

Aus dem
Charité Centrum 10 für Magen-, Darm-, Nieren-, und Stoffwechselmedizin
Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
Direktor Prof. Dr. M. Zeitz

Habilitationsschrift

**Regionäre Immunmechanismen:
Rekrutierung und tolerogene Modulation von T-Zellen in der Leber**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Charité Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Katja Klugewitz

geboren am 13.06.1969 in Wattenscheid/ Bochum

Eingereicht am: 1.9.2007
Dekan: Prof. Dr. M. Paul
1. Gutachter: Prof. Dr. J. Schölmerich
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Lohoff

Inhaltsverzeichnis

1)	Einleitung	4
1.1)	Toleranz als wichtiger Reaktionsweg des Immunsystems	4
1.2)	<i>Homing</i> und Migration von T-Zellen bestimmen über die Gewebsverteilung und damit den Zugang zu tolerogener oder immunogener Umgebung.....	6
1.3)	Regionäre Immunmechanismen: Die Leber als immunmodulierende Region?.....	7
1.4)	Zielsetzung und Fragestellungen.....	10
2)	Eigene Arbeiten.....	11
2.1)	Mechanismen der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber	11
2.1.1)	Differenzierungsabhängige und <i>Subset</i> -spezifische Rekrutierung von CD4 ⁺ T-Zellen in die murine Leber.	11
2.1.2)	Aktivierung induziert rasche und tief greifende Veränderungen im Migrationsverhalten von T-Zellen.....	23
2.1.3)	Die frühe intrahepatische Antigen-abhängige Retention von naiven CD8 ⁺ T-Zellen in der Maus ist überwiegend abhängig von ICAM-1 und LFA-1.	36
2.1.4)	Das Spektrum der präferentiell rekrutierten Lymphozytensubpopulationen spiegelt die Zusammensetzung der intrahepatischen Lymphozytenpopulation wider.	46
2.2)	Funktion und Modulation von Th1- und Th2-Effektor-Zellen <i>in vivo</i>	51
2.2.1)	Adoptiv transferierte Th1-Zellpopulationen verlieren IFN γ ⁺ Zellen durch Herunterregulation der Zytokinsynthese auf Einzelzellebene.....	51
2.2.2)	Transfer von IFN γ -depletierten CD4 ⁺ T-Zellen zusammen mit CD8 ⁺ T-Zellen führt zur Abstoßung des murinen Nierensarkoms.....	58
2.2.3)	Immunmodulatorische Effekte der Leber: Deletion aktivierter CD4 ⁺ Effektor-T-Zellen und Suppression der IFN γ -Produktion nach intravenöser Proteinimmunisation.	66
2.2.4)	Differentielles <i>Priming</i> von CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen in Tiermodellen der autoimmunen Hepatitis und Cholangitis.	74
3)	Ergebnisse und Diskussion.....	86

3.1)	Mechanismen der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber	86
3.1.1)	Aktivierungsabhängige, <i>Subset</i> - und Antigen-spezifische Rekrutierung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in die Leber.....	86
3.1.2)	Die intrahepatische Lymphozytenpopulation wird durch permanente Rekrutierung und Modulation geformt: Das Modell der Balancierten Rekrutierung.	91
3.2)	Funktion und Modulation von Th1- und Th2-Effektor-Zellen <i>in vivo</i>	93
3.2.1)	Zytokin-produzierende Effektor-Zellen: Vorläufer der <i>Memory</i> -Zellen oder terminales Differenzierungsstadium in der Sackgasse?	93
3.2.2)	Die Leber kann Effektor-Zellen modulieren, intrahepatisches <i>Priming</i> von naiven CD4 ⁺ T-Zellen fand sich jedoch nicht in OVA-transgenen Mausmodellen.....	95
3.2.3)	Die Leber: <i>Graveyard</i> , <i>Responder trap</i> oder Ort Antigen-spezifischer Modulation von T-Zellen?	97
3.3)	Zusammenfassende Betrachtung: Das Migrationsverhalten verschiedener CD4 ⁺ T-Zellpopulationen spielt eine Rolle für die Modulation dieser Zellen.....	99
4)	Zusammenfassung	101
5)	Glossar.....	104
6)	Abkürzungsverzeichnis	105
7)	Literatur	106
8)	Genehmigungen.....	114

1) Einleitung



Abbildung 1: Die zwei Gesichter des Janus auf einer römischen Münze

Das Immunsystem verfügt grundsätzlich über die Möglichkeit, auf bestimmte Stimuli mit Immunität auf andere Reize jedoch mit Toleranz zu reagieren. Es differenziert Eigen und Fremd und greift das Fremde an, besagt das klassische Paradigma. Der „fremde“ Fetus in der Schwangerschaft wird jedoch toleriert, wogegen Eigenes bei Autoimmunerkrankungen zum Ziel der Abwehr wird. Ein anderes Modell postuliert daher, dass das Immunsystem anhand von *Danger signals* unterscheidet, in welcher Situation Immunität oder Toleranz hergestellt wird (1). Auch diese Erklärung findet ihre Limitation darin, zu definieren, was *Danger signals* sind und warum sie z.B. bei Tumoren, die die Immunantwort unterlaufen, nicht erkannt werden. Eine weitere Hypothese argumentiert daher, dass das Immunsystem nach evolutionären Gesichtspunkten zu unterscheiden gelernt hat, was zum Ziel der Abwehr gemacht wird und was nicht.

1.1) Toleranz als wichtiger Reaktionsweg des Immunsystems

Toleranz ist die Eigenschaft des Immunsystems, auf bestimmte Antigene spezifisch und systemisch nicht zu reagieren. Die zentrale Toleranz, als erste Kontrollinstanz, wird im Thymus bereits bei der T-Zellreifung hergestellt. Patienten, die einen Defekt des Transkriptionsfaktors AIRE haben, entwickeln das polyglanduläre Autoimmunsyndrom APS-1. Im Tiermodell der AIRE^{-/-} Maus konnte gezeigt werden, dass AIRE die Expression von multiplen Selbstantigenen auf medullären Thymusepithelzellen steuert. Potentiell autoreaktive T-Zellen, deren TCR eine Affinität zu diesen Antigenen zeigen, werden deletiert, bevor sie in die Peripherie gelangen können (2-4). Andere TCR-Spezifitäten, die keine oder nur eine geringe Affinität zu Selbstantigenen haben, reifen dagegen aus. Diese Vorgänge bezeichnet man als „negative“ bzw. „positive Selektion“. Nichtsdestotrotz gelangen auch potentiell autoreaktive T-Zellen in die Zirkulation.

Periphere Toleranz bezieht sich dagegen auf reife, naive T-Zellen, die den Thymus bereits verlassen haben, und kann daher als *Back-up*-Mechanismus aufgefasst werden. In Mausmodellen sind verschiedene Mechanismen der Herstellung von peripherer Toleranz beschrieben worden. Die meisten dieser Modelle fußen auf dem **adoptiven Transfer** von Antigen-spezifischen T-Zellen aus **TCR-transgenen** Mäusen. Bei diesen Tieren exprimiert

ein hoher Prozentsatz der CD4⁺, oder auch CD8⁺ T-Zellen, einen TCR, der für ein bekanntes Antigen spezifisch ist. Bei vielen dieser Mauslinien können Antigen-spezifische T-Zellen sogar anhand eines Klonotyp-spezifischen Antikörpers, der den entsprechenden TCR erkennt, identifiziert werden (5). Als klonale Deletion bezeichnet man das quantitative Zugrundegehen Antigen-spezifischer T-Zellen, meist durch **Apoptose**. Insbesondere bei Hochdosis-Antigengabe konnte Deletion beobachtet werden, so dass angenommen wird, dass Deletion eher bei *High dose tolerance* der wichtigste Mechanismus ist (6, 7). Anergie bedeutet, dass T-Zellen die Fähigkeit verlieren, auf Antigenstimulus hin, Zytokine, insbesondere das Wachstumszytokin IL-2, zu sezernieren und sich zu teilen. Sie beschreibt eine funktionelle Modulation von T-Zellen, die auf Einzelzellebene fixiert und durch IL-2-Gabe meist auch wieder reversibel ist (8-11). Ignoranz beschreibt das Phänomen, dass trotz Vorhandenseins des Antigens und spezifischer T-Zellen keine Immunreaktion stattfindet. Zum Teil scheint sich diese Beobachtung dadurch zu erklären, dass entsprechende Entzündungsstimuli, die möglicherweise auch die Zugänglichkeit des Gewebes für T-Zellen verbessern, nicht vorhanden sind. Typischerweise lässt sich Ignoranz durch IL-2-Expression oder unspezifische Entzündungsreize durchbrechen. Diese Phänomene lassen sich im Übrigen sehr gut mit dem *Danger-signals*-Konzept vereinbaren (12, 13). Als regulatorische T-Zellen bezeichnet man Populationen, die systemisch andere Zellen so beeinflussen können, dass eine Immunreaktion Antigen-spezifisch supprimiert wird. Damit unterscheidet sich diese Form der Immunsuppression von Deletion und Anergie insofern, als dass sie keine direkte Vernichtung oder Modulation der Antigen-spezifischen Zellen beinhaltet. Dieses Modell erklärt sehr gut das *in vivo* zu beobachtende Phänomen der *Split tolerance* bei Leber-transplantierten Mäusen. Hier finden sich zwar *in vitro* reaktive allospezifische T-Zellen, diese sind aber *in vivo* offensichtlich wirkungslos, denn die Transplantatorgane werden insgesamt toleriert. Als Marker regulatorischer CD4⁺ T-Zellen sind neben CD25 (14, 15) unter anderem auch das Integrin αE (16) sowie IL-10-Expression (17) oder TGF β -Synthese (18) beschrieben worden. Im Rahmen einer Immundeviation wird eine initial pro-inflammatorische z.B. Th1-Antwort in eine Th2-Antwort moduliert. Dieses Konzept stellt allerdings eher eine Hypothese dar, denn es ist bisher experimentell nicht gelungen, ein Th1-dominiertes Krankheitsmodell durch Immuntherapie in eine Th2-Reaktion zu modulieren. Insgesamt zielt dieses Modell auf die Situation des Antigen-erfahrenen Immunsystems unter Präsenz von Effektor-Zellen ab, wogegen oben ausgeführte Mechanismen bisher ausschließlich in Anwesenheit naiver T-Zellen demonstriert werden konnten, was ihre Relevanz für die therapeutische Situation schmälert (19, 20).

Die oben erwähnten tierexperimentellen Systeme legen nahe, dass periphere Toleranz in den sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten induziert wird (6-8, 21-24). Eine besondere Form stellt die orale Toleranz dar. Sie beschreibt das Phänomen, dass nach oraler Zufuhr eines Antigens eine Antigen-spezifische Toleranz, anstelle von Immunität entsteht (19, 25, 26). Für naive CD4⁺ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass orale Toleranz abhängig ist von der Einwanderung der T-Zellen in die mesenterialen Lymphknoten (27). Zudem scheinen Peyer'sche Plaques eine Rolle zu spielen (28-31).

Alle diese Tiermodelle beschreiben die Induktion von Toleranz in Anwesenheit von naiven CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen. Nicht abschließend geklärt ist, ob auch Antigen-erfahrene T-Zellen durch periphere Toleranzinduktion unschädlich gemacht werden können. Für die Induktion von Toleranz als potentielle Therapiestrategie ist davon auszugehen, dass in der Krankheitssituation Antigen-erfahrene Zellen vorliegen. Daher wäre es wichtig, zu klären, ob auch Effektor- oder *Memory*-Zellen noch beeinflussbar sind.

1.2) *Homing* und Migration von T-Zellen bestimmen über die Gewebsverteilung und damit den Zugang zu tolerogener oder immunogener Umgebung

Die Rekrutierung von T-Zellen an den Ort einer Entzündung ist nicht nur von zentraler Bedeutung für die Immunreaktion (32-34), sondern bestimmt umgekehrt auch über die Möglichkeit bestimmter Populationen z.B. in tolerogene Gewebe einzuwandern. Das ***Homing*** von T-Zellen wird durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren vermittelt (35, 36). Selektine (E-, P- und E-Selektin) üben ihre Funktion durch bestimmte, funktionell wichtige Glycosylierungsstrukturen aus. Sie werden auf Lymphozyten (L-Selektin), Thrombozyten (P-Selektin) oder Endothelzellen (E-Selektin) exprimiert. Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere, die neben Lymphozyten auf einer Reihe von Zellen wie z.B. APC oder Endothelzellen vorkommen (37). ICAM-1 gehört in die Immunglobulin-Supergen-Familie und ist überwiegend auf Endothelien und APC nachweisbar. Naive Lymphozyten rezirkulieren vermittelt durch L-Selektin kontinuierlich zwischen den sekundären lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten (38). Darüber hinaus interagiert das Integrin LFA-1 auf den T-Zellen mit ICAM-1 auf dem Endothel (39, 40). Neben den Adhäsionsmolekülen spielt der Chemokinrezeptor CCR7 eine wichtige Rolle für das *Homing* naiver T-Zellen (41-43). *Memory*-Zellen dagegen exprimieren ein anderes Profil von Adhäsionsmolekülen und Chemokin-Rezeptoren, die bedingen, dass diese Zellen vermehrt in

entzündliche Areale einwandern können (44, 45). Für Th1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die durch E- und P-Selektin vermittelte Rekrutierung dieser Effektor-Zellen in entzündlich veränderte Gelenke, für die Pathogenese der Erkrankung entscheidend ist (46).

