/Cho-Inkubation (verstärkte Linie) sowie unbehandelte LSEC (grau schraffierte Fläche). (C) LSEC wurden auf Transwell®-Filtereinsätzen über Nacht kultiviert und mit Hep, Cho oder NaClO₃ wie in Abb. 17 beschrieben von der unteren bzw. oberen Kammer behandelt. Nach Waschen der Endothelzellen wurde die Transmigrationsrate von CD4⁺ T-Zellen über behandelte und unbehandelte LSEC-Monolayer im Transmigrationsassay wie in Abb. 10 beschrieben quantifiziert. Die Abbildung zeigt MW ± SD von 3 unabhängigen Experimenten mit ns = nicht signifikant.

4. Diskussion

Bei Immunreaktionen in der Leber etwa bei der Immunüberwachung im gesunden Gewebe, der Entstehung oraler Toleranz, der Immunantwort auf Pathogene oder bei überschießenden Reaktionen im Rahmen von Autoimmunhepatitiden ist die chemokinvermittelte Rekrutierung von T-Zellen ein entscheidender Bestandteil [67]. Ein Großteil der Lymphozytenextravation findet in den Lebersinusoiden statt, wo $CD4^+$ T-Zellen das Lebersinusendothel passieren müssen, um in das angrenzende Leberparenchym zu gelangen [19].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie LSEC durch Interaktion mit den Chemokinen CXCL12, CXCL9 und CXCL10 die $CD4^+$ T-Zell-Transmigration modulieren. Als Schwerpunkt wurde geprüft, ob die Bereitstellung von Chemokinen durch LSEC nach dem Modell der Chemokintranszytose erfolgt.

4.1. Modulation der Chemokinwirkung durch LSEC

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte chemotaktische Wirkung von CXCL12 auf die Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC gezeigt werden. LSEC verstärkten im Vergleich zum endothelfreiem System vor allem die Wirkung sehr geringer Chemokinkonzentrationen auf die Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen. Dies deutet auf eine lokale Anreicherung der Chemokine an der Endotheloberfläche hin [68].

Die Chemotaxis von T-Zellen war von der Stärke des Chemokingradienten abhängig und zeigte einen typischen glockenförmigen Verlauf [69]. Eine Abnahme der Transmigration bei hohen Chemokinkonzentrationen kann einerseits durch die Desensibilisierung von Chemokinrezeptoren auf den T-Zellen und andererseits durch eine chemorepulsive Wirkung bedingt sein [70, 71].

Eine erhöhte chemotaktische Wirkung von CXCL12 trat auch auf, wenn LSEC mit dem Chemokin basolateral vorinkubiert und anschließend ausführlich gespült wurden, bevor die Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen erfolgte. Diese Daten weisen darauf hin, dass LSEC Chemokine mittels Transzytose zur Verfügung stellen und dadurch eine verstärkte chemokinabhängige Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen bewirken. Während auch die basolaterale Vorinkubation der LSEC mit CXCL9 eine deutliche Steigerung der $CD4^+$ T-Zell-Transmigration bewirkte, wurde die Wirkung von CXCL10 durch LSEC nicht zusätzlich verstärkt. Dabei zeigte CXCL10 im Vergleich zu CXCL9 im endothelfreien System eine signifikant höhere chemotaktische Wirkung. Eine solche Abstufung der chemotaktischen Wirkung zwischen den einzelnen CXCR3-Liganden CXCL10, CXCL9 und CXCL11 ist für T-Lymphozyten auch in anderen Publikationen gezeigt worden: Dort bewirkte CXCL10 bei einer

Konzentration von 0,1 µg/ml eine deutlich stärkere Chemotaxis von T-Lymphozyten über Transwell[®]-Membranen als CXCL9 bei gleicher Konzentration [72].

Hinweise auf eine spezifische Interaktion zwischen LSEC und CXCL10 ergeben sich aus einer Arbeit, die zeigt, dass CXCL10 nach basaler Inkubation in LSEC internalisiert wird [73]. In weiteren Projekten könnte näher untersucht werden, welche Mechanismen dazu führen, dass diese Internalisierung keine Verstärkung der Chemotaxis bewirkt. Möglicherweise führt die bereits hohe chemotaktische Wirkung von CXCL10 dazu, dass durch die Präsentation von CXCL10 an der Endotheloberfläche keine weitere Transmigrationssteigerung messbar ist. Es ist zu berücksichtigen, dass die Sekretion von CXCR3-Liganden vor allem in entzündeten Geweben beschrieben ist und zur Rekrutierung pro-inflammatorischer CD4⁺ T-Zellen führt [31]. In den durchgeführten Transmigrationsassays wurde stets unstimuliertes Lebersinusendothel verwendet. Ob LSEC nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen eine andere Wirkung auf die CXCL10-abhängige oder CXCL9-abhängige Transmigration haben, ist gegenwärtig unklar.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit können LSEC die Chemokinwirkung modulieren, indem sie CXCL12, CXCL9 und CXCL10 zur Verfügung stellen und die chemotaktische Wirkung von CXCL12 und CXCL9 sogar verstärken. Chemokine mit hoher chemotaktischer Wirkung wie CXCL10 werden auch von LSEC an CD4⁺ T-Zellen zur Verfügung gestellt, die Endothelzellen erhöhen die Wirkung des Chemokins jedoch nicht mehr. Eine Regulation der Chemokine CXCL12, CXCL9 und CXCL10 durch LSEC könnte notwendig sein, da die Chemokine von unterschiedlichen Zelltypen im Leberparenchym sezerniert werden und bei verschiedenen hepatischen Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen [74]. Die Chemokin-modulierende Funktion von Endothelien ist bekannt. So regulieren HEV den Eintritt von gewebespezifischen Lymphozyten in den Lymphknoten indem sie Chemokine aus den entsprechenden Geweben, die über den Blutstrom in den Lymphknoten gelangt sind, auf ihrer Endotheloberfläche präsentieren [75, 76]. Dabei spielen die basale Aufnahme und apikale Präsentation der Chemokine durch die Endothelzellen, d.h. die Transzytose als Mechanismus eine Rolle [76].

4.2. Chemokintransport in Vesikeln

Da LSEC eine Verstärkung der Transmigration von CD4⁺ T-Zellen nach basolateraler Vorinkubation mit CXCL12 und CXCL9 bewirkten, wurde die Transzytose von Chemokinen und damit auch die Internalisierung der Chemokine postuliert. Eine apikale Internalisierung der Chemokine führte nicht zur verstärkten Transmigration und wurde daher in dieser Arbeit nicht weiter untersucht [39].