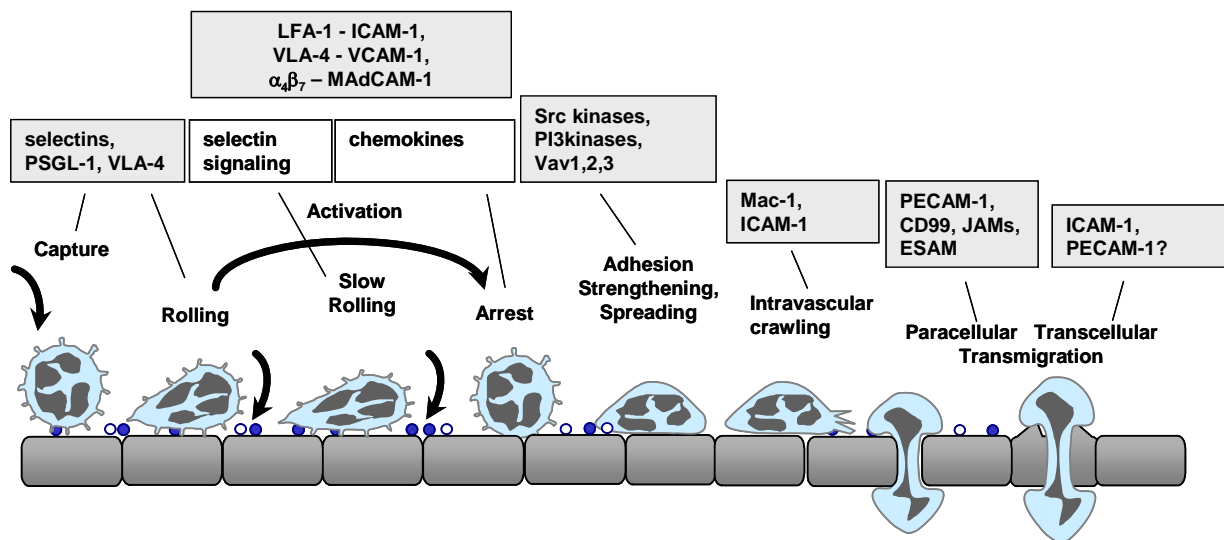


Abbildung 2: Das Multi-Step-Model der Adhäsion und Transmigration, modifiziert nach (35)

Wie oben ausgeführt, gibt es viele Hinweise, dass periphere Toleranz, also die Modulation von naiven T-Zellen, in den sekundären lymphatischen Organen stattfindet. Dies entspricht auch dem spontanen Migrationsverhalten von naiven T-Zellen, die präferentiell in die lymphatischen Organe einwandern, während Antigen-erfahrene *Memory*-Zellen in der Leber akkumulieren (32, 45). Möglicherweise gibt es also eine Kompartimentalisierung des Immunsystems in verschiedene Regionen, in denen unterschiedliche Populationen, in Abhängigkeit von ihrem Migrationsverhalten und ihrer Rezeptorausstattung moduliert werden können (35, 47, 48).

1.3) Regionäre Immunmechanismen: Die Leber als immunmodulierende Region?

Studien an organtransplantierten Patienten und Untersuchungen in Mausmodellen haben gezeigt, dass transplantierte Lebern, im Vergleich zu anderen Organen wie Niere oder Herz, besser toleriert werden. Die Patienten benötigen weniger Immunsuppression, Abstoßungen sind vergleichsweise seltener (49-51). In Modellen der Organtransplantation mittels **Inzuchtmäusen** konnte gezeigt werden, dass Lebern nicht nur über die MHC-Barriere

hinweg gut toleriert werden, sondern auch ausschließlich die Transplantation einer Leber, nicht aber eines anderen Organs, zu Antigen-spezifischer systemischer Toleranz gegenüber anderen Organen desselben Spenderstammes führt (52-55). Diese Beobachtungen haben nahe gelegt, dass die Leber, neben der Milz, den peripheren und mesenterialen Lymphknoten sowie den Peyer'schen Plaques, möglicherweise eine immunmodulatorische Funktion besitzt.

In der Leber befinden sich in der Tat zahlreiche Lymphozyten: so enthält eine menschliche Leber ca. 1×10^{10} lymphoide Zellen (56-58). In ihrer Zusammensetzung zeigt die intrahepatische Lymphozytenpopulation allerdings starke Abweichungen zu den lymphatischen Organen. Die Leber ist z.B. das größte Reservoir für NK- und NKT-Zellen (59, 60). Darüber hinaus sind in der Leber insbesondere Antigen-erfahrene Populationen wie aktivierte T-Zellen, Th1-Zellen oder *Memory*-Zellen überrepräsentiert (56, 57, 61-63). Die abweichende Zusammensetzung der intrahepatischen Lymphozytenpopulation sowie die Tatsache, dass die Leber unter bestimmten Bedingungen ein Ort der extramedullären Blutbildung darstellt, hat zu einer Kontroverse über die Herkunft der intrahepatischen Lymphozyten geführt (64-67). Zum einen wäre denkbar, dass die intrahepatischen Lymphozyten aus lokalen Stammzellen entstehen, zum anderen könnten die Zellen auch rekrutiert werden. Darüber hinaus wäre die Identifikation des Lebertropismus bestimmter T-Zell-Populationen und die Aufklärung der beteiligten Adhäsionsmoleküle bzw. Mechanismen ein wichtiger Hinweis, welche Zellen möglicherweise im Rahmen der postulierten Immunfunktion der Leber antigenabhängig oder unabhängig moduliert werden können.

Für $CD8^+$ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Gabe des spezifischen Antigens zu Akkumulation von apoptotischen Zellen in der Leber führt (68). Diese Beobachtung lässt folgende Interpretationen zu: apoptotische Zellen werden in der Leber lediglich abgebaut, damit kommt der Leber aber noch keine immunmodulatorische Funktion zu. Sie sequestriert lediglich passiv sterbende Zellen. Alternativ könnte man annehmen, dass intrahepatische Interaktionen erst zur Induktion von Apoptose bei aktivierten T-Zellen führen, so dass die Leber folglich eine, wenn auch Antigen-unspezifische, immunmodulatorische Funktion ausübt. Unter der Voraussetzung, dass entsprechende Antigene auch in der Leber selbst präsentiert und von T-Zellen erkannt werden, wäre letztlich sogar eine Antigen-spezifische Immunfunktion der Leber anzunehmen.

Um die Funktion der Antigenerkennung bei $CD8^+$ T-Zellen näher zu untersuchen, wurden Mausmodelle selektiver Antigenexpression in der Leber eingesetzt. So konnte in einem

Modell der selektiven, induzierbaren Expression (CRP-Promoter) eines MHCI-Alloantigens (K^b) in der Leber gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen Toleranz durch TCR-Herunterregulierung hergestellt wird (69) und Antigen-spezifische Zellen deletiert werden (70, 71). Ein anderes Modell fußt auf der selektiven Präsentation eines MHCI-Antigens durch ausschließliche Expression des MHCI-Moleküls auf LSEC. An diesem Modell ließ sich die Induktion von Anergie bei Antigen-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nachweisen (72). Diese Beobachtungen suggerieren, dass die Leber sogar einen Antigen-spezifischen Effekt auf $CD8^+$ T-Zellen ausüben könnte.

Die Mechanismen der Immunmodulation für exogene, MHCII-Antigene sind dagegen vergleichsweise wenig bekannt. Konstitutiv MHCII exprimierende Zellen in der Leber setzen sich zusammen aus professionellen APC hämatopoetischen Ursprunges wie z.B. den Kupffer-Zellen oder dendritischen Zellen sowie (wenigen) B-Zellen.

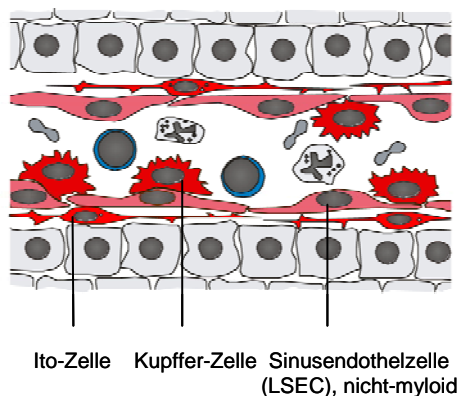


Abbildung 3: MHCII⁺ APC in der Leber

Für dendritische Zellen aus der Leber konnte gezeigt werden, dass sie *in vitro* und *in vivo* in der Lage sind, einen eher anti-inflammatorischen Zytokinphänotyp (IL-4- und IL-10-Produktion) bei naiven $CD4^+$ T-Zellen zu induzieren (73, 74). Zahlenmäßig scheinen dagegen die nicht-professionellen APC zu überwiegen wie z.B. LSEC oder Ito-Zellen. Ob LSEC alleine naive $CD4^+$ T-Zellen primen können, ist kontrovers. Zumindest scheinen sie aber nicht die Entwicklung eines Th1-Phänotypes zu unterstützen (75, 76). Ito-Zellen zeigen ebenfalls Eigenschaften von APC und stimulieren Lymphozyten wie bei humanen Zellen gezeigt. Zudem üben sie offenbar einen tolerogenen Einfluss auf insbesondere NKT-Zellen aus (77, 78).

1.4) Zielsetzung und Fragestellungen

Die Leber scheint eine tolerogene Funktion zu besitzen, wie Beobachtungen an lebertransplantierten Patienten und in Tiermodellen suggerieren. Auf der anderen Seite gibt es aber auch Autoimmunerkrankungen der Leber, die eine gestörte hepatische Toleranz voraussetzen. Ziel der Arbeiten war es, weiteren Aufschluss über die immunmodulatorische Funktion der Leber zu gewinnen.

Nicht geklärt ist bisher, welche T-Zellen in die Leber einwandern und dort möglicherweise moduliert werden. Es sollte daher zunächst systematisch geprüft werden, ob verschiedenen Subpopulationen von CD4⁺ Antigen-erfahrenen T-Zellen wie z.B. Th1- und Th2-Zellen oder (Antigen-abhängig) aktivierte CD4⁺ T-Zellen im gesunden Organismus präferentiell in die Leber einwandern. Zudem sollte untersucht werden, ob die Zellen abhängig vom Aktivierungszustand, der Differenzierung oder dem Zytokinphänotyp rekrutiert werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob Zellen auch Antigen-spezifisch zurückgehalten werden können und welche Adhäsionsmoleküle dabei involviert sind. Zusammenfassend wurde die Frage gestellt, ob Rekrutierung für die Zusammensetzung der intrahepatischen Lymphozytenpopulation eine wichtige Rolle spielt.

Antigen-erfahrene Zellen differenzieren unter bestimmten Bedingungen weiter in langlebige *Memory*-Zellen, die bei einem erneuten Antigenkontakt eine schnellere Immunantwort vermitteln. Ob und wodurch diese Zellen andererseits noch einer tolerogenen Modulation zugänglich sind, ist dagegen noch nicht abschließend geklärt. Mittels adoptiver Transfermodelle sollte daher geprüft werden, welche phänotypischen Veränderungen Effektor-Zellen *in vivo* spontan ohne Antigenzufuhr oder nach immunogener oder tolerogener Antigenapplikation erfahren. In der Zusammenschau sollten Erkenntnisse über die weiteren *in-vivo*-Differenzierungswege von Effektor-T-Zellen gewonnen werden und geklärt werden, inwieweit eine etablierte Immunreaktion, die von Antigen-erfahrenen Zellen vermittelt wird, grundsätzlich noch therapeutisch beeinflussbar ist, oder ob Effektor- bzw. *Memory*-T-Zellen gegenüber tolerogenen Stimuli refraktär sind, und welche Organe, also beispielsweise die Leber, hier eine Rolle spielen.

Von diesen Untersuchungen erwarteten wir uns zunächst Erkenntnisse über spezifische hepatische Immunvorgänge, aus denen sich perspektivisch Hinweise zu Entstehung und Folgen gestörter lokaler Toleranz und letztlich therapeutischer Ansätze bieten könnten.

2) Eigene Arbeiten

Im Folgenden sind die eigenen Arbeiten entsprechend der Fragestellungen der beiden Teilbereiche getrennt dargestellt.

2.1) Mechanismen der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber

2.1.1) Differenzierungsabhängige und *Subset*-spezifische Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in die murine Leber.

(Klugewitz, K., Kaiser, T., Topp, S., Dahmen, U., Kaiser, T., Sommer, S., Kury, E. and Hamann, A. (2002) Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into the murine liver.)

Es ist vermutet worden, dass die Leber präferentiell aktivierte und potentiell „gefährliche“ CD8⁺ T-Zellpopulationen rekrutiert und deletiert. Dieser Mechanismus trägt möglicherweise dazu bei, systemische Immunantworten zu modulieren. Inwieweit dies auch für CD4⁺ T-Zellen gilt, ist bisher nicht klar. In der vorliegenden Untersuchung konnten wir beobachten, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen nach Injektion in die Pfortader verstärkt in der Leber zurückgehalten werden. Die Intravitalmikroskopie zeigte, dass sie ausschließlich im Portalfeld adhären. Darüber hinaus fanden sich zahlreiche Zytokin-produzierende Th1- und Th2-Zellen in der Leber. Transferexperimente wurden durchgeführt, um Populationen zu identifizieren, die präferentiell in Leber rekrutiert werden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass Effektor-Zellen und aktivierte Zellen generell stärker in der Leber zurückgehalten werden als ruhende Zellen, ähnlich wie für CD45RB^{low} *Memory*-Zellen gezeigt. Zudem zeigte sich eine gewisse Präferenz für Th1-Zellen. Nichtsdestotrotz wurden Zytokin-produzierende Subpopulationen nicht verstärkt angereichert. Zusammengefasst lassen diese Daten den Schluss zu, dass die Leber als Filter für aktivierte und *Memory*/Effektor-Populationen fungiert. Zellen, die in der Leber zurückgehalten werden, könnten nachfolgend in der spezifischen Umgebung der Leber moduliert werden.

(Seiten 12-22: *Hepatology* 35:568-78)

2.1.2) Aktivierung induziert rasche und tief greifende Veränderungen im Migrationsverhalten von T-Zellen.

(Hamann, A., Klugewitz, K., Austrup, F., Jablonski-Westrich, D. (2000) Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells.)

Aktivierung und Differenzierung bestimmen das Wanderungsverhalten von Lymphozyten. Naive T-Zellen rezirkulieren durch die lymphatischen Organe, aktivierte Zellen verteilen sich in andere Kompartimente. Wir konnten zeigen, dass Veränderungen im Wanderungsverhalten von T-Zellen unmittelbar nach Aktivierung über den TCR eintreten. Bereits eine Stunde Stimulation über den TCR reicht aus, um Zellen nach intravenöser Injektion in Lunge und Leber umzudirigieren. Die starke Anreicherung in Lunge und Leber und die fehlende Rezirkulation in lymphatische Gewebe sind Kennzeichen aktivierter Zellen. Dieses für aktivierte T-Zellen charakteristische Migrationsverhalten fand sich sowohl bei *in vitro* als auch *in vivo* aktivierten T-Zellen und ist nicht bedingt durch die Zellgröße. Die Immigration in die Lunge ist Proteinbiosynthese-abhängig und partiell durch LFA-1 vermittelt, die Einwanderung in die Leber dagegen nicht. In der Intravitalmikroskopie zeigte sich unmittelbar nach Injektion in die Pfortader eine ausgeprägte Retention aktivierter T-Zellen nahezu ausschließlich im Periportalfeld der Leber. Selektive Einwanderung in die Haut oder den Darm ließ sich unabhängig von der Herkunft der Zellen nicht beobachten. Diese Daten zeigen, dass Aktivierung eine rasche Umprogrammierung der T-Zellen von Rezirkulation zu Sequestration bewirkt. Insbesondere die ausgeprägte Retention aktivierter T-Zellen in der Leber gibt zu der Vermutung Anlass, dass die Leber diese Zellen zurückhält und auf diese Weise einen systemischen immunmodulatorischen Effekt ausübt.

Herr Dr. Austrup und ich als Ko-Autoren waren wissenschaftliche Mitarbeiter, Frau Jablonski-Westrich technische Assistentin, in der Arbeitsgruppe von Prof. Hamann. Mein Anteil an der Arbeit war speziell der Aspekt des Leber-*Homings* von aktivierten T-Zellen. Im Detail betrifft dies zum einen die selbstständige Durchführung der Intravitalmikroskopie. Zum anderen war ich aktiv beteiligt an Planung und Durchführung der Experimente mit Antigen-spezifischen Zellen. Darüber hinaus habe ich zum Zusammentragen und zur Interpretation der Daten zu Leber-*Homing*-relevanten Molekülen beigetragen.

(Seiten 24-35: *Eur. J. of Immunology* 30: 3207- 3218)

2.1.3) Die frühe intrahepatische Antigen-abhängige Retention von naiven CD8⁺ T-Zellen in der Maus ist überwiegend abhängig von ICAM-1 und LFA-1.

(Bertolino, P., Schrage, A., Bowen, D.G., Klugewitz, K., Eulenburg, K., Holz, R., Hogg, N., McCoughan, G.W. and Hamann, A. (2005) Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8⁺ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice.)

Naive CD8⁺ T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen, werden zurückgehalten und können unabhängig von lymphatischen Organen geprimt werden. Intrahepatische T-Zellaktivierung führt zu Apoptose und trägt damit möglicherweise zum immunmodulatorischen Effekt der Leber bei. Adhäsionsmoleküle, die für die Rekrutierung von primär extrahepatisch aktivierten T-Zellen eine Rolle spielen, wurden charakterisiert. Bisher nicht untersucht war allerdings, welche molekularen Strukturen bei der intrahepatischen Antigen-abhängigen Retention von naiven CD8⁺ T-Zellen involviert sind. Mittels adoptivem Transfer von radioaktiv markierten Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Rezipienten, die das Antigen ubiquitär exprimieren, konnten wir beobachten, dass sich 40-60% der Antigen-spezifischen Zellen nach einer Stunde in der Leber befinden, obwohl das Antigen ubiquitär exprimiert wird. In der Intravitalmikroskopie wurde gezeigt, dass die injizierten, fluoreszenzmarkierten Zellen bereits einige Minuten nach der Applikation ihre Passage durch die Leber verlangsamen und fest am Sinusendothel adhären. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Aktivierung der Antigen-spezifischen Zellen lokal in der Leber stattfinden und nicht im lymphatischen Gewebe. Untersuchungen in *Knock-out*-Mäusen zeigten eine Abhängigkeit von LFA-1 und ICAM-1. Andere Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, VAP-1, P-Selektin, α 4-Integrin oder β 1-Integrin spielten dagegen keine Rolle. Interessanterweise scheint die LFA-1-Expression nicht nur auf den Donorlymphozyten, sondern auch auf Rezipientenleberzellen essentiell zu sein, ein Phänomen, das bisher auch für die Rekrutierung von NKT-Zellen beobachtet werden konnte. Zusammenfassend stellen die LFA-1-abhängige intrahepatische Retention und Aktivierung aufeinander folgende Prozesse dar, die möglicherweise bei der Induktion von Transplantattoleranz eine wichtige Rolle spielen.

Herr Dr. Bertolino war Gastwissenschaftler in der Arbeitsgruppe von Prof. Hamann in Berlin. Er wurde in dieser Zeit von mir betreut. Mein Anteil an der gemeinsamen Arbeit war die Planung und Mitwirkung bei der Durchführung der *Homing*-Versuche mit CD8⁺ T-Zellen. Darüber hinaus war ich an der Zusammentragung und Interpretation der *Homing*-Daten beteiligt.

(Seiten 37-45: *Hepatology* 42(5):1063-71)

2.1.4) Das Spektrum der präferentiell rekrutierten Lymphozytensubpopulationen spiegelt die Zusammensetzung der intrahepatischen Lymphozytenpopulation wider.

(Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Eulenburg, K., Emoto, M., Hamann, A. (2004) The spectrum of lymphoid subsets preferentially recruited into the liver reflects that of resident populations.)

Die intrahepatische Lymphozytenpopulation zeigt eine von Blut und von lymphatischen Organen stark abweichende Zusammensetzung. Die Leber enthält auch T-Zellen, die in lymphatischen Organen zu finden sind, allerdings weist ein höherer Anteil von ihnen im Vergleich zu lymphatischen Organen Aktivierungs- und *Memory*-Marker auf. In der Leber finden sich sehr wenige naive T-Zellen. Darüber hinaus sind Populationen wie NK- oder NKT-Zellen, die sich vergleichsweise weniger in lymphatischen Organen befinden, in der Leber verstärkt nachweisbar. Um zu klären, ob diese Zusammensetzung durch Rekrutierung und intrahepatische Modulation erklärt werden kann, transferierten wir CFSE-markierte Milzzellen adoptiv in **syngene** Mäuse und untersuchten 24 h später nach Reisolation aus Leber und Milz die Zusammensetzung der immigrierten sowie der residenten intrahepatischen lymphoiden Zellen. Vor allem CD45RB^{low} *Memory*-T-Zellen, NK- und NKT-Zellen, die sich auch vermehrt in der intrahepatischen Lymphozytenpopulation finden, wurden auch vermehrt in die Leber rekrutiert. Im Gegensatz dazu migrierten beispielsweise naive CD62L^{high} T-Zellen oder B-Zellen, die überwiegend in lymphatischen Organen repräsentiert sind, verstärkt in die Milz. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Wanderungsverhalten die Repräsentation verschiedener Subpopulationen innerhalb der intrahepatischen Lymphozytenpopulation überraschend gut widerspiegelt. Diese Daten suggerieren, dass die Zusammensetzung der intrahepatischen Lymphozytenpopulation durch Rekrutierung, Emigration und intrahepatische Modulation geprägt sein könnte.

(Seiten 47-50: *Immunol Lett* 93:159-62)

2.2) Funktion und Modulation von Th1- und Th2-Effektor-Zellen *in vivo*

2.2.1) Adoptiv transferierte Th1-Zellpopulationen verlieren IFN γ^+ Zellen durch Herunterregulation der Zytokinsynthese auf Einzelzellebene.

(Blumenthal-Barby, F., Hamann, A., Klugewitz, K. (2006) Adoptively transferred Th1 cell populations lose IFN γ^+ cells by cytokine down-regulation on single-cell level.)

Vor dem Hintergrund der Heterogenität von Effektor-Zellen bezüglich ihrer aktuellen Zytokinexpression, wurde argumentiert, dass die Zytokinproduktion distinkte Th1-Differenzierungslinien definiert: während IFN γ^- Th1-Zellen überleben und *in vivo* differenzieren, sterben IFN γ^+ Th1-Zellen durch Apoptose. Die Alternativhypothese besagt, dass das **Lineage commitment** nicht mit der punktuellen Zytokinsynthese assoziiert ist. Um diese Kontroverse weiter einzugrenzen, wurden *in vitro* polarisierte Th1-Zellen adoptiv transferiert. Obwohl die absolute Zahl an reisolierten Donorzellen an Tag gleich blieb, zeigte sich eine Abnahme der IFN γ^+ Th1-Zellen um ungefähr 50%. Diese Beobachtung war unabhängig von der initialen Frequenz an IFN γ^+ Zellen innerhalb der Th1-Zellen und der Antigenexposition. Gegen die Annahme der positiven Selektion von Nicht-Produzenten *in vivo* sprachen die gleichen Teilungsraten von IFN γ^+ und IFN γ^- Th1-Zellen. Unsere Daten legen nahe, dass der Verlust von IFN γ^+ Zellen innerhalb der transferierten Population eher durch eine Herunterregulation auf Einzelzellebene bedingt ist als durch die Deletion von IFN γ^+ Zellen. Folglich stützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass die aktuelle Zytokinexpression keine distinkten Differenzierungslinien definiert, zumal Polarisations-spezifische Gene auch bei IFN γ^- Th1-Effektor-Zellen ablesbar bleiben.

(Seiten 52-57: *Immunol Letters*, 107:176-181)

2.2.2) Transfer von IFN γ -depletierten CD4⁺ T-Zellen zusammen mit CD8⁺ T-Zellen führt zur Abstoßung des murinen Nierensarkoms.

(Klugewitz, K., Scheffold, A., Radbruch, A. and Hamann, A. (2000) Transfer of IFN γ -depleted CD4⁺ T cells together with CD8⁺ T cells leads to rejection of the murine kidney sarcoma in mice.)

Beim murinen Nierensarkom induziert eine Vakzinierung mit dem tumorspezifischen Antigen *Large T* eine protektive Immunität gegen den Tumor. Diese Immunantwort ist von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen abhängig. In der folgenden Studie sollte zunächst untersucht werden, inwieweit der Zytokinphänotyp der induzierten CD4⁺ T-Zellen determiniert, ob der Tumor erfolgreich abgestoßen wird oder nicht. Mittels intrazytoplasmatischer Zytokinfärbung konnten IFN γ ⁺ (Th1), IL-4⁺ (Th2) und IL-10⁺ Zellen in vakzinierten und nicht-vakzinierten Tieren, die auf Tumorwachstum reagierten, nachgewiesen werden. Vakzinierte Tiere, die den Tumor erfolgreich abstießen, zeigten eine Zunahme der IL-4⁺ (Th2) Zellen. Im Gegensatz dazu nahmen in nicht-immunisierten Tieren, die durch den Tumor starben, die immunsuppressiven IL-10⁺ Zellen zu, die Zahl der IFN γ ⁺ (Th1) Zellen fiel dagegen mit Fortschreiten der Erkrankung ab. Ein Überwiegen einer Th1- oder Th2-dominierten Immunantwort wurde nicht beobachtet. Um die Relevanz der nachgewiesenen Subpopulationen zu analysieren, wurden Th1-Zellen anhand ihrer Oberflächenexpression von IFN γ *ex vivo* aus vakzinierten Tieren sortiert. Angereicherte Th1-Zellen und IFN γ -depletierte Zellen, die überwiegend aus Th2-Zellen bestanden, wurden zusammen mit CD8⁺ T-Zellen adoptiv in naive Mäuse transferiert und der Tumor implantiert. Überraschenderweise konnte eine Immunität gegen den Tumor sowohl mit Th1 als auch mit Th2-Zellen transferiert werden, wobei die Th2-Zellen etwas effizienter waren. Dies suggeriert, dass, zumindest in der Effektorphase, eine Th1-Reaktion nicht Bedingung für eine suffiziente Abstoßung des Tumors ist. Unsere Daten unterstützen die Annahme, dass die Th1/Th2-Dichotomie nicht zentral ist für die T-zellvermittelte Tumormunität.

(Seiten 59-65: *Int. J. Cancer* 87:673- 679)

2.2.3) Immunmodulatorische Effekte der Leber: Deletion aktivierter CD4⁺ Effektor-T-Zellen und Suppression der IFN γ -Produktion nach intravenöser Proteinimmunisation.

(Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P.A., Hamann, A., and Crispe I. N. (2002) Immunomodulatory effects of the liver: Deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN γ -producing cells after intravenous protein immunization.)

Die Leber ist in vielen Situationen tolerogen, beispielsweise als Transplantat und im Rahmen der Immunantwort gegen allogene MHC-Moleküle, die auf Hepatozyten exprimiert sind. Der überwiegende Teil der Daten zu dieser Thematik fokussiert auf endogene Antigene. Wenig bekannt ist dagegen über CD4⁺ T-Zellen und ihr Schicksal unter tolerogenen Bedingungen. Das gilt insbesondere für differenzierte CD4⁺ Effektor-T-Zellen. In dieser Untersuchung wurden adoptive Transferuntersuchungen mit *in vitro*-polarisierten Th1- oder Th2-Effektor-Zellen durchgeführt um zu zeigen, ob Apoptose oder Immundeviation Mechanismen der Modulation Zytokin-produzierender Effektor-Zellen, die in der Leber zurückgehalten werden, sind. Nach dem Transfer konnten Th1- und Th2-Zellen noch mindestens 25 Tage in lymphatischen Organen und der Leber nachgewiesen werden. Intravenöse Gabe des spezifischen Antigens OVA in höheren Dosen (500 μ g) führte zu Akkumulation, Proliferation und schließlich Deletion in der Leber. Th1-Zellen zeigten eine Reduktion der Zytokinsynthese, dagegen persistierte die IL-4-Produktion von Th2-Zellen in der Leber. Hinweise für eine Immundeviation der Th1-programmierten Zellen zu Th2 (IL-4) oder regulatorischen T-Zellen (IL-10) fanden sich nicht. Mittels *in vitro* Ko-Kultur mit APC aus der Leber wurde geprüft, ob die Leber die Fähigkeit hat, eine präferentielle IL-4-Expression bei T-Zellen zu induzieren. Hier zeigte sich, dass LSEC selektiv die Expansion von IFN γ ⁺ T-Zellen supprimieren können, wogegen sie das Wachstum von IL-4-Produzenten förderten. Hierdurch könnte ein immunsuppressives Milieu in der Leber induziert werden. Diese Daten legen nahe, dass Präsentation von Antigenen in der Leber zu einer quantitativen und qualitativen Modulation der Immunantwort führt.