Chemokininternalisierung und -transport sind für CXCL8, CCL19, CXCL10 und CCL2 beschrieben und erfolgen in Clathrin-ummantelten Vesikeln oder Caveolae [77, 38, 78, 79]. Bei der Endozytose in Clathrin-ummantelte Vesikel binden membranintegrierte Proteine an zytosolische Adaptoren, die eine Verbindung mit dem Clathrin-Gitter herstellen. Zusätzliche Adaptorproteine wie Dynamin vermitteln die Bindung an Aktinfilamente, den Transport und die Fusion mit der gegenüberliegenden Membran [64]. Caveolae sind Cholesterol-reiche Vesikel, die mit dem Hüllprotein Caveolin überzogen sind und den konstitutiven, bidirektionalen Transport vermitteln [60]. In dieser Arbeit hatte die Inkubation der LSEC mit den polyenen Antimykotika Nyst und Fili keine Auswirkung auf die Transmigration der CD4⁺ T-Zellen. Da Fili und Nyst selektive Inhibitoren von Caveolae sind, wurde eine Beteiligung dieser Vesikel an einer Chemokin-Internalisierung und Transzytose in LSEC ausgeschlossen [48, 61, 47].

Auch die Behandlung von LSEC mit Bref A und Cyt B hatten keinen Effekt auf die Transmigration durch das Lebersinusendothel. Cyt B und Bref A inhibieren die Vesikel-abhängige Endozytose unspezifisch durch Zerlegung von Aktin-Filamenten [80]. Dabei können sowohl der Clathrin- als auch der Caveolae-vermittelte Transport gestört werden [47]. Auf Grund der unspezifischen Wirkweise von Bref A und Cyt B ist ein Rückschluss auf zugrunde liegende Mechanismen schwierig. Allerdings könnte die fehlende Wirkung der Inhibitoren ein Hinweis darauf sein, dass endogene Chemokine in LSEC bei der Verstärkung der CXCL9- und CXCL12-Wirkung keine Rolle spielen, da eine Hemmung der endogenen Chemokinfreisetzung nach Inkubation von Endothelzellkulturen der Nabelschnur (HUVEC) mit Bref A beschrieben ist [81].

Nach Behandlung der LSEC mit CPZ und Mon war eine deutliche Reduktion der CD4⁺ T-Zell Transmigration beobachtbar. CPZ stört die Bindung von Clathrin an den AP2-Adaptor-Komplex, der für die Bildung des Clathrin-Gerüsts essentiell ist. Diese Wirkung wird als sehr spezifisch für Clathrine beschrieben [47]. Mon blockiert das Clathrin-abhängige Recycling von Proteinen über den Golgi-Apparat durch Veränderung des pH-Wertes in den Vesikeln [62]. Da beide Inhibitoren der Clathrin-vermittelten Endozytose, die jeweils einen anderen Teil des Clathrin-Pathways hemmen, eine Wirkung auf die Transmigration durch LSEC zeigten, wurde geschlussfolgert, dass die Aufnahme der Chemokine in Clathrin-Vesikel eine Rolle bei der Interaktion von Chemokinen und LSEC spielt.

Da CPZ die Mobilität von Lymphozyten bei der Migration durch Polycarbonatfilter verringert, wurde in der vorliegenden Arbeit stets der direkte Kontakt von CPZ und Lymphozyten durch Vorinkubation des Endothels vermieden [82]. Wie auch in der Literatur beschrieben, zeigten die durchgeführte Kontrollexperimente keine Beeinträchtigung der Vitalität der LSEC oder

Mobilität der CD4⁺ T-Zellen nach CPZ-Inkubation [83]. Die Spezifität der Wirkung auf den Clathrin-Pathway in LSEC konnte durch Messung der AcLDL-FITC Aufnahme belegt werden, die über Clathrin-abhängige Mechanismen erfolgt [52].

Die Internalisierung der Chemokine in Clathrin-Vesikel der LSEC scheint somit eine Voraussetzung für die CXCL12- und CXCL9-abhängige Transmigration zu sein, während Caveolae keine Rolle spielen. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Arbeiten überein, die in der konfokalen Mikroskopie eine Kolo-kalisation von fluoreszenzmarkiertem CXCL12 mit Clathrin-ummantelten Vesikeln nach Chemokinvorinkubation zeigten. Diese Kolo-kalisation war nach Inkubation von LSEC mit Nyst und Fili unverändert, während nach Behandlung mit CPZ kein internalisiertes CXCL12 in LSEC mehr nachweisbar war [73]. Die Aufnahme von CXCL12 in Clathrin-Vesikeln ist auch in Endothelzellen im Knochenmark beschrieben und führt zu einer Transzytose des Chemokins von der luminalen zur abluminalen Seite [84]. Eine entsprechende Visualisierung einer CXCL9-Internalisierung in LSEC ist bisher nicht erfolgt.

4.3. Chemokintransport mittels Rezeptoren

Endothelien können die lokale Chemokinbereitstellung und -aktivität durch Bindung der Chemokine an Chemokinrezeptoren oder GAG modulieren [27, 36]. Bei niedrigen Chemokinkonzentrationen steht auf Grund der starken Bindungsaffinität eher die Chemokin-Rezeptor-Interaktion im Vordergrund [85]. Eine CXCL12-Rezeptor-Interaktion könnte also ein wesentlicher Mechanismus sein, mit dem LSEC die CXCL12-Wirkung verstärken. Andere Arbeiten zeigten, dass die Behandlung der LSEC mit Pertussistoxin, welches die Signalkaskade von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren unterbricht, keinen Einfluss auf die CXCL12- oder CXCL9-vermittelte CD4⁺ T-Zell-Transmigration hat [86]. Sollten die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 am Transport ihrer entsprechenden Chemokinliganden beteiligt sein, läge somit eine vom Chemokinrezeptor-*Signaling* unabhängige Bindung vor, welche jedoch für endotheliales CXCR4 und CXCR3 bereits beschrieben ist [84, 87].

Die Behandlung von LSEC mit dem spezifischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 reduzierte die CXCL12-abhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-*Monolayer* signifikant, was darauf hinweist, dass CXCR4 an der Transzytose seines Liganden durch LSEC beteiligt ist. Der beobachtete Effekt auf die Transmigrationsrate könnte auf eine verringerte CXCL12-Aufnahme in LSEC zurückzuführen sein. Diese Beobachtungen werden durch andere Arbeiten unterstützt, die zeigen, dass LSEC CXCL12 internalisieren und die Aufnahme durch vorherige Inkubation mit AMD3100 inhibiert wird [73]. Die Funktion von CXCR4 als Transport-Rezeptor,

der die Aufnahme und die Transzytose von CXCL12 in Clathrin-Vesikeln von der luminalen zur abluminalen Seite vermittelt, wurde für Endothelzellen im Knochenmark sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben [84]. Die Endothelzellen sezernierten das luminal aufgenommene Chemokin in voller Funktionalität auf der abluminalen Seite. Die Fähigkeit zur Chemokintranszytose und Sekretion war auf die Endothelzellen begrenzt. Zirkulierende hämatopoetische Stammzellen internalisierten CXCL12 zwar über CXCR4, konnten dies jedoch nicht wieder sezernieren. CXCR4 scheint somit vor allem in spezialisierten Endothelzellen als Transport-Rezeptor für CXCL12 zu fungieren.

Die Rolle von endothelialelem CXCR3 bei der CXCL9-vermittelten Transmigration wurde mittels LSEC untersucht, die den CXCR3-Rezeptor nicht exprimieren. Die CXCL9-vermittelte Transmigration von Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen durch CXCR3^{-/-}-LSEC unterschied sich nicht von der Transmigration durch WT-LSEC. Die Expression von CXCR3 in den Endothelzellen ist somit keine Voraussetzung für die Steigerung der CXCL9-vermittelten Transmigration durch LSEC. Die Behandlung der CXCR3^{-/-}-LSEC mit den Clathrin-Inhibitoren Mon und CPZ reduzierte jedoch die CXCL9-vermittelte Transmigration signifikant. Es scheint somit auch in CXCR3^{-/-}-LSEC eine Clathrin-abhängige Internalisierung von CXCL9 stattzufinden, die vermutlich von einem alternativen Rezeptor vermittelt wird. Dabei könnte es sich um einen alternativen CXCL9-spezifischen Rezeptor handeln, der sich in CXCR3^{-/-}-Mäusen kompensatorisch entwickelt hat oder um einen gänzlich anderen, bisher unbekanntem Chemokinrezeptor. Die Vermutung, dass in CXCR3^{-/-}-Mäusen ein alternativer Rezeptor existiert, der die chemotaktische Wirkung von CXCL9 und CXCL10 vermittelt, ist unter anderem aus widersprüchlichen Ergebnissen von *in vivo* Untersuchungen mit CXCR3^{-/-}-Mäusen entstanden. In Versuchstieren mit Hepatitis durch den hepatotropen Parasiten *Leishmania donovani*, das Cytomegalievirus oder das lymphozytäre Choriomeningitis-Virus zeigte sich eine teilweise zwar verzögerte, jedoch gleichwertige Rekrutierung von T-Zellen und kein Unterschied in der Überlebensrate zwischen CXCR3^{-/-}- und WT-Mäusen [88-90]. Für einen alternative Rezeptor spricht auch, dass CXCR3 im Gegensatz zu CXCR4 bei Expressionsanalysen in murinem Lebergewebe und auf LSEC nur in geringen Mengen detektiert wurde [33, 91, 73]. Als alternativer Rezeptor ist kürzlich CXCR3b postuliert worden [92]. Eine andere Arbeit zeigte, dass die angiostatische Wirkung von CXCL10 durch einen Rezeptor vermittelt wird, der weder CXCR3 noch CXCR3b ist [93].

Auch atypische Chemokinrezeptoren könnten die Aufnahme von CXCL9 in LSEC vermitteln. Diese G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren lösen auf Grund des fehlenden DRYLAIV-Motivs in der zweiten intrazellulären Schleife keine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade

aus. Bisher sind die atypischen Rezeptoren DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines*), D6, CXCR7, CCLR1 und CCLR2 bekannt, die jeweils eine große Vielfalt an Liganden binden und eine Rolle beim Abbau und der Homöostase von Chemokinen spielen [94]. In der Leber kommt den atypischen Chemokinrezeptoren im Zusammenspiel von Chemokin und Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung einer überschießenden Entzündungsreaktion zu. Beispielsweise zeigten Patienten mit chronischer Hepatitis C eine stärkere Entzündungsaktivität, wenn sie eine nicht funktionierende allelische Variante von D6 exprimierten [95]. Im Mausmodell ist ein toxischer Leberschaden in Mäusen ohne D6-Expression deutlich stärker [96]. Für DARC ist die Fähigkeit zum unidirektionalen spezifischen Chemokintransport in endothelialen Barrieren von abluminal nach luminal und die Verstärkung der promigratorischen Chemokinwirkung durch Platzierung an Mikrovilli von Endothelzellen beschrieben [97]. Bisher ist eine Interaktion von CXCL9 mit atypischen Chemokinrezeptoren nicht bekannt [96, 98]. Weiterführende Analysen, ob eine solche Interaktion in LSEC eine Rolle spielt, könnten hierüber Aufschluss geben.

Alternativ könnten auch Endozytoserezeptoren auf LSEC wie etwa Stabilin-1/2 der Chemokininternalisierung dienen [99]. Stabilin-1 ist bei der Aufnahme von AcLDL in LSEC involviert und benutzt den *Clathrin-Pathway*. Die Expression auf LSEC und eine Rolle bei der Transmigration von CD4⁺ T-Zellen ist nachgewiesen [100].

4.4 Chemokinimmobilisierung mittels Glykosaminoglykanen

Die Rolle der GAG Heparansulfat und Chondroitinsulfat bei der CXCL12- und CXCL9-vermittelten Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC wurde in dieser Arbeit mittels der Behandlung der LSEC mit den Enzymen Hep und Cho sowie NaClO₃ untersucht. Die Behandlung mit NaClO₃ reduzierte die CXCL9- und jedoch nicht die CXCL12-vermittelte CD4⁺ T-Zell-Transmigration durch LSEC-Monolayer. Ursächlich könnten dieser Beobachtung unterschiedliche Affinitäten der Chemokine zu GAG und Variationen in der Bindungsstärke zugrunde liegen [101].

Die Behandlung der LSEC mit den Enzymen bewirkte eine signifikante Reduktion der chemokinabhängigen CD4⁺ T-Zell-Transmigration. Dies deutet darauf hin, dass CXCL12 und CXCL9 an Heparansulfat und Chondroitinsulfat auf der LSEC-Oberfläche binden und beide GAG durch Chemokinimmobilisierung zur Transmigrationsverstärkung beitragen.

Eine Chemokinimmobilisation an Heparansulfat als transmigrationsverstärkender Mechanismus ist erstmals für CXCL8 auf dermale Endothel *in vivo* gezeigt worden: Hier wies die reduzierte

Chemokinbindung durch eine Behandlung des Endothels mit dem Enzym Heparitinase auf eine Beteiligung von GAG bei der Immobilisation an der Endothelzelloberfläche hin [38]. Die Bindung von CXCL12 an GAG wurde auf HUVEC und auf dem Synovium in rheumatoider Arthritis gezeigt, wobei das GAG-Bindungscluster nicht mit der CXCR4-Bindungsstelle überlappte [102]. Diese Bindung wurde durch NaClO₃ und das Enzym Heparitinase reduziert [103].