(Seiten 67-73: *J. Immunology* 169:2407-13)

2.2.4) Differentielles *Priming* von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen in Tiermodellen der autoimmunen Hepatitis und Cholangitis.

(Derkow, K., Loddenkemper, C., Mintern, J., Kruse, N., Klugewitz, K., Berg, T., Wiedenmann, B., Ploegh, H.L., Schott, E. (2007) Differential priming of CD8 and CD4 T cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis.)

Zur Aufklärung der Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen sind Tiermodelle erforderlich, die eine Untersuchung der Antigenpräsentation und des *Primings* von T-Zellen im Kontext mit Autoimmunität erlauben. Es wurden transgene Tiermodelle generiert, die darauf beruhen, dass das Modell-Autoantigen OVA in Hepatozyten (TFR-OVA) oder Cholangiozyten (ASBT-OVA) exprimiert wird. TCR-transgene OT-I (CD8⁺) oder OT-II (CD4⁺) Zellen, die spezifisch sind für OVA, wurden adoptiv in TFR-OVA oder ASBT-OVA Mäuse transferiert um *in vivo Priming* Antigen-spezifischer Zellen zu induzieren. T-Zellmigration, Aktivierung und Induktion einer hepatischen Entzündung wurden untersucht. OT-I Zellen befanden sich präferentiell in der Leber beider Mausstämmen, wogegen OT-II Zellen nicht in die Leber einwanderten. OT-I Zellen proliferierten in der Leber von TFR-OVA Mäusen, sowie in der Leber und dem Leber-drainierenden Lymphknoten von ASBT-OVA Tieren. OT-II Zellen wurden in Milz und Leber-drainierenden Lymphknoten von TFR-OVA, nicht aber in ASBT-OVA Mäusen aktiviert. Der Transfer von OT-I Zellen in TFR-OVA und ASBT-OVA Mäuse führte zu histologisch distinkten Entzündungen in der Leber und verursachte einen anhand erhöhter Transaminasen nachweisbaren Leberschaden. Ein durch Hepatozyten exprimiertes Antigen kann im MHCI- und MHCII-Kontext CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden, wogegen dasselbe Antigen, wenn es durch Cholangiozyten exprimiert wird, nur CD8⁺ aber nicht CD4⁺ T-Zellen präsentiert wird. In beiden Modellen findet die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in der Leber statt und zieht eine hepatische Entzündung nach sich. Die beiden hier vorgestellten Modelle sind wertvoll für die Untersuchung von T-Zellpriming in der Leber und ihre Rolle bei der Entstehung von autoimmunen Lebererkrankungen.

Ich war an der Planung und Interpretation der Versuche mit CD4⁺ T-Zellen und Knochenmarkschimären beteiligt. Herr Kruse, mein Doktorand, führte die Knochenmarkstransplantation an den entsprechenden Mausstämmen durch und stellte somit dieses Modell zur Verfügung.

(Seiten 75-85: *Hepatology* 46(4):1155-65)

3) Ergebnisse und Diskussion

3.1) Mechanismen der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber

3.1.1) Aktivierungsabhängige, *Subset*- und Antigen-spezifische Rekrutierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Leber.

Das Migrationsverhalten von CD4⁺ T-Zellen ist entscheidend für die Kompartimentalisierung bestimmter Immunvorgänge: In sekundären lymphatischen Organen findet Antigenpräsentation und Aktivierung statt, im entzündlich veränderten Gewebe werden Effektorfunktionen ausgeübt. Zudem gibt es Regionen wie die Mukosa und möglicherweise die Leber in denen Immunmodulation und Toleranzinduktion vermittelt werden. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher zunächst untersucht, welches Migrationsverhalten verschiedene T-Zellsubpopulationen besitzen und welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen. Diese Eigenschaften stellen Voraussetzungen für eine konsekutive Modulation dar.

Aktivierte CD4⁺ T-Zellen stellen eine potentiell pro-inflammatorische Subpopulation dar. Sie besitzen die Fähigkeit, in Effektor-Zellen zu differenzieren und in inflammatorisches Gewebe einzuwandern und damit zur Pathogenese entzündlicher Vorgänge beizutragen. Eine hepatische Rekrutierung und Modulation könnten somit eine systemische Entzündungsreaktion limitieren. Zunächst sollte daher geprüft werden, ob aktivierte CD4⁺ T-Zellen präferentiell in die Leber rekrutiert werden, wie sie im Organ verteilt sind und welche molekularen Mechanismen involviert sind. Aktivierte CD25^{high} CD62L^{low} blastäre CD4⁺ T-Zellen wurden durch polyklonale *in vitro*-Stimulation gewonnen. Um Einwanderung und Gewebsverteilung in der Leber untersuchen zu können, wurde die Intravitalmikroskopie der Leber an der narkotisierten Maus und die Injektion der zu untersuchenden Zellen in die Pfortader bzw. die *V. mesenterica inferior* etabliert, da nach Injektion in die Schwanzvene innerhalb des Beobachtungszeitraumes von ca. einer Stunde keinerlei aktivierte Zellen in der Zirkulation nachweisbar waren. Mit dieser Technik konnten wir beobachten, dass fluorochrommarkierte naive CD4⁺ T-Zellen rasch von der Pfortader zur Zentralvene des Leberläppchen passierten ohne zu rollen oder zu adhären. Folglich fanden sich nur sehr wenige naive CD4⁺ T-Zellen, die über die gesamte Beobachtungszeit in der Leber verblieben. *In vitro*-aktivierte CD4⁺ T-Zellen dagegen adhärten sofort in großer Zahl in der Leber und akkumulierten dabei nahezu ausschließlich im Portalfeld.

In einem weiteren Projekt der Arbeitsgruppe wurde das systemische Wanderungsverhalten verschiedener Populationen aktivierter CD4⁺ T-Zellen, wie *ex vivo*-isolierter T-Zellblasten

und Antigen-abhängig stimulierter TCR-transgener CD4⁺ Zellen untersucht. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen zeigten im *Homing*-Versuch mit radioaktiver Markierung eine Stunde nach intravenöser Injektion unabhängig vom Aktivierungsweg eine deutliche Umverteilung von den sekundären lymphatischen Organen in die Lunge. Es besteht zwischen Lunge und Leber offenbar eine komplementäre oder konkurrierende Verteilung: 24 h nach Injektion zeigte sich dagegen eine deutliche Umverteilung aktivierter CD4⁺ T-Zellen von der Lunge in die Leber. Dies erklärt, warum, wie oben ausgeführt, in der Intravitalmikroskopie kurze Zeit nach Injektion in die Schwanzvene keinerlei aktivierte Zellen nachweisbar waren. Da *in vitro* polyklonal oder Antigen-spezifisch aktivierte CD4⁺ T-Zellen und *ex vivo*-isolierte T-Zellblasten ein vergleichbares Wanderungsverhalten zeigten, scheint die Veränderung des Wanderungsverhaltens unabhängig vom Aktivierungsweg aufzutreten. Kurzzeit-aktivierte CD4⁺ T-Zellen besitzen wenig CD25, sind CD45RB^{high} und reexprimieren L-Selektin. Wenn sie in einen ruhenden Zustand zurückkehren, nehmen sie auch wieder den **Homing-Phänotyp** einer naiven CD4⁺ T-Zelle an. Diese transiente Veränderung des Migrationsverhaltens spricht für eine primäre Aktivierungsabhängigkeit und weniger für eine Eigenschaft, die die Zellen im Zuge ihrer frühen Differenzierung annehmen. Nach mehrfacher oder längerer Stimulation dagegen werden CD4⁺ T-Zellen CD45RB^{low} und zeigen nun einen nur noch partiell reversiblen *Homing*-Phänotyp, der eher einer *Memory*-Zelle gleicht, mit stärkerer Präferenz für Lunge und Leber (45). Folglich sind mehrere oder repetitive Stimulationen nötig, um bei CD4⁺ T-Zellen einen differenzierungsabhängig fixierten *Homing*-Phänotyp zu induzieren. Diese Daten legen nahe, dass die Leber eher aktivierte als naive CD4⁺ T-Zellen rekrutiert und diese Zellen eine distinkte Verteilung im Leberläppchen annehmen.

Die Beobachtungen stimmen mit Studien aus der Ratte überein (79). Auch für aktivierte CD8⁺ T-Zellen konnte eine präferentielle Rekrutierung in die Leber gezeigt werden (80). Die Zellgröße alleine scheint nicht für das **Trapping** verantwortlich zu sein, da größere Zellen innerhalb der rekrutierten Population nicht akkumulierten, wie in der durchflußzytometrischen Analyse reisolierter Donorzellen gezeigt. Auch die *de novo*-Synthese von Proteinen konnte durch Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Cycloheximid ausgeschlossen werden. Bei CD8⁺ T-Zellen ist die Interaktion von ICAM-1 auf dem Endothel mit LFA-1 auf der T-Zellen Bedingung (80). Bei NKT-Zellen interagiert dieses Rezeptor-Ligand-Paar invers: d.h. ICAM-1 auf der aktivierten T-Zelle und LFA-1 auf Kupffer-Zellen vermitteln die hepatische Retention von NKT-Zellen (81-83). In Blockierungsexperimenten mit spezifischen Antikörpern und durch den Einsatz von *Knock-out*-Mäusen wurden

verschiedene Adhäsionsmoleküle wie β_2 -, α_4 - und α_6 -Integrine, Selektine, ICAM-1 und -2 sowie CD31 als (alleinig) ursächlich für das Wanderungsverhalten aktivierter $CD4^+$ T-Zellen ausgeschlossen. Auch E- und P-Selektin scheinen nicht alleine verantwortlich für das *Trapping* bzw. die Rekrutierung von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen. Diese Beobachtungen decken sich mit älteren Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass für die Rekrutierung von Leukozyten in die Leber unter entzündlichen Bedingungen weder E- noch P-Selektin notwendig sind. Offenbar sind mehrere Rezeptor-Ligand-Paare redundant (84). Vermutlich beruht die Adhäsion ohne Selektin-vermitteltes **Rolling** darüber hinaus auch auf der Tatsache, dass durch den sehr langsamen Blutfluss in den Sinusoiden und die temporäre Okklusion der Strombahn beispielsweise durch Kupffer-Zellen der **Shear stress** reduziert und rasche Interaktionen von T-Zellen und Endothel generell begünstigt werden (63, 84). VAP-1, das beim Menschen für die Interaktion von Lymphozyten mit dem Leberendothel und die Rekrutierung wichtig ist, wird in der Maus nicht spezifisch exprimiert (85-87). Da sich insbesondere im Portalfeld viele Kupffer-Zellen befinden, wäre beispielsweise eine inverse Interaktion wie bei NKT-Zellen oder aber eine Funktion bestimmter Chemokine für die Rekrutierung aktivierter $CD4^+$ T-Zellen denkbar.

Aktivierte $CD4^+$ T-Zellen differenzieren unter bestimmten Bedingungen weiter zu Effektor-T-Zellen, die sich anhand ihres Zytokinprofils in funktionell verschiedene Subpopulationen aufgliedern lassen. Diese Einteilung fußt auf der Beobachtung, dass Inzuchtmäuse des Stammes C57BL/6, die eine $IFN\gamma$ -dominierte (Th1) Immunantwort aufbauen, Leishmanien eliminieren können. Im Gegensatz dazu sterben Inzuchtmäuse des Stammes BALB/c, die mit einer IL-4-dominierten (Th2) Antwort reagieren, an einer Leishmanien-Infektion (88). Th1-Zellen sezernieren als Markerzytokin $IFN\gamma$ und unterstützen eine zellvermittelte Immunantwort durch Phagozytose. Sie sind wichtig für die Elimination intrazellulärer Erreger. Th2-Zellen produzieren als Leitzytokin IL-4 und werden mit der humoralen Immunantwort, aber auch mit Autoimmunität, in Verbindung gebracht (89, 90). Es sollte daher geprüft werden, ob die Leber möglicherweise durch Induktion einer Immundelevation die systemische Immunantwort modulieren könnte indem durch *Subset*-spezifische Rekrutierung die Th1/Th2-Balance verändert wird. Bezüglich des Migrationsverhaltens von Th1- und Th2-Zellen konnten wir zeigen, dass beide Effektorzellsubpopulationen, *in vitro*-polarisierte Th1-Zellen und Th2-Zellen, im Vergleich zu naiven $CD4^+$ T-Zellen verstärkt in die Leber einwandern. Th1-Zellen zeigten darüber hinaus einen Tropismus für die Leber, wogegen Th2-Zellen vermehrt in die Milz einwanderten. Im Gegensatz zu aktivierten $CD4^+$

T-Zellen verteilten sich Th1-Zellen jedoch, wie in der Intravitalmikroskopie nach intraportaler Injektion beobachtet, gleichmäßig im gesamten Leberlobulus. Um zu untersuchen, ob die Synthese der Effektorzytokine IFN γ und IL-4 selbst Bedingung ist für dieses unterschiedliche Verhalten, wurden die Donorzellen reisoliert und intrazelluläre Zytokinfärbungen durchgeführt. Innerhalb der injizierten Th1- oder Th2-Zellen nahmen nicht die Zytokinproduzierenden Subpopulationen, sondern eher größere, blastäre Zellen zu. Durch den Einsatz von TCR-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit polyklonalem T-Zellrepertoire konnten Artefakte durch den Mausstamm ausgeschlossen und gezeigt werden, dass analog zu aktivierten CD4⁺ T-Zellen, der Aktivierungs- oder Differenzierungsweg selbst keine Rolle spielen. ICAM-1 und LFA-1 oder E- und P-Selektin scheinen weder für die Rekrutierung von Th1- noch von Th2-Zellen in die Leber notwendig zu sein, wie in Blockadeexperimenten bzw. durch Einsatz von *Knock-out*-Mäusen gezeigt wurde. Während für die gesunde Leber also keine spezifischen Adhäsionsmoleküle identifiziert wurden, konnte dagegen in der entzündlich veränderten Leber gezeigt werden, dass für die Retention von Th1-Zellen α_4 -Integrine, für Th2-Zellen VAP-1, essentiell sind (91).