Der genaue Interaktionsablauf zwischen von LSEC exprimierten GAG und CXCL12 bzw. CXCL9 kann mittels der durchgeführten Untersuchungen nicht bestimmt werden. Unabhängig von der Chemokinimmobilisation an der Endothelzelloberfläche können GAG gebundenes Chemokin in die Endothelzelle internalisieren [104]. Die Beteiligung von Heparansulfat an der Chemokintranszytose konnte bisher *in vitro* anhand von Endothelzellen mit defekter Sulfatierung gezeigt werden. Diese Zellen zeigten eine verringerte Transzytose und Immobilisation des Chemokins CXCL8 [105]. In der gleichen Arbeit wurde auf Grund des defekten Heparansulfats eine verminderte Entzündungsreaktion bei Peritonitis und Kontaktdermatitis im Mausmodell beobachtet. GAG könnten dementsprechend die Aufnahme von CXCL9 und CXCL12 in LSEC von der basalen Seite vermitteln. Ein Rezeptor, welcher in LSEC an der Aufnahme von GAG-gebundenen Chemokinen beteiligt sein könnte, wäre der HARE-Rezeptor (*Hyaluronic acid receptor for endocytosis*). Er dient in den Lebersinusoiden vor allem der Entfernung von GAG-Bruchstücken, die aus anderen Organen in die Leber gelangen [106].

Aus den Daten ergeben sich neue Fragestellungen etwa inwiefern die beobachtete Reduktion der Transmigration nach Blockade der GAG auf eine apikale Bindung der Chemokine an die GAG, eine basale Bindung oder Internalisierung zurückzuführen ist.

4.5. Das Modell der Chemokintranszytose in LSEC

Um zu erklären, wie Endothelzellen Chemokine aus dem Gewebe für Leukozyten im Blutstrom bereitstellen und effektiv präsentieren, wurde das Modell der endothelialen Chemokintranszytose aufgestellt. Es beschreibt die Aufnahme, den intrazellulären Transport und die anschließende Immobilisierung von Chemokinen an der Endothelzelloberfläche. Eine Chemokintranszytose von basal nach apikal ist für CXCL10 und CCL2 im Endothel von Mikrogefäßen der Lunge und Haut sowie im Endothel der Vena saphena magna bekannt. Dieser Prozess war Rezeptorunabhängig und fand in Caveolae statt [77]. Endothelien von Mikrogefäßen im Gehirn können CCL2 mittels des entsprechenden Chemokinrezeptors CCR2 internalisieren, in Caveolae transportieren und anschließend apikal freisetzen [107]. Endothelzellen des Knochenmarks

nehmen CXCL12 mittels CXCR4 auf und vermitteln die Transzytose von luminal nach abluminal in Clathrin-Vesikeln [84]. Da chemokin- und endothelspezifisch erhebliche Unterschiede in den Transportwegen (beteiligte Vesikel, Rezeptoren) vorliegen, wurde postuliert, dass die endothelspezifische Chemokintranszytose einen Regulationsmechanismus für die organspezifische Modulation der Lymphozytenrekrutierung darstellt [77].

Die in dieser Arbeit identifizierten Mechanismen zeigen, dass die Interaktion von CXCL12 und CXCL9 mit LSEC nach dem Modell der Chemokintranszytose abläuft. Hierbei erfolgt eine Internalisierung von CXCL12 mittels des CXCR4-Rezeptors, der Transport in Clathrin-Vesikeln und die anschließende Immobilisation auf der Endothelzelloberfläche mittels Heparansulfat und Chondroitinsulfat (Abb. 19).

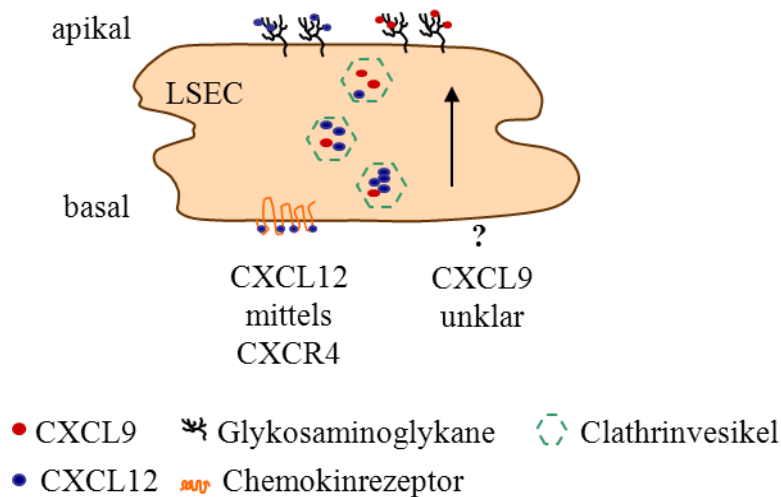


Abb. 19: Modell der Chemokintranszytose in LSEC für die Chemokine CXCL12 und CXCL9. Die Verstärkung der CXCL12-vermittelten $CD4^+$ T-Zell-Transmigration durch LSEC könnte durch die gezielte Aufnahme, den Transport und die Immobilisierung von CXCL12 an GAG an der apikalen LSEC-Seite vermittelt werden. Die Aufnahme könnte hierbei durch CXCR4, der Transport durch Clathrin-Vesikel und die Immobilisierung an Heparansulfat und Chondroitinsulfat stattfinden. Für CXCL9 ist bisher keine Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor bekannt. Die Internalisierung in Clathrin-Vesikel und die Immobilisierung an GAG spielt jedoch auch hier eine Rolle bei der Transzytose durch LSEC.

Eine Internalisierung von CXCL12 könnte jedoch auch durch GAG vermittelt sein. Bei CXCL9 ist der Clathrin-Vesikel abhängige Transport und die apikale Präsentation an GAGs Teil der Chemokintranszytose nach Internalisierung des Chemokins. Unklar bleibt die Funktion des CXCR3-Rezeptors bei diesem Prozess. Caveolae in LSEC spielen für die Interaktion der Endothelzellen mit CXCL12 und CXCL9 nach den Ergebnissen dieser Arbeit keine Rolle.

Eine Identifikation weiterer Moleküle und Bindungspartner, die bei der Chemokinaufnahme und Präsentation eine Rolle spielen, wäre ein reizvoller Gegenstand weiterer Untersuchungen. Hier wären die Fragen zu beantworten, wie der Vesikeltransport der Chemokine im Einzelnen

verläuft, ob andere Rezeptoren beim Transport von CXCL9 beteiligt sind und ob die GAG-Bindung der Chemokine an der Zelloberfläche erfolgt oder intrazellulär.

Um die Interaktion von LSEC und Chemokin zu verstehen, könnten auch neuere Erkenntnisse über die Chemokinmodulation in künftigen Untersuchungen berücksichtigt werden. Es ist bekannt, dass die Art des Chemokins, die Art der Endothelzelle, die Aktivierung der Endothelzellen durch Entzündungsmediatoren sowie der Phänotyp der transmigrierenden Zellen einen Einfluss auf die Chemokin-Endothel-Interaktion haben [108, 109, 77]. Wie die einzelnen Faktoren jedoch miteinander interagieren und sich gegenseitig beeinflussen, ist weitgehend unbekannt. Auch wie Endothelzellen die Funktion ihrer Chemokinrezeptoren steuern und entweder eine Signaltransduktion nach Bindung des Chemokins oder die Internalisierung ausgelöst wird, ist unklar.

Zudem stellt endogenes Chemokin in Endothelzellen einen Faktor dar, dessen Rolle ungeklärt ist. Während die Sekretion von CXCL12 durch LSEC nicht beschrieben ist, sezernieren LSEC bei entzündlichen Lebererkrankungen CXCL9 und CXCL10 [32]. Hier stellt sich die Frage wie die endogene Chemokinausschüttung versus exogener Chemokinaufnahme und Transzytose reguliert wird. In Endothelzellen der Bluthirnschranke existiert ein negativer Feedback-Loop für endotheliales CCL2, wenn exogenes CCL2 von basal inkubiert wird [107]. Ob ein solcher Regulationsmechanismus auch in LSEC vorliegt, ist bisher nicht untersucht.

Chemokine können eine aktive Veränderung der Endothelzellform auslösen. Die Entstehung der Endothelzellausläufer, die aktiv mit Leukozyten interagieren und die Transmigration steigern, ist von Chemokinrezeptoren sowie GAGs abhängig und mit einer aktiven Veränderung der Expression von Zytoskelettproteinen assoziiert [110]. Auch in Effektor T-Zellen wurde die Bildung von Zellfortsätzen beschrieben, die direkt mit Chemokinvesikeln unter der Endotheloberfläche interagieren. Die Lymphozyten strecken ihre Zellfortsätze vornehmlich in die Nähe dieser Chemokinvesikel, die am Aktinskelett der Zelle assoziiert sind und bilden so eine proadhesive Synapse an der Lymphozyten-Endothel-Oberfläche [81]. Dies führt zur verstärkten Adhäsion von Lymphozyten an die Endothelzellen. Ob dieser Mechanismus der Chemokin-Endothel-Interaktion auch bei LSEC eine Rolle spielt, könnte weiterführend untersucht werden.

Zusammenfassend modulieren LSEC die Wirkung von CXCL12 und CXCL9 durch eine aktive Chemokinbereitstellung. Transport und Präsentation erfolgen entsprechend dem Modell der Chemokintranszytose. Als beteiligte Moleküle konnten endotheliale Clathrin-Vesikel, GAGs sowie CXCR4 aufgezeigt werden. Bei der Vielfalt an Regulationsmechanismen ist die Chemokintranszytose in LSEC wahrscheinlich nur ein Teil der breiten Palette an Möglichkeiten,

mit denen das Lebersinusendothel die Chemokin-Wirkung modulieren kann. Die Aufklärung weiterer Zielstrukturen sowie von genauen Regulationsmechanismen wäre ein reizvoller Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

4.6. Ausblick auf therapeutische Eingriffsmöglichkeiten

CXCL12 spielt eine Rolle bei der Organisation von lymphoiden Ansammlungen im Portalfeld bei Hepatitis C, der Modulation von Fibrosierung bei PBC sowie der Tumorgenese und -ausbreitung in den Lebersinudoiden [34, 35, 111]. CXCL9 wird verstärkt in der hepatischen Entzündung, beispielsweise bei Hepatitis C exprimiert und moduliert die Th1-Infiltration [32]. Vor dem Hintergrund der Bedeutung der untersuchten Chemokine in entzündlichen und malignen Lebererkrankungen soll abschließend der Stand der therapeutischen Eingriffsmöglichkeiten in die Chemokin-Endothel-Interaktion durch Blockade von Chemokinrezeptoren, Clathrinvesikeln und GAG diskutiert werden.

Chemokin-Rezeptor-Antagonisten werden derzeit für die verschiedensten Chemokine entwickelt. Viele der Antagonisten scheitern jedoch in den Phasen der Arzneimittelprüfung, obwohl sie im Mausmodell und *in vitro* vielversprechende Wirkung zeigten [112]. Hierbei spielt bei der Verabreichung *in vivo* die unspezifische Blockade der Chemokinrezeptoren sowohl auf Endothelien und als auch auf Leukozyten sowie die Wirkung über alle Organsysteme eine Rolle. Bisher sind Maraviroc (Entry-Inhibitor für das HIV-Virus an den CCR5-Rezeptor) und Plerixafor[®] (AMD3100) zur Stammzellmobilisation bei Non Hodgkin Lymphom und Multiplem Myelom zugelassen [112]. Auch wenn der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor AMD3100 für den klinischen Gebrauch zugelassen ist, wurde in der bisherigen Verwendung kein Fokus auf hepatische Erkrankungen gerichtet. Die Anwendung bei Lebererkrankungen im Mausmodell ist bei der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) berichtet worden. Hier konnte die Infiltration von CD4⁺ T-Zellen durch die Behandlung mit AMD3100 deutlich reduziert und die Entzündung dadurch gemildert werden [113].

Für CXCR3 ist der Inhibitor AMG487 entwickelt worden, der bisher für Erkrankungen wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Sjögrens Syndrom getestet wurde, aber keine der Phase II Studien erfolgreich passiert hat [112]. Ein weiterer CXCR3-Antikörper MDX1100 befindet sich derzeit in einer Phase II Studie bei Colitis ulcerosa.