Generell spielt offenbar für die Rekrutierung in die Leber die Differenzierung in Effektorzellen im Vergleich zu naiven Zellen eine Rolle. Auch eine Subset-spezifische Immigration scheint stattzufinden, wobei eher pro-inflammatorische Th1-Zellen zurückgehalten werden. Die Zytokinsynthese selbst ist im Gegensatz zum Aktivierungszustand der Effektor-Zellen dagegen ein untergeordneter Faktor.

Eine weiterer wichtiger Gesichtspunkt der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber wurde ergänzend in einem Kooperationsprojekt mit Dr. P. Bertolino (Centenary Institute of Cancer Medicine and Cell Biology, Newton, Australien) untersucht. Da sich in der Leber auch zahlreiche APC befinden und Antigene beispielsweise über die Pfortader in die Leber gelangen, liegt es nahe, anzunehmen, dass auch die Interaktion des TCR mit dem MHC-Antigenkomplex zur Retention beiträgt, also T-Zellen Antigen-abhängig zurückgehalten werden. Die entsprechenden Untersuchungen wurden an CD8⁺ T-Zellen durchgeführt, da aufgrund der in diesem System eher sessilen APC, eine selektivere Lokalisation des Antigens erreichbar ist. Im *Homing*-Versuch mit radioaktiv markierten K^b-spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen (Des-TCR-Maus, H-2k **Haplotyp**) konnten wir beobachten, dass Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen in C57BL/6 (H-2b) und K^b-transgenen 178.3 (H-2k) Mäusen verstärkt in die Leber rekrutiert werden. B10.BR Tiere (H-2k) dienten als Kontrollen. In der

Intravitalmikroskopie zeigten fluoreszenzmarkierte spezifische T-Zellen bereits 10 Minuten nach Injektion in die Mesenterialvenen eine Verlangsamung und konsekutive Adhäsion in der Leber. Daher ist anzunehmen, dass die Interaktion zwischen dem TCR mit dem MHC-Antigenkomplex und nicht die beginnende Aktivierung und Umverteilung verantwortlich ist. Offenbar ist jedoch das Rezeptor-Ligand-Paar zusätzlich essentiell, denn eine Blockade von ICAM-1 und LFA-1 auf Donorzellen und in der Rezipientenmaus führte zu einer signifikanten Abnahme der Rekrutierung. Da sich durch Ausschalten von LFA-1 in der C57BL/6-Rezipientenmaus eine Reduktion bis auf das Niveau der Kontrollgruppe erzielen lies, ist anzunehmen, dass die Präsenz des Antigens alleine nicht ausreichend für das Antigen-spezifische Rekrutierung naiver CD8⁺ T-Zellen ist, sondern LFA-1 eine notwendige Bedingung darstellt. Andere getestete Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin oder VCAM-1 hatten dagegen keinen Einfluss auf die Einwanderung. Auch hier stellt sich die Frage, auf welchen Zellen in der Rezipientenmaus ICAM-1 bzw. LFA-1 exprimiert wird. Es spricht vieles für ein Modell, das eine Interaktion mit Kupffer-Zellen annimmt, da diese LFA-1 stark exprimieren und in der Lage sind, naive T-Zellen zu primen. Dagegen führt die Interaktion mit anderen intrahepatischen Populationen wie den Hepatozyten durch Mangel an kostimulatorischen Signalen zum *Death by neglect*. Entgegen dem Paradigma, dass naive T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe rezirkulieren, konnten wir somit zeigen, dass antigen-abhängige Rekrutierung *in vivo* eine Rolle spielt und dies zur Migration von naiven CD8⁺ T-Zellen in die Leber und nicht in die lymphatischen Organe führt. Dieser Mechanismus trägt möglicherweise dazu bei, dass unter entzündlichen Bedingungen vermehrt Antigen-spezifische T-Zellen in die Leber rekrutiert werden und unter homöostatischen Bedingungen CD8⁺ T-Zellen in der Leber geprimt werden können, was letztlich zur Induktion von Toleranz führt (72).

Zusammengefasst konnten wir in den diskutierten Arbeiten Aktivierung, Differenzierung, Zytokinphänotyp und das spezifische Antigen als Faktoren identifizieren, die unter homöostatischen Bedingungen die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber bedingen. Offenbar ist es so, dass die Leber verstärkt differenzierte T-Zellpopulationen rekrutiert und damit modulieren könnte. Nicht abschließend gelungen ist es, zumindest für CD4⁺ T-Zellen die beteiligten molekularen Mechanismen wie z.B. Adhäsionsmoleküle zu bestimmen. Gründe hierfür könnten sein, dass viele Rezeptor-Ligand-Paare redundant sind, dass das Leberläppchen eine differentielle Rezeptorausstattung vom Portalfeld bis zur Zentralvene

aufweist oder dass durch den sehr langsamen Fluss in der sinusoidalen Zirkulation spontane Interaktionen häufig sind.

3.1.2) Die intrahepatische Lymphozytenpopulation wird durch permanente Rekrutierung und Modulation geformt: Das Modell der Balancierten Rekrutierung.

Als übergreifende und zusammenfassende Fragestellung im Anschluss an diese Untersuchungen haben wir systematisch untersucht, welche Lymphozytenpopulationen in der Leber vermehrt anzutreffen sind und ob diese auch verstärkt rekrutiert werden. Dies sollte Hinweise auf die Herkunft der intrahepatischen Lymphozytenpopulation geben. Eigene Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass die Leber bereits in der residenten Lymphozytenpopulation vermehrt aktivierte und Zytokin-produzierende Effektor-Zellen enthält. In durchflusszytometrischen Analysen der intrahepatischen Lymphozytenpopulation stellten wir ergänzend fest, dass die Leber im Vergleich zur Milz höhere Frequenzen von CD45RB^{low} Memory-Zellen, blastären Zellen und NK- bzw. NKT-Zellen enthält. Mittels Transfer und Reisolation fluoreszenzmarkierter gemischter Lymphozytenpopulationen konnten wir zeigen, dass die in der Leber stark repräsentierten Zellen auch vermehrt rekrutiert werden, so dass die Annahme nahe liegt, dass diese Zellen auf diesem Weg in die Leber gelangen. Dies steht allerdings im Widerspruch zu bisherigen Modellen über den Ursprung der intrahepatischen Lymphozytenpopulation, deren Zusammensetzung deutlich von der im peripheren Blut oder in lymphatischen Organen abweicht (56, 61). Ein Modell postuliert, dass intrahepatische Lymphozyten, insbesondere NKT- und NK-Zellen, lokal aus intrahepatischen Stammzellen generiert werden und differenzieren. CD34⁺ c-kit⁺ Stammzellen und RAG-1- bzw. RAG-2-Aktivität, als Hinweis auf extrathymische T-Zellreifung, lässt sich in der Tat in der Leber nachweisen. Zudem entwickeln sich in athymischen *Nude*-Mäusen, die keine konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen besitzen, unkonventionelle T-Zellen, die vermehrt in der Leber nachweisbar sind. Obwohl es also Hinweise auf extrathymische T-Zellreifung in der Leber gibt, bedeutet es allerdings nicht zwangsläufig, dass dies unter homöostatischen Bedingungen auch quantitativ passiert. Es scheint sich vielmehr um einen *Back-up*-Mechanismus zu handeln, der beispielsweise unter pathologischen Bedingungen zum Tragen kommt. Darüber hinaus können aus hepatischen Vorläuferzellen in Abwesenheit des Thymus keine konventionellen T-Zellen oder NKT-Zellen differenzieren, was stark gegen eine extrathymische bzw. thymusunabhängige T-Zellreifung in der Leber spricht. Ein Alternativ-

Modell setzt eine Reifung der intrahepatischen Lymphozyten im Thymus voraus, nimmt aber an, dass die Zellen intrahepatisch differenzieren. Dafür sprechen die zahlreichen APC-Populationen in der Leber. Für aktivierte Populationen scheint dies plausibel. Allerdings spricht einiges dagegen, dass intrahepatisches *Priming* unter Normalbedingungen quantitativ zur Population der Leber mit Lymphozyten beiträgt: Es finden sich beispielsweise relativ wenig proliferierende Lymphozyten in der nicht-entzündeten Leber. In **parabiotischen Mäusen** rezirkulierten $CD3^{\text{intermediate}}NK1.1^+$ Zellen nicht. Beobachtungen nach Lebertransplantation zeigen jedoch, dass verschiedenen Donorzellpopulationen aus dem Transplantat in den Rezipientenorganismus migrieren, so dass möglicherweise das Parabiosemodell hier keine verlässlichen Daten liefert. Diesen beiden Modellen stellen wir auf Basis unserer Daten ein Modell der Balancierten Rekrutierung gegenüber. Es postuliert, dass die intrahepatische Lymphozytenpopulation ein Fließgleichgewicht darstellt, das durch Immigration, intrahepatische Modulation und Deletion sowie Emigration permanent überformt und angepasst wird (92).

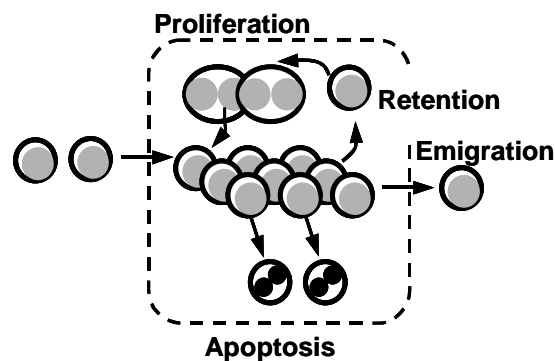


Abbildung 4: Das Modell der Balancierten Rekrutierung, modifiziert nach (92)

3.2) Funktion und Modulation von Th1- und Th2-Effektor-Zellen *in vivo*

3.2.1) Zytokin-produzierende Effektor-Zellen: Vorläufer der *Memory*-Zellen oder terminales Differenzierungsstadium in der Sackgasse?

Im zweiten Teil der Arbeit sollte das Verhalten bzw. Schicksal von Zytokin-produzierenden Effektor-Zellen a) spontan, b) unter immunogenen Bedingungen, und c) nach tolerogener Antigengabe untersucht werden. Im weiteren Verlauf der Differenzierung und der Involution der Effektorphase der Immunantwort geht ein großer Teil der Effektor-Zellen in die Apoptose. Aus einem kleineren Anteil entstehen ohne weitere Zellteilung und teilweise unabhängig von der Interaktion mit MHCII-Molekülen *Memory*-Zellen (CD62L^{negativ}, CD45RB^{low}), die möglicherweise über Jahre oder sogar ein Leben lang persistieren, wie ein Modell der Effektor/*Memory*-Zelldifferenzierung besagt (93-95). Eine alternative Hypothese, die sich auf Beobachtungen an humanen Zellen stützt, postuliert dagegen, dass *Memory*-Zellen nicht direkt aus Effektor-Zellen differenzieren: CCR7⁻ Zytokin-produzierende Effektor-*Memory*-Zellen (T_{EM}) gehen zugrunde. Dagegen besitzen CCR7⁺ zentrale *Memory*-Zellen (T_{CM}) die Fähigkeit, zu sehr langlebigen *Memory*-Zellen weiter zu differenzieren (41, 96, 97).

Um das spontane *in-vivo*-Schicksal von Zytokin-produzierenden Effektor-Zellen zu untersuchen, wurden OVA-spezifische Th1-Zellen *in vitro* polarisiert und durch Rekultur eine hohe Frequenz von IFN γ ⁺ Zellen erzielt. Bereits einen Tag nach adoptivem Transfer in syngene Mäuse zeigte sich eine signifikante Abnahme der IFN γ ⁺ T-Zell-Subfraktion. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die diesen Effekt auch für Th2-Zellen beschrieben hatten (93, 94, 98). Diese Daten erlauben zwei unterschiedliche Interpretationen: Zum einen ist es denkbar, dass Th1-Zellen ihre Zytokinsynthese temporär einstellen und damit zum Phänotyp einer ruhenden Effektor-Zelle zurückkehren. Zum anderen wurde vermutet, dass IFN γ ⁺ Th1-Zellen, als Zytokin-produzierende T_{EM} und damit terminales Differenzierungsstadium in Apoptose gehen und dadurch die Frequenz IFN γ ⁺ Th1-Zellen *in vivo* abnimmt. Evidenz hierfür war, dass mittels Zytokins-Sekretionsassay (99) sortierte IFN γ ⁺ T-Zellen nach adoptivem Transfer aus den lymphatischen Organen verschwanden, wogegen IFN γ ⁻ T-Zellen persistierten (100). Unser Modell basiert auf dem Transfer rekultivierter Th1-Zellen, mit einer Produzentenfrequenz bis zu 90% IFN γ ⁺ (IFN γ ₉₀) Zellen. Da wir in nicht publizierten Voruntersuchungen beobachten konnten, dass IFN γ ⁺-sortierte Zellen vermutlich durch die Oberflächenbeladung mit einem Antikörper ein deutlich geändertes *Homing*-Verhalten und ein schlechteres Langzeitüberleben aufweisen, wurde diese

experimentelle Herangehensweise bewusst gewählt. Durch Vergleich von IFN γ_{50} und IFN γ_{90} Th1-Zellen konnten wir beobachten, dass beide Populationen *in vivo* gleich gut überleben, allerdings Th1-Zellen mit höherer IFN γ -Produzentenfrequenz stärker in der Leber akkumulieren wogegen IFN γ_{50} Th1-Zellen stärker in die Milz wandern. Beide Populationen zeigten unabhängig von einer Antigengabe eine Abnahme der IFN γ^+ Zellen. Ein stärkeres Wachstum von IFN γ^- Th1-Zellen konnten wir durch Korrelation der Zytokinsynthese mit der Zellteilung, gemessen anhand der Reduktion des intrazellulären CFSE-Gehaltes (101), ausschließen.

Unsere Daten deuten eher darauf hin, dass IFN γ^+ Th1-Zellen, die sich nicht nur in den lymphatischen Geweben befinden, ihre Zytokinsynthese temporär abschalten und weniger, dass es sich bei IFN γ^+ und IFN γ^- Effektor-Zellen um distinkte Populationen handelt. Dafür spricht, dass Zytokin-exprimierende und -negative Effektor-Zellen dieselbe Expression von polarisationsspezifischen Markergenen aufweisen (102) und dass epigenetische Modifikationen der Zytokingenloci unabhängig von der aktuellen Zytokinproduktion erhalten bleiben (103, 104).

Als immunogenes System wurde ein Tumormodell, das murine Nierensarkom, genutzt. Dieser Tumor exprimiert das gut charakterisierte immunogene Tumor-spezifische **Neo-Antigen Large T**, das sowohl MHCI- als auch MHCII-Epitope besitzt und nach Vakzinierung eine protektive von CD8 $^+$ und CD4 $^+$ T-Zellen abhängige Immunantwort induziert. Unsere Untersuchungen an diesem Modell zeigten, dass der Tumor *in vivo* sowohl Th1- als auch Th2-Zellen induziert. Um zu untersuchen, welche Populationen protektiv sind, wurden mittels einer Liposomen-basierten Sortierungstechnik anhand der Oberflächenexpression von IFN γ Th1-Zellen (105, 106) *ex vivo* isoliert. Durch adoptiven Transfer von IFN γ^+ und IFN γ^- -depletierten Th2-Zellen konnten wir zeigen, dass sowohl die IFN γ^+ als auch IFN γ^- CD4 $^+$ T-Zellen Immunität übertragen. IL-10 $^+$ CD4 $^+$ T-Zellen sind dagegen vermutlich eher für die Suppression der Immunantwort verantwortlich, da sie sich vermehrt in nicht immunen Mäusen fanden. Dabei scheint die IL-10-vermittelte Inhibition der Generation von Th1-Zellen und der durch CD8 $^+$ T-Zellen bzw. NK-Zellen vermittelten Zytolyse eine Rolle zu spielen (107, 108). Überraschend war, dass sich das Th1/Th2-Paradigma (88, 89), das eine Th1-vermittelte protektive Immunantwort erwarten ließ, nicht bestätigt hat. Der Tumor induzierte sowohl Th1- als auch Th2-Zellen, die beide unabhängig voneinander, wie durch adoptiven Transfer gezeigt, immunogen sind. Unsere Daten mit *ex vivo*-isolierten Th1- und Th2-Zellen bestätigen damit Untersuchungen mit *in vitro*-

polarisierten OVA-spezifischen Th1 und Th2-Zellen, die im adoptiven Transfer die Rejektion eines OVA-exprimierenden Lymphoms vermittelten (109).

Wir konnten Immunität durch den Transfer von Zytokin-produzierenden $\text{IFN}\gamma^+$ Th1-Zellen übertragen. Diese Beobachtung steht damit ebenfalls im Widerspruch zu der Annahmen, dass $\text{IFN}\gamma^+$ T_{EM} terminal differenzierte Zellen darstellen, die *in vivo* in Apoptose gehen und *Memory*-Zellen aus nicht-Zytokin-produzierenden T_{CM} entstehen (41, 96, 97, 100).

3.2.2) Die Leber kann Effektor-Zellen modulieren, intrahepatisches *Priming* von naiven CD4^+ T-Zellen fand sich jedoch nicht in OVA-transgenen Mausmodellen.

Chronische Entzündungen werden von Zytokin-produzierenden Effektor-Zellen und *Memory*-Zellen getragen. Die überwiegende Zahl interventioneller immuntherapeutischer Tiermodelle untersucht jedoch naive T-Zellen, die sich in der Tat bei tolerogener Antigenzufuhr entsprechend modulieren lassen. Grundsätzlich findet man aber in der menschlichen Krankheitssituation Antigen-erfahrene Effektor-Zellen vor. Daher haben wir untersucht, ob, und durch welche Mechanismen Th1- und Th2-Effektor-Zellen durch tolerogene Antigenzufuhr moduliert werden können.

Hierzu haben wir als Modellantigen OVA gewählt, das ein Neo-Antigen darstellt und für das es zahlreiche Mausmodelle TCR-transgener Stämme gibt. *In vitro* Antigen-spezifisch polarisierte Th1- und Th2-Zellen wurden adoptiv in syngene Tiere transferiert. Anschließend wurde OVA intravenös als Hochdosis appliziert, ein Modell, das in Anwesenheit naiver CD4^+ T-Zellen zu Toleranzinduktion durch Deletion führt (6). Die in Abschnitt 1 gezeigten Untersuchungen hatten ergeben, dass Effektor-Zellen stark in die Leber rekrutiert werden. In der Tat wurden vergleichbare Donorzellzahlen nicht nur aus den lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten, sondern auch aus der Leber isoliert. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und eigenen Voruntersuchungen konnten wir beobachten, dass Th1- und Th2-Zellen spontan länger als naive CD4^+ T-Zellen *in vivo* persistieren. Dabei war eine Reduktion der Frequenz der Zytokinproduzenten und der Expression von Aktivierungsmarkern auf den T-Zellen festzustellen war, also eine Reversion zum „quasi-naiven“ Phänotyp einer ruhenden Effektor-Zelle (93, 94, 98). Lediglich IL-4^+ Th2-Zellen ließen sich noch bis zu 25 Tagen nach Transfer in der Leber nachweisen.

Nach tolerogener Antigengabe expandierten vor allem Th1-Zellen zunächst in allen Organen. Analog zu naiven CD4^+ T-Zellen folgte jedoch auf die Expansionsphase eine deutliche

Reduktion der Frequenz der Donorzellen. Parallel ließen sich vor allem in der Leber Annexin-V-bindende, also in Apoptose befindliche Donorzellen, beobachten. Betrachtet man den Netto-Effekt der Reduktion der Zytokinsynthese und der Zellzahl, so zeigte sich lediglich in der Leber, nicht aber in Lymphknoten und Milz, auch Antigen-unabhängig, ein signifikantes Überwiegen von IL-4⁺ im Vergleich zu IFN γ ⁺ Donorzellen. Der Zytokinphänotyp der einzelnen Donorzelle blieb jedoch unverändert, es fanden sich keine Hinweise für die Induktion von IL-10⁺ oder IL-4⁺ Zellen.

Um näher zu bestimmen, ob und welche hepatischen APC an der intrahepatischen Th1/Th2-Balance und der Induktion der Apoptose beteiligt sind, wurden LSEC mit OVA-spezifischen Th1- und Th2-Zellen Antigen-spezifisch ko-kultiviert. LSEC förderten eher das Wachstum von IL-4⁺ Zellen, wogegen IFN γ ⁺ Zellen stärker auf Milz-APC expandierten. Allerdings zeigten Th1 und Th2-Zellen die gleiche Apoptoserate nach Ko-Kultur auf LSEC und Milz-APC.

Zusammengefasst legen unsere Daten nahe, dass LSEC ein eher anti-inflammatorisches Th2-Milieu begünstigen. Damit scheint die Leber die Th1/Th2-Balance eher in Richtung von Th2 zu verschieben. Hinweise für eine Antigen-abhängige Immundeviation fanden sich allerdings nicht. Die Tatsache, dass zahlreiche apoptotische Donorzellen in der Leber nachweisbar waren, suggeriert, dass die Leber durch Induktion von Apoptose eine Antigen-abhängige Deletion von Effektor-Zellen induziert. Allerdings scheint dies nicht durch LSEC vermittelt, so dass, wie bereits für CD8⁺ T-Zellen vermutet (110), professionelle Leber-APC wie z.B. Kupffer-Zellen für die Induktion von Apoptose verantwortlich sein könnten.

In einem Kooperationsprojekt mit Dr. E. Schott (Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin) wurde anschließend ergänzend untersucht, inwieweit auch naive CD4⁺ T-Zellen, verglichen mit Effektor-Zellen, eine hepatisch exprimierte Antigen erkennen können und ob diese Interaktion zum *Priming* der CD4⁺ T-Zellen oder eher zu Toleranz führt. Als Modellantigen diente OVA, das sowohl ein durch MHCI (SINFEKL/H-2^b) als auch ein im MHCII-Kontext (ISQAVHAAHAEINEAGR/I-A^b) präsentierte Peptidantigen umfasst. Es standen entsprechende TCR-transgene Mauslinien zur Verfügung, deren CD8⁺ (OT-I) (111) oder CD4⁺ T-Zellen (OT-II) (112) für diese Peptide spezifisch sind. Um eine leberspezifische Expression des Antigens zu erzielen, wurde OVA entweder unter dem Hepatozyten-spezifischen Transferrin- oder dem Gallenwegsepithel-spezifischen ASBT-Promotor exprimiert. Um die systemische Verteilung des Antigens durch Sekretion zu minimieren, wurde OVA an die transmembranäre Domäne des Transferrin-Rezeptors gekoppelt, um so

eine Membranständigkeit zu erreichen. Wie erwartet, zeigte sich sowohl auf RNA-Ebene in der PCR als auch auf Proteinebene im Western Blot und in der Histologie eine alleinige Expression des Antigens in der Leber OVA-transgener Tiere. Über die Kooperation standen uns diese Modelle zur Verfügung. Nach adoptivem Transfer in TFR-OVA Mäuse fanden sich nach zwei Tagen proliferierende OVA-spezifische CD4⁺ T-Zellen sowohl in lymphatischen Organen als auch in der Leber. In Ko-Kulturexperimenten induzierten *ex vivo*-isolierte Zellen aus verschiedenen Organen der TFR-OVA Mäuse Proliferation bei OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Daher ist nicht sicher auszuschließen, dass das *in vivo* zu beobachtende *Priming* durch APC aus anderen, lymphatischen Organen induziert wird. In ASBT-OVA Mäusen ließ sich überhaupt keine Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nachweisen. In beiden Modellen verursachten transferierte CD4⁺ T-Zellen keine entzündlichen Infiltrate.

Generell lassen diese Daten vorerst nicht den Schluss zu, dass unter homöostatischen Bedingungen in der Leber *in vivo* signifikant naive CD4⁺ T-Zellen tolerogen oder immunogen geprimt werden. Ein möglicher Grund wäre, dass die Zellen, wie in Abschnitt 1 beschrieben, nur zu einem geringen Teil adhären und rasch das Organ verlassen. Inwieweit sich dies, wie für CD8⁺ T-Zellen gezeigt, unter lokaler Antigenexpression ändert, ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen. Gesamt-Leber-APC enthalten eine große Zahl an LSEC, die wiederum ein geringe MHCII-Expression und schwache Expression ko-stimulatorischer Moleküle aufweisen. Auch dies könnte für das ausbleibende *Priming* ursächlich sein. Modelle mit selektiverer Antigenexpression sind erforderlich, wobei dies aufgrund der Mobilität und Heterogenität der MHCII⁺ Leber-APC experimentell schwierig umzusetzen ist.

3.2.3) Die Leber: *Graveyard*, *Responder trap* oder Ort Antigen-spezifischer Modulation von T-Zellen?

Die sogenannte *Graveyard*-Hypothese postuliert, dass in Apoptose befindliche Zellen in der Leber aufgenommen und abgebaut werden. Dafür spricht, dass in der Fas^{lpr}-Maus, in der Fas unterexprimiert und folglich die Apoptose aktivierter T-Zellen eingeschränkt ist, diese Zellen in der Leber akkumulieren und eine Lymphadenopathie entsteht (68, 113, 114). Das *Responder-trap*-Modell dagegen besagt, dass aktivierte T-Zellen in der Leber aufgenommen werden und dort durch Interaktion mit residenten Populationen in die Apoptose gebracht werden. Beide Hypothesen nehmen primär Antigen-unabhängige Mechanismen der intrahepatischen T-Zellmodulation an (115). Es gibt jedoch sehr gute Evidenzen, dass die

Leber auch über Antigen-spezifische Modulationsmechanismen verfügt. Für MHC-I-Antigene konnte gezeigt werden, dass selektive (induzierbare) Expression in der Leber zu Toleranz durch TCR-Herunterregulation (69), Deletion (70, 71) oder Anergie führt (72). Selektive Antigenexpression auf LSEC war sogar ausreichend für die Induktion oraler Toleranz bei naiven CD8⁺ T-Zellen (116). Nach oraler Antigengabe fanden sich besonders in der Leber regulatorische bzw. IL-4⁺ CD4⁺ T-Zellen (9, 117). Zudem gibt es ältere Untersuchungen an der Ratte, die nahe legen, dass die Leber für die Induktion insbesondere von oraler Toleranz wichtig ist (118-121). Vor dem Hintergrund unserer Daten favorisieren wir ein Modell, das eine Modulation oder Deletion vor allem Antigen-erfahrener, aktivierter oder Effektor/*Memory* T-Zellen, durch intrahepatische Präsentation eines z.B. auch oral aufgenommenen Antigens auf hepatischen APC-Populationen annimmt.