In der vorliegenden Arbeit blockierte CPZ effektiv die Transmigration der CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel. CPZ wurde bereits seit Mitte der 1950er Jahre klinisch als Neuroleptikum verwendet. Es ist beschrieben, dass die Behandlung mit CPZ zu Cholestase mit

anschließender Hepatitis führen kann [114]. Auf der anderen Seite gibt es Berichte über eine protektive Rolle von CPZ im Mausmodell bei Leberzellschädigung durch Paracetamol, bei Reperfusionsschäden von Spenderlebern und bei der Endotoxin-induzierten Leberschädigung [115, 116, 117]. Die Anwendung von CPZ bei Concanavalin A-induzierten Hepatitis im Mausmodell führte zu einer deutlichen Prävention der Leberzellschädigung [118]. Inwiefern dieser protektive Effekt auf eine Wirkung der Chemokin-LSEC-Interaktion beruht, wird derzeit untersucht [73].

In den durchgeführten Untersuchungen reduzierten auch die Enzyme Cho und Hep die CXCL12- und CXCL9-abhängige Transmigration *in vitro*. Bisher gibt es zwei Ansätze mit der GAG-Chemokin-Interaktion zu interferieren: Es sind GAG-bindende Proteine (teilweise viraler Genese) entwickelt worden, die Chemokine von der GAG-Bindung verdrängen sollen und es gibt niedermolekulare Oligosaccharide, die Chemokine binden und somit aus dem Blutstrom entfernen. Beide Ansätze sind bisher jedoch nicht zur pharmakologischen Anwendung ausgereift [119]. Die Verabreichung von Cho ist im Mausmodell *in vivo* zur Modulation nach Schädigung des Zentralen Nervensystems erfolgt [45]. Eine Untersuchung zur Auswirkung bei Lebererkrankungen ist jedoch nicht bekannt.

Diese Beispiele zeigen, dass der Eingriff in die Chemokin-Endothel-Interaktion eine Vielfalt therapeutischer Ansatzmöglichkeiten bietet, auch wenn die Komplexität der Chemokin-Rezeptor-Interaktion sowie das bisher lückenhafte Wissen über beteiligte Mechanismen bei der Chemokinwirkung und dem intrazellulären endotheliale Transport eine Herausforderung darstellen. Die genauere Beschreibung und Identifizierung von Molekülen, die die Interaktion von LSEC und Chemokinen vermitteln, könnte zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren führen. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft als Basis für neue Therapieansätze bei entzündlichen Lebererkrankungen dienen.

Literaturverzeichnis

1. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-63.
2. Fainboim, L., et al., *Cytokines and chronic liver disease*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007. **18**(1-2): p. 143-57.
3. Ge, X., et al., *Antibodies to liver sinusoidal endothelial cells modulate immune responses in liver transplantation*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(8): p. 3335-7.
4. Braet, F., et al., *Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions*. *Microsc Res Tech*, 2007. **70**(3): p. 230-42.
5. Hansen, B., et al., *Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding*. *Exp Cell Res*, 2005. **303**(1): p. 160-73.
6. Malovic, I., et al., *The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor*. *Hepatology*, 2007. **45**(6): p. 1454-61.
7. Limmer, A., et al., *Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance*. *Nat Med*, 2000. **6**(12): p. 1348-54.
8. De Creus, A., et al., *Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin*. *J Immunol*, 2005. **174**(4): p. 2037-45.
9. Tu, Z., et al., *The activation state of human intrahepatic lymphocytes*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **149**(1): p. 186-93.
10. Roland, C.R., et al., *Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium*. *Transplantation*, 1993. **55**(5): p. 1151-8.
11. Winau, F., et al., *Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses*. *Immunity*, 2007. **26**(1): p. 117-29.
12. Herkel, J., et al., *MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes*. *Hepatology*, 2003. **37**(5): p. 1079-85.
13. Knolle, P., et al., *Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge*. *J Hepatol*, 1995. **22**(2): p. 226-9.
14. Bowen, D.G., et al., *The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(5): p. 701-12.
15. Mackay, C.R., W.L. Marston, and L. Dudler, *Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation*. *J Exp Med*, 1990. **171**(3): p. 801-17.
16. del Pozo, M.A., P. Sanchez-Mateos, and F. Sanchez-Madrid, *Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment?* *Immunol Today*, 1996. **17**(3): p. 127-31.
17. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 301-14.
18. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
19. Xu, X.D., et al., *Trafficking of recirculating lymphocytes in the rat liver: rapid transmigration into the portal area and then to the hepatic lymph*. *Liver Int*, 2008. **28**(3): p. 319-30.
20. Wong, J., et al., *A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(11): p. 2782-90.

21. Bertolino, P., et al., *Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1063-71.
22. John, B. and I.N. Crispe, *Passive and active mechanisms trap activated CD8+ T cells in the liver*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5222-9.
23. Bonder, C.S., et al., *Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 153-63.
24. Lee, W.Y. and P. Kubes, *Leukocyte adhesion in the liver: distinct adhesion paradigm from other organs*. J Hepatol, 2008. **48**(3): p. 504-12.
25. Adams, D.H., et al., *Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation*. Hepatology, 1996. **24**(3): p. 533-8.
26. Hjelmstrom, P., et al., *Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1133-8.
27. Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster, *Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 970-80.
28. Dienes, H.P. and U. Drebber, *Pathology of immune-mediated liver injury*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 57-62.
29. Lohse, A.W., H.P. Dienes, and K.H. Meyer zum Buschenfelde, *Suppression of murine experimental autoimmune hepatitis by T-cell vaccination or immunosuppression*. Hepatology, 1998. **27**(6): p. 1536-43.
30. Lalor, P.F., et al., *Recruitment of lymphocytes to the human liver*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(1): p. 52-64.
31. Saiman, Y. and S.L. Friedman, *The role of chemokines in acute liver injury*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 213.
32. Butera, D., et al., *Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1175-82.
33. Mendt, M. and J.E. Cardier, *Stromal-Derived Factor-1 and Its Receptor, CXCR4, Are Constitutively Expressed by Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells: Implications for the Regulation of Hematopoietic Cell Migration to the Liver During Extramedullary Hematopoiesis*. Stem Cells Dev, 2012.
34. Borchers, A.T., et al., *Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(3): p. 309-22.
35. Heydtmann, M. and D.H. Adams, *Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection*. Hepatology, 2009. **49**(2): p. 676-88.
36. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
37. MacArthur, J.M., et al., *Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 153-64.
38. Middleton, J., et al., *Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells*. Cell, 1997. **91**(3): p. 385-95.
39. Schrage, A., et al., *Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines*. Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1262-72.
40. Hancock, W.W., et al., *Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1515-20.
41. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.