3.3) Zusammenfassende Betrachtung: Das Migrationsverhalten verschiedener CD4⁺ T-Zellpopulationen spielt eine Rolle für die Modulation dieser Zellen

Naive CD4⁺ T-Zellen rezirkulieren in lymphatische Organe und werden unter homöostatischen Bedingungen nur zu einem sehr kleinen Teil in der Leber zurückgehalten. Für naive CD4⁺ T-Zellen scheinen folglich die lymphatischen Organe primär nicht nur der Ort des *Priming* sondern nach entsprechender Antigengabe (28, 29) auch der Toleranzinduktion zu sein. Während Peyer'sche Plaques offenbar für orale Toleranz nicht zwingend erforderlich sind, scheinen mesenteriale Lymphknoten unabdingbar zu sein (30, 31). Eine neuere Arbeit untermauert diese Annahme: Werden naive CD4⁺ T-Zellen an ihrer Rezirkulation und Immigration in die mesenterialen Lymphknoten gehindert, kann keine orale Toleranz mehr induziert werden (27). Übereinstimmend konnten wir kein *Priming* naiver CD4⁺ T-Zellen durch ein in der Leber exprimiertes Antigen beobachten.

Zusammengefasst, sind Immunreaktionen bedingt durch die Migration der T-Zellen und den Weg des Antigens dahingehend kompartmentalisiert, dass naive und Antigen-erfahrene CD4⁺ T-Zellen mutmaßlich in unterschiedlichen Geweben moduliert werden.

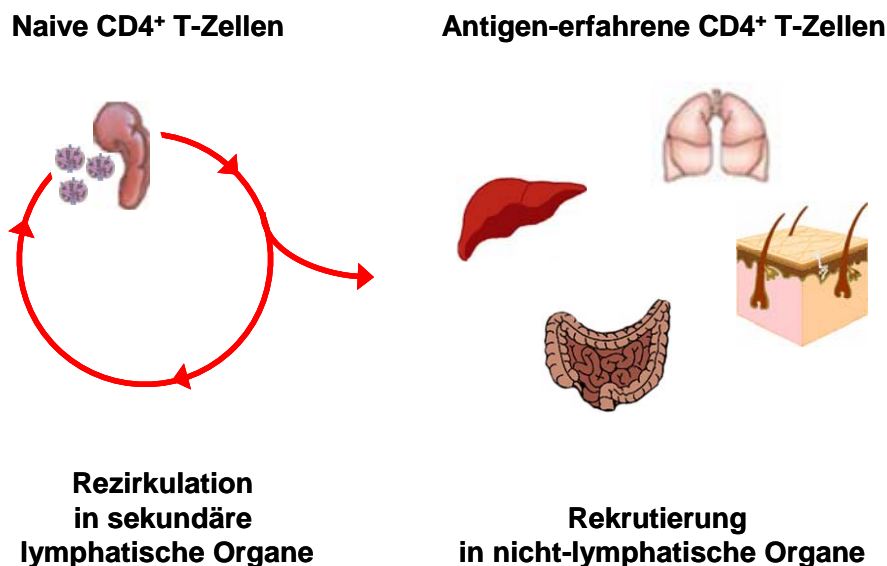


Abbildung 5: Migration von naiven und Antigen-erfahrenen Zellen

Unsere Daten zeigen, dass Antigen-erfahrene CD4⁺ T-Zellen eher in parenchymatöse Organe, insbesondere in die Leber, wandern. Da oral aufgenommenes Antigen auch in Form größerer Peptide über die Pfortader in die Leber gelangt (25, 122), ist anzunehmen, dass immigrierte

T-Zellen lokal mit LSEC und Kupffer-Zellen interagieren können. Diese Vorgänge könnten eine Rolle für die Aufrechterhaltung der Toleranz beispielsweise gegen die eigene Darmflora und harmlose Nahrungsantigene spielen (123, 124). Umgekehrt fanden sich keine Hinweise auf ein *in vivo*-Priming von naiven CD4⁺ T-Zellen in der gesunden Leber.

Einblicke in die Vorgänge, die die intrahepatische immunologische Balance von Toleranz zu (Auto-)Immunität verändern, würden wichtige Hinweise liefern zum einen für die Pathogenese von Autoimmunhepatitis oder Kolitis und, als Ausblick, auch organspezifische therapeutische Ansatzpunkte aufzeigen.

4) Zusammenfassung

Die Rekrutierung von T-Zellen spielt eine entscheidende Rolle für die Kompartimentalisierung des Immunsystems: Antigenpräsentation und Aktivierung finden in sekundären lymphatischen Organen statt, im entzündlich veränderten Gewebe werden Effektorfunktionen ausgeübt. In der Mukosa, und vermutlich auch in der Leber, werden immunmodulatorische Vorgänge vermittelt.

Da Einwanderung in die Leber damit eine Voraussetzung für konsekutive Modulation darstellt, wurde im ersten Abschnitt der Arbeit das Wanderungsverhalten von $CD4^+$ T-Zellen analysiert. Wir konnten in der Intravitalmikroskopie und im *Homing*-Versuch mit radioaktiver Markierung zeigen, dass aktivierte $CD4^+$ T-Zellen in die Leber einwandern, während naive $CD4^+$ T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe rezirkulieren. Dabei akkumulierten aktivierte $CD4^+$ T-Zellen, vermutlich bedingt durch eine differentielle endotheliale Rezeptorausstattung im Leberläppchen, nahezu ausschließlich im Periportalfeld. Auch Th1-Zellen und Th2-Effektor-Zellen fanden sich anders als naive $CD4^+$ T-Zellen präferentiell in der Leber. Sie verteilten sich allerdings überall im Leberläppchen. Th1-Zellen wurden dabei stärker als Th2-Zellen zurückgehalten, was die Bedeutung des Zytokinphänotyps für die Rekrutierung unterstreicht. Neben der Aktivierung, der Differenzierung in Effektor/*Memory*-Zellen und dem Zytokinphänotyp spielt auch die Präsenz des Antigens selbst zumindest für die Rekrutierung von $CD8^+$ T-Zellen in der Leber eine Rolle. Allerdings ist die TCR-MHC-Bindung alleine nicht ausreichend. Die zusätzliche Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 stellt eine notwendige Voraussetzung dar. Im Gegensatz zu $CD8^+$ T-Zellen ist es uns dagegen nicht gelungen, für die Rekrutierung von aktivierten oder $CD4^+$ Effektor-T-Zellen in die gesunde Leber essentielle Adhäsionsmoleküle zu identifizieren. Ein möglicher Grund ist, dass viele Rezeptor-Ligand-Paare redundant oder im Leberläppchen differentielle exprimiert sind.

Insgesamt zeigten T-Zellen, die in der intrahepatischen Lymphozytenpopulation stark repräsentiert sind, eine präferentielle Rekrutierung. Wir formulierten daher das Modell der Balancierten Rekrutierung. Es postuliert, dass die intrahepatische Lymphozytenpopulation kontinuierlich durch Immigration, Emigration und intrahepatische Modulation bzw. Deletion geformt wird.

Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob und durch welche Signale Antigen-erfahrene Zellen moduliert werden können. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, welches *in vivo* Schicksal Effektor-Zellen spontan, unter immunogener oder tolerogener Antigenzufuhr haben.

Adoptiv transferierte *in vitro*-polarisierte Th1-Zellen zeigten spontan eine zeitabhängige Abnahme des Prozentsatzes IFN γ ⁺ Zellen. Da Populationen mit höherer (90%) und niedrigerer (50%) IFN γ ⁺ Zytokinproduzentenfrequenz *in vivo* identisch überlebten und Nicht-Produzenten keine stärkere Zellteilung aufwiesen, nehmen wir an, dass die Zytokinsynthese auf Einzelzellebene herunterreguliert wird und die Zellen zu einem „quasi-naiven“ Phänotyp zurückkehren. Mittels adoptivem Transfer IFN γ ⁺ *ex vivo*-sortierter Th1-Zellen konnten wir darüber hinaus nachweisen, dass diese Zellen in der Lage sind, Immunität gegen einen Tumor zu vermitteln. Das T_{CM}/T_{EM}-Paradigma postuliert eine *Memory*-Zellgeneration aus IFN γ ⁺ Effektor-Zellen bzw. T_{CM} wogegen IFN γ ⁺ Zellen als T_{EM} terminal differenziert sind und *in vivo* zugrunde gehen. Unsere Daten sprechen eher für die Alternativhypothese die besagt, dass Effektor-Zellen temporär ihre Zytokinsynthese einstellen und zu *Memory*-Zellen differenzieren können.

Nach adoptivem Transfer von Th1- und Th2-Zellen und tolerogener Antigenapplikation erfolgte nach einer Expansionsphase eine Zunahme apoptotischer Zellen in der Leber, die für eine intrahepatische Deletion spricht. Während Th1-Zellen eine Abnahme der IFN γ ⁺ Subpopulation zeigten, persistierten IL-4⁺ Th2-Zellen vor allem in der Leber. Eine Immundeviation ließ sich in diesem Modell nicht induzieren. Die *in vitro*-Ko-Kultur erbrachte Hinweise, dass die Leber möglicherweise aktiv partizipiert: LSEC förderten das Wachstum von Th2-Zellen, wogegen Th1-Zellen weniger stark expandierten. Die Akkumulation von Zellen, die Zeichen der Apoptose zeigen, in der Leber hat zu der Vermutung Anlass gegeben, dass die Leber passiv sterbende Zellen abräumt. Dagegen gibt es Evidenzen, dass in der Leber selbst auch Apoptose bei aktivierten T-Zellen über Fas/Fas-Ligand-Interaktion induziert werden kann. Unserer Daten legen zudem die Annahme nahe, dass die Leber möglicherweise sogar Antigen-spezifisch T-Zellen modulieren kann.

Zusammenfassend formulieren wir ein Modell, das eine Kompartimentalisierung des Immunsystems zugrunde legt: während naive CD4⁺ T-Zellen in lymphatische Organe migrieren und dort immunogene bzw. tolerogene Signale empfangen, werden Antigen-erfahrenen CD4⁺ T-Zellen in die Leber rekrutiert, wo sie durch Interaktion mit APC moduliert oder deletiert werden.

Man könnte spekulieren, dass eine gestörte hepatische Deletion von Effektor-Zellen beispielsweise über eine Aktivierung von tolerogenen Leber-APC zu einem immunogenen Phänotyp zu einem hepatischen *Priming* von naiven T-Zellen führen könnte. Diese Vorgänge

könnten relevant sein für die Entstehung oder fehlende Suppression von Autoimmunität z.B. bei Autoimmunhepatitis oder systemischer Entzündungsvorgänge.

5) Glossar

Adoptiver Transfer	Gabe von Zellen in die syngene Maus mit dem Ziel u.a. die Funktion dieser Zellen näher zu untersuchen
Apoptose	programmierter Zelltod
Inzuchtmäuse	eine durch Geschwisterverpaarung entstandene Linie, bei der alle Individuen denselben Haplotyp haben
Homing	Migration einer Zelle zurück zu ihrem Ursprungsort
Homing-Phänotyp	Gesamtheit der Migrationseigenschaften einer Zelle mit daraus resultierender Gewebsverteilung
Lineage commitment	Determinierung einer T-Zelle für einen bestimmten Differenzierungsweg
Haplotyp	Gesamtheit des MHC der Maus, insgesamt 5 Merkmale: K, D und L im MHCI und A und I im MHCII
Neo-Antigen	Antigen, das nicht im Thymus exprimiert wird und gegen das daher keine zentrale Toleranz induziert werden konnte
Parabiotische Mäuse	Tiere mit experimenteller Verbindung beider Zirkulationen
Priming	Folgen des Antigenerstkontakt der naiven T-Zelle
Rolling	Bewegung entlang des Endothel mit einer Geschwindigkeit, die geringer als der Blutfluss ist
Shear stress	Scherkräfte, die auf Zellen in der Zirkulation einwirken
Syngen	Mäuse mit demselben Haplotyp
TCR-transgen	für eine bestimmte Spezifität bereits fertig rekombinierte α - und β -Ketten des T-Zellrezeptors
Trapping	größenbedingtes unspezifisches Steckenbleiben von Zellen in der Zirkulation; Gegensatz zur spezifischen Rekrutierung

6) Abkürzungsverzeichnis

AIRE	Autoimmune regulator
APC	Antigen-presenting cell
ASBT	Apical sodium-dependent bile duct transporter
CCR	C-C motif chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidylester
E-, L-, P-Selektin	Endothelial-, leukocyte-, platelet-selectin
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFNγ	Interferon γ
IL	Interleukin
LFA-1	Leukocyte function antigen-1
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cell
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Natural killer cell
NKT	Natural killer T cell
OVA	Ovalbumin
RAG	Recombinase-activated gene
T_{CM}	T central memory
TCR	T cell receptor
T_{EM}	T effector memory
TFR	Transferrin receptor
TGFβ	Transforming growth factor β
Th	T helper cell
VAP-1	Vascular adhesion protein-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