42. Schrage, A., et al., *Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **129**(4): p. 441-51.
43. Chappell, D., et al., *Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx*. *Biol Chem*, 2008. **389**(1): p. 79-82.
44. Gilat, D., et al., *Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta*. *J Immunol*, 1994. **153**(11): p. 4899-906.
45. Petit, E., et al., *Chondroitin sulfate lyases: applications in analysis and glycobiology*. *Adv Pharmacol*, 2006. **53**: p. 167-86.
46. Baeuerle, P.A. and W.B. Huttner, *Chlorate--a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **141**(2): p. 870-7.
47. Ivanov, A.I., *Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?* *Methods Mol Biol*, 2008. **440**: p. 15-33.
48. Orlandi, P.A. and P.H. Fishman, *Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains*. *J Cell Biol*, 1998. **141**(4): p. 905-15.
49. Schnitzer, J.E., et al., *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. *J Cell Biol*, 1994. **127**(5): p. 1217-32.
50. Fricker, S.P., et al., *Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(5): p. 588-96.
51. Matsumoto, K., et al., *Endocytic uptake of advanced glycation end products by mouse liver sinusoidal endothelial cells is mediated by a scavenger receptor distinct from the macrophage scavenger receptor class A*. *Biochem J*, 2000. **352 Pt 1**: p. 233-40.
52. Wang, M.D., et al., *Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(3): p. 633-45.
53. Rupinder, S.K., A.K. Gurpreet, and S. Manjeet, *Cell suicide and caspases*. *Vascul Pharmacol*, 2007. **46**(6): p. 383-93.
54. Feng, G. and N. Kaplowitz, *Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **282**(5): p. G825-34.
55. Neumann, K., et al., *Connecting liver and gut: murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4+ T cells via retinoic acid*. *Hepatology*. **55**(6): p. 1976-84.
56. Elvevold, K., B. Smedsrod, and I. Martinez, *The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(2): p. G391-400.
57. Oo, Y.H., S. Shetty, and D.H. Adams, *The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver*. *Dig Dis*. **28**(1): p. 31-44.
58. Piali, L., et al., *The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(3): p. 961-72.
59. Kerr, M.C. and R.D. Teasdale, *Defining macropinocytosis*. *Traffic*, 2009. **10**(4): p. 364-71.
60. Simionescu, M., D. Popov, and A. Sima, *Endothelial transcytosis in health and disease*. *Cell Tissue Res*, 2009. **335**(1): p. 27-40.
61. Anderson, H.A., Y. Chen, and L.C. Norkin, *Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae*. *Mol Biol Cell*, 1996. **7**(11): p. 1825-34.

62. Mollenhauer, H.H., D.J. Morre, and L.D. Rowe, *Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity*. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1031**(2): p. 225-46.
63. Belmokhtar, C.A., J. Hillion, and E. Segal-Bendirdjian, *Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. *Oncogene*, 2001. **20**(26): p. 3354-62.
64. McMahon, H.T. and E. Boucrot, *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(8): p. 517-33.
65. Kuschert, G.S., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. *Biochemistry*, 1999. **38**(39): p. 12959-68.
66. Witt, D.P. and A.D. Lander, *Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations*. *Curr Biol*, 1994. **4**(5): p. 394-400.
67. Adams, D.H., et al., *Mechanisms of immune-mediated liver injury*. *Toxicol Sci*, 2010. **115**(2): p. 307-21.
68. Hardy, L.A., et al., *Examination of MCP-1 (CCL2) partitioning and presentation during transendothelial leukocyte migration*. *Lab Invest*, 2004. **84**(1): p. 81-90.
69. Bryant, J., D.J. Ahern, and F.M. Brennan, *CXCR4 and vascular cell adhesion molecule 1 are key chemokine/adhesion receptors in the migration of cytokine-activated T cells*. *Arthritis Rheum*. **64**(7): p. 2137-46.
70. Busillo, J.M. and J.L. Benovic, *Regulation of CXCR4 signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 952-63.
71. Lee, J.Y., et al., *Dynamic alterations in chemokine gradients induce transendothelial shuttling of human T cells under physiologic shear conditions*. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(6): p. 1285-94.
72. Stanford, M.M. and T.B. Issekutz, *The relative activity of CXCR3 and CCR5 ligands in T lymphocyte migration: concordant and disparate activities in vitro and in vivo*. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(5): p. 791-9.
73. Neumann, K., *Modulation der gewebespezifischen Migration von CD4+ T-Zellen durch das Lebersinusendothel*, in *Biowissenschaften, Biologie*. 2012, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I: Berlin.
74. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. *J Exp Med*, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
75. Gretz, J.E., et al., *Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex*. *J Exp Med*, 2000. **192**(10): p. 1425-40.
76. Palframan, R.T., et al., *Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues*. *J Exp Med*, 2001. **194**(9): p. 1361-73.
77. Mordelet, E., et al., *Chemokine transport across human vascular endothelial cells*. *Endothelium*, 2007. **14**(1): p. 7-15.
78. Middleton, J., et al., *Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium*. *Blood*, 2002. **100**(12): p. 3853-60.
79. Baekkevold, E.S., et al., *The CCR7 ligand *elc* (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment*. *J Exp Med*, 2001. **193**(9): p. 1105-12.
80. Theodoropoulos, P.A., et al., *Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping*. *Biochem Pharmacol*, 1994. **47**(10): p. 1875-81.

81. Shulman, Z., et al., *Transendothelial migration of lymphocytes mediated by intraendothelial vesicle stores rather than by extracellular chemokine depots*. Nat Immunol, 2012. **13**(1): p. 67-76.
82. Grabski, R., et al., *Inhibition of T-cell invasion across cultured fibroblast monolayers by phenothiazine-related calmodulin inhibitors: impairment of lymphocyte motility by trifluoperazine and chlorpromazine, and alteration of the monolayer by pimozone*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(10): p. 1313-7.
83. Falkowska-Hansen, B., et al., *Clathrin-coated vesicles form a unique net-like structure in liver sinusoidal endothelial cells by assembling along undisrupted microtubules*. Exp Cell Res, 2007. **313**(9): p. 1745-57.
84. Dar, A., et al., *Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 1038-46.
85. Hillyer, P. and D. Male, *Expression of chemokines on the surface of different human endothelia*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(4): p. 375-82.
86. Schrage, A., *Interaktion von T-Zellen mit sinusoidalen Endothelzellen der Leber*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I*. 2006, Humboldt-Universität: Berlin.
87. Cardona, A.E., et al., *Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues*. Blood, 2008. **112**(2): p. 256-63.
88. Barbi, J., et al., *Lack of CXCR3 delays the development of hepatic inflammation but does not impair resistance to Leishmania donovani*. J Infect Dis, 2007. **195**(11): p. 1713-7.
89. Hokeness, K.L., et al., *CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1241-50.
90. Holst, P.J., et al., *CCR5 and CXCR3 are dispensable for liver infiltration, but CCR5 protects against virus-induced T-cell-mediated hepatic steatosis*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 10101-12.
91. Autschbach, F., et al., *Expression of chemokine receptors in normal and inflamed human intestine, tonsil, and liver--an immunohistochemical analysis with new monoclonal antibodies from the 8th international workshop and conference on human leucocyte differentiation antigens*. Cell Immunol, 2005. **236**(1-2): p. 110-4.
92. Lazzeri, E. and P. Romagnani, *CXCR3-binding chemokines: novel multifunctional therapeutic targets*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2005. **5**(1): p. 109-18.
93. Campanella, G.S., R.A. Colvin, and A.D. Luster, *CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12700.
94. Ulvmar, M.H., E. Hub, and A. Rot, *Atypical chemokine receptors*. Exp Cell Res, 2011. **317**(5): p. 556-68.
95. Wiederholt, T., et al., *Genetic variations of the chemokine scavenger receptor D6 are associated with liver inflammation in chronic hepatitis C*. Hum Immunol, 2008. **69**(12): p. 861-6.
96. Berres, M.L., et al., *The chemokine scavenging receptor D6 limits acute toxic liver injury in vivo*. Biol Chem, 2009. **390**(10): p. 1039-45.
97. Pruenster, M., et al., *The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 101-8.
98. Hansell, C.A., C.E. Hurson, and R.J. Nibbs, *DARC and D6: silent partners in chemokine regulation?* Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 197-206.
99. Karikoski, M., et al., *Cleaver-1/Stabilin-1 regulates lymphocyte migration within lymphatics and leukocyte entrance to sites of inflammation*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3477-87.

100. Shetty, S., et al., *Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium*. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4147-55.
101. Severin, I.C., et al., *Characterization of the chemokine CXCL11-heparin interaction suggests two different affinities for glycosaminoglycans*. J Biol Chem. **285**(23): p. 17713-24.
102. Laguri, C., F. Arenzana-Seisdedos, and H. Lortat-Jacob, *Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example*. Carbohydr Res, 2008. **343**(12): p. 2018-23.
103. Santiago, B., et al., *CXCL12 is displayed by rheumatoid endothelial cells through its basic amino-terminal motif on heparan sulfate proteoglycans*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(2): p. R43.
104. Poon, G.M. and J. Garipey, *Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 4): p. 788-93.
105. Wang, L., et al., *Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 902-10.
106. Harris, E.N., et al., *Expression, processing, and glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE)*. J Biol Chem, 2007. **282**(5): p. 2785-97.
107. Ge, S., et al., *Transcellular transport of CCL2 across brain microvascular endothelial cells*. J Neurochem, 2008. **104**(5): p. 1219-32.
108. Crola Da Silva, C., et al., *Selective human endothelial cell activation by chemokines as a guide to cell homing*. Immunology, 2009. **126**(3): p. 394-404.
109. Kieda, C., *How endothelial cell organo-specificity mediates circulating cell homing*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2003. **51**(2): p. 81-9.
110. Whittall, C., et al., *A chemokine self-presentation mechanism involving formation of endothelial surface microstructures*. J Immunol. **190**(4): p. 1725-36.
111. Szabo, G., P. Mandrekar, and A. Dolganiuc, *Innate immune response and hepatic inflammation*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(4): p. 339-50.
112. Allegretti, M., et al., *Current status of chemokine receptor inhibitors in development*. Immunol Lett, 2012. **145**(1-2): p. 68-78.
113. Boujedidi, H.e.a., *Reversion of obesity-induced liver inflammation by specific blockage of CXCL12/CXCR4 signaling in obese mice in EASL International Liver Conference*. 2012: Barcelona.
114. Moradpour, D., et al., *Chlorpromazine-induced vanishing bile duct syndrome leading to biliary cirrhosis*. Hepatology, 1994. **20**(6): p. 1437-41.
115. Saville, J.G., et al., *Inhibition of acetaminophen hepatotoxicity by chlorpromazine in fed and fasted mice*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(12): p. 2467-71.
116. Claesson, K., et al., *Chlorpromazine, quinacrine, and verapamil as donor pretreatment in liver preservation, tested in the isolated perfused rat liver*. Cryobiology, 1991. **28**(5): p. 422-7.
117. Clancy, K.D., et al., *Chlorpromazine modulates cytokine expression in the liver and lung after burn injury and endotoxemia*. J Trauma, 2000. **48**(2): p. 215-22; discussion 222-3.
118. Ikeda, K., et al., *Chlorpromazine inhibits concanavalin A-induced liver injury independently of cytokine modulation*. Immunol Lett, 1997. **55**(3): p. 127-31.
119. Handel, T.M., et al., *Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 385-410.

Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

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

Datum

Katja Wechsung

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Katja Wechsung hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Schrage A, **Wechsung K**, Neumann K, Schumann M, Schulzke JD, Engelhardt B, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K.

„Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines“, Hepatology 2008;48: 1262-72.

Beitrag im Einzelnen:

Planung, Durchführung und Auswertung von Experimenten, deren Ergebnisse in den Abbildungen 1, 7 und 8 sowie in Tabelle 1 der oben genannten Publikation dargestellt sind.

Datum

Katja Wechsung

Lebenslauf

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

Publikationen

Publikation

Schrage A, **Wechsung K**, Neumann K, Schumann M, Schulzke JD, Engelhardt B, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K.

„Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines”, Hepatology 2008; 48: 1262-72.

Posterpräsentation

„Chemokine-uptake and presentation by liver sinusoidal endothelial cells regulates T-cell transmigration into the liver“

Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Immunologie, Wien 2008

Vortrag

“Liver sinusoidal endothelial cells modulate T cell transmigration by chemokine transcytosis and presentation”

European Students Conference, Berlin, 2008

Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Katja Klugewitz, die mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und mich während der Arbeit betreute.

Dr. Nils Kruse und Dr. Katrin Neumann danke ich für die experimentelle Einarbeitung und praktische Unterstützung. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Katrin, die meine Arbeit mit Denkanstößen und geduldiger Supervision begleitet hat.

Zudem danke ich den Mitgliedern der AG Ulrike Erben und AG Britta Siegmund, die zu meiner Arbeit mit praktischen Tipps, Anleitung bei neuen Methoden und Bereitschaft zur Diskussion beigetragen haben. Den Mitgliedern der AG Alf Hamann (Deutsches Rheuma Forschungszentrum DRFZ, Berlin) danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern für die Zellisolation. Uta Höpken (Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) danke ich für die Bereitstellung der CXCR3^{-/-}-Mäuse.

Zum Abschluss gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und meinen Freunden für die fortwährende und motivierende Unterstützung während der Arbeit an meiner Promotion.