7) Literatur

1. Gallucci, S., and P. Matzinger. 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:114-119.
2. Anderson, M. S., E. S. Venanzi, Z. Chen, S. P. Berzins, C. Benoist, and D. Mathis. 2005. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23:227-239.
3. Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298:1395-1401.
4. DeVoss, J., Y. Hou, K. Johannes, W. Lu, G. I. Liou, J. Rinn, H. Chang, R. R. Caspi, L. Fong, and M. S. Anderson. 2006. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med* 203:2727-2735.
5. Murphy, K. M., A. B. Heimberger, and D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250:1720-1723.
6. Kearney, E. R., K. A. Pape, D. Y. Loh, and M. K. Jenkins. 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1:327-339.
7. Pape, K. A., E. R. Kearney, A. Khoruts, A. Mondino, R. Merica, Z. M. Chen, E. Ingulli, J. White, J. G. Johnson, and M. K. Jenkins. 1997. Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo. *Immunol Rev* 156:67-78.
8. Malvey, E. N., M. K. Jenkins, and D. L. Mueller. 1998. Peripheral immune tolerance blocks clonal expansion but fails to prevent the differentiation of Th1 cells. *J Immunol* 161:2168-2177.
9. Zhang, X., L. Izikson, L. Liu, and H. L. Weiner. 2001. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 167:4245-4253.
10. Thorstenson, K. M., and A. Khoruts. 2001. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 167:188-195.
11. James, M. J., L. Belaramani, K. Prodromidou, A. Datta, S. Nourshargh, G. Lombardi, J. Dyson, D. Scott, E. Simpson, L. Cardozo, A. Warrens, R. M. Szydlo, R. I. Lechler, and F. M. Marelli-Berg. 2003. Anergic T cells exert antigen-independent inhibition of cell-cell interactions via chemokine metabolism. *Blood* 102:2173-2179.
12. Lakkis, F. G., A. Arakelov, B. T. Konieczny, and Y. Inoue. 2000. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 6:686-688.
13. Heath, W. R., J. Allison, M. W. Hoffmann, G. Schonrich, G. Hammerling, B. Arnold, and J. F. Miller. 1992. Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 359:547-549.
14. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
15. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling

- autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.
16. Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyrna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13031-13036.
 17. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
 18. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta- secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
 19. Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3:331-341.
 20. Weiner, H. L. 1997. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 18:335-343.
 21. Jenkins, M. K. 1992. The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol Today* 13:69-73.
 22. Jenkins, M. K., D. M. Pardoll, J. Mizuguchi, H. Quill, and R. H. Schwartz. 1987. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol Rev* 95:113-135.
 23. Pape, K. A., A. Khoruts, E. Ingulli, A. Mondino, R. Merica, and M. K. Jenkins. 1998. Antigen-specific CD4+ T cells that survive after the induction of peripheral tolerance possess an intrinsic lymphokine production defect. *Novartis Found Symp* 215:103-113; discussion 113-109, 186-190.
 24. Pape, K. A., R. Merica, A. Mondino, A. Khoruts, and M. K. Jenkins. 1998. Direct evidence that functionally impaired CD4+ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance. *J Immunol* 160:4719-4729.
 25. Brandtzaeg, P. 1996. History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci* 778:1-27.
 26. Mitchison, A., and J. Sieper. 1995. Immunological basis of oral tolerance. *Z Rheumatol* 54:141-144.
 27. Worbs, T., U. Bode, S. Yan, M. W. Hoffmann, G. Hintzen, G. Bernhardt, R. Forster, and O. Pabst. 2006. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203:519-527.
 28. Kunkel, D., D. Kirchhoff, S. Nishikawa, A. Radbruch, and A. Scheffold. 2003. Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur J Immunol* 33:1292-1301.
 29. Kunkel, D., D. Kirchhoff, R. Volkmer-Engert, A. Radbruch, and A. Scheffold. 2003. Sensitive visualization of peptide presentation in vitro and ex vivo. *Cytometry A* 54:19-26.
 30. Spahn, T. W., A. Fontana, A. M. Faria, A. J. Slavin, H. P. Eugster, X. Zhang, P. A. Koni, N. H. Ruddle, R. A. Flavell, P. D. Rennert, and H. L. Weiner. 2001. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* 31:1278-1287.
 31. Spahn, T. W., H. L. Weiner, P. D. Rennert, N. Luger, A. Fontana, W. Domschke, and T. Kucharzik. 2002. Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* 32:1109-1113.
 32. Parrott, D. M., and P. C. Wilkinson. 1981. Lymphocyte locomotion and migration. *Prog Allergy* 28:193-284.

33. Smith, M. E., A. F. Martin, and W. L. Ford. 1980. Migration of lymphoblasts in the rat. Preferential localization of DNA- synthesizing lymphocytes in particular lymph nodes and other sties. *Monogr Allergy* 16:203-232.
34. Smith, M. E., A. F. Martin, and W. L. Ford. 1980. Migration of lymphoblasts in the rat. *Monogr. Allergy* 16:203-232.
35. Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.
36. Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
37. Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
38. Steeber, D. A., N. E. Green, S. Sato, and T. F. Tedder. 1996. Lyphocyte migration in L-selectin-deficient mice. Altered subset migration and aging of the immune system. *J Immunol* 157:1096-1106.
39. Berlin-Rufenach, C., F. Otto, M. Mathies, J. Westermann, M. J. Owen, A. Hamann, and N. Hogg. 1999. Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1- deficient mice. *J Exp Med* 189:1467-1478.
40. Sligh, J. E., Jr., C. M. Ballantyne, S. S. Rich, H. K. Hawkins, C. W. Smith, A. Bradley, and A. L. Beaudet. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8529-8533.
41. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions [see comments]. *Nature* 401:708-712.
42. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
43. Schaerli, P., and B. Moser. 2005. Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res* 31:57-74.
44. Hamann, A., and P. Jonas. 1996. Lymphocyte migration *in vivo*: the mouse model. In *Immunology Methods Manual*. I. Lefkovits, ed. Academic Press, London. 1333-1341.
45. Tietz, W., and A. Hamann. 1997. The migratory behavior of murine CD4+ cells of memory phenotype. *Eur J Immunol* 27:2225-2232.
46. Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Lohning, R. Brauer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch, and A. Hamann. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflammed tissues. *Nature* 385:81-83.
47. Keir, M. E., S. C. Liang, I. Guleria, Y. E. Latchman, A. Qipo, L. A. Albacker, M. Koulmanda, G. J. Freeman, M. H. Sayegh, and A. H. Sharpe. 2006. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203:883-895.
48. Butcher, E. C., M. Williams, K. Youngman, L. Rott, and M. Briskin. 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72:209-253.
49. Starzl, T. E., A. J. Demetris, N. Murase, S. Ildstad, C. Ricordi, and M. Trucco. 1992. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 339:1579-1582.
50. Starzl, T. E., A. J. Demetris, M. Trucco, N. Murase, C. Ricordi, S. Ildstad, H. Ramos, S. Todo, A. Tzakis, J. J. Fung, and et al. 1993. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 17:1127-1152.
51. Starzl, T. E., A. J. Demetris, M. Trucco, H. Ramos, A. Zeevi, W. A. Rudert, M. Kocova, C. Ricordi, S. Ildstad, and N. Murase. 1992. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 340:876-877.

52. Dahmen, U., S. Qian, A. S. Rao, A. J. Demetris, F. Fu, H. Sun, L. Gao, J. J. Fung, and T. E. Starzl. 1994. Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice. *Transplantation* 58:1-8.
53. Qian, S., A. J. Demetris, N. Murase, A. S. Rao, J. J. Fung, and T. E. Starzl. 1994. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 19:916-924.
54. Qian, S., L. Lu, F. Fu, Y. Li, W. Li, T. E. Starzl, J. J. Fung, and A. W. Thomson. 1997. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 158:4654-4661.
55. Qian, S. G., J. J. Fung, A. V. Demetris, S. T. Ildstad, and T. E. Starzl. 1991. Orthotopic liver transplantation in the mouse. *Transplantation* 52:562-564.
56. Doherty, D. G., S. Norris, L. Madrigal-Estebas, G. McEntee, O. Traynor, J. E. Hegarty, and C. O'Farrelly. 1999. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 163:2314-2321.
57. Doherty, D. G., and C. O'Farrelly. 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol* 174:5-20.
58. O'Farrelly, C., and I. N. Crispe. 1999. Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system. *Immunol Today* 20:394-398.
59. Emoto, M., and S. H. Kaufmann. 2003. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol* 24:364-369.
60. Emoto, M., Y. Emoto, and S. H. Kaufmann. 1995. IL-4 producing CD4+ TCR alpha beta int liver lymphocytes: influence of thymus, beta 2-microglobulin and NK1.1 expression. *Int Immunol* 7:1729-1739.
61. Crispe, I. N., and W. Z. Mehal. 1996. Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today* 17:522-525.
62. Crispe, I. N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3:51-62.
63. Lalor, P. F., P. Shields, A. Grant, and D. H. Adams. 2002. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 80:52-64.
64. Ohteki, T., R. Okuyama, S. Seki, T. Abo, K. Sugiura, A. Kusumi, T. Ohmori, H. Watanabe, and K. Kumagai. 1992. Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J Immunol* 149:1562-1570.
65. Shimizu, T., S. Sugahara, H. Oya, S. Maruyama, M. Minagawa, M. Bannai, K. Hatakeyama, and T. Abo. 1999. The majority of lymphocytes in the bone marrow, thymus and extrathymic T cells in the liver are generated in situ from their own preexisting precursors. *Microbiol Immunol* 43:595-608.
66. Taniguchi, H., T. Toyoshima, K. Fukao, and H. Nakauchi. 1995. Evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Transplant Proc* 27:196-199.
67. Watanabe, H., C. Miyaji, S. Seki, and T. Abo. 1996. c-kit+ stem cells and thymocyte precursors in the livers of adult mice. *J Exp Med* 184:687-693.
68. Huang, L., G. Soldevila, M. Leeker, R. Flavell, and I. N. Crispe. 1994. The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1:741-749.
69. Ferber, I., G. Schonrich, J. Schenkel, A. L. Mellor, G. J. Hammerling, and B. Arnold. 1994. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 263:674-676.

70. Bertolino, P., W. R. Heath, C. L. Hardy, G. Morahan, and J. F. Miller. 1995. Peripheral deletion of autoreactive CD8⁺ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *Eur J Immunol* 25:1932-1942.
71. Bertolino, P., D. G. Bowen, G. W. McCaughan, and B. Fazekas De St Groth. 2001. Antigen-specific primary activation of cd8(+) t cells within the liver. *J Immunol* 166:5430-5438.
72. Limmer, A., J. Ohl, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold, and P. A. Knolle. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat* 6:1348-1354.
73. Khanna, A., A. E. Morelli, C. Zhong, T. Takayama, L. Lu, and A. W. Thomson. 2000. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J* 164:1346-1354.
74. Thomson, A. W., and L. Lu. 1999. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* 20:27-32.
75. Katz, S. C., V. G. Pillarisetty, J. I. Bleier, A. B. Shah, and R. P. DeMatteo. 2004. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J Immunol* 173:230-235.
76. Knolle, P. A., E. Schmitt, S. Jin, T. Germann, R. Duchmann, S. Hegenbarth, G. Gerken, and A. W. Lohse. 1999. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen- presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116:1428-1440.
77. Vinas, O., R. Bataller, P. Sancho-Bru, P. Gines, C. Berenguer, C. Enrich, J. M. Nicolas, G. Ercilla, T. Gallart, J. Vives, V. Arroyo, and J. Rodes. 2003. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 38:919-929.
78. Winau, F., G. Hegasy, R. Weiskirchen, S. Weber, C. Cassan, P. A. Sieling, R. L. Modlin, R. S. Liblau, A. M. Gressner, and S. H. Kaufmann. 2007. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26:117-129.
79. Luettig, B., L. Pape, U. Bode, E. B. Bell, S. M. Sparshott, S. Wagner, and J. Westermann. 1999. Naive and memory T lymphocytes migrate in comparable numbers through normal rat liver: activated T cells accumulate in the periportal field. *J Immunol* 163:4300-4307.
80. Mehal, W. Z., A. E. Juedes, and I. N. Crispe. 1999. Selective retention of activated CD8⁺ T cells by the normal liver. *J Immunol* 163:3202-3210.
81. Emoto, M., H. W. Mittrucker, R. Schmits, T. W. Mak, and S. H. Kaufmann. 1999. Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4⁺NKT cells. *J Immunol* 162:5094-5098.
82. Emoto, M., M. Miyamoto, K. Namba, R. Schmits, N. Van Rooijen, E. Kita, and S. H. Kaufmann. 2000. Participation of leukocyte function-associated antigen-1 and NK cells in the homing of thymic CD8⁺NKT cells to the liver. *Eur J Immunol* 30:3049-3056.
83. Miyamoto, M., M. Emoto, V. Brinkmann, N. van Rooijen, R. Schmits, E. Kita, and S. H. Kaufmann. 2000. Cutting edge: contribution of NK cells to the homing of thymic CD4⁺NKT cells to the liver. *J Immunol* 165:1729-1732.
84. Wong, J., B. Johnston, S. S. Lee, D. C. Bullard, C. W. Smith, A. L. Beaudet, and P. Kubes. 1997. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* 99:2782-2790.
85. Salmi, M., S. Tohka, E. L. Berg, E. C. Butcher, and S. Jalkanen. 1997. Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) mediates lymphocyte subtype- specific, selectin-

- independent recognition of vascular endothelium in human lymph nodes. *J Exp Med* 186:589-600.
86. McNab, G., J. L. Reeves, M. Salmi, S. Hubscher, S. Jalkanen, and D. H. Adams. 1996. Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium. *Gastroenterology* 110:522-528.
 87. Lalor, P. F., S. Edwards, G. McNab, M. Salmi, S. Jalkanen, and D. H. Adams. 2002. Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* 169:983-992.
 88. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
 89. Mosmann, T. R., and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [see comments]. *Immunol Today* 17:138-146.
 90. Allen, J. E., and R. M. Maizels. 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? [see comments]. *Immunol Today* 18:387-392.
 91. Bonder, C. S., M. U. Norman, M. G. Swain, L. D. Zbytnuik, J. Yamanouchi, P. Santamaria, M. Ajuebor, M. Salmi, S. Jalkanen, and P. Kubes. 2005. Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* 23:153-163.
 92. Klugewitz, K., D. H. Adams, M. Emoto, K. Eulenburg, and A. Hamann. 2004. The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends Immunol* 25:590-594.
 93. Swain, S. L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors [see comments]. *Science* 286:1381-1383.
 94. Swain, S. L. 1994. Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity* 1:543-552.
 95. Hu, H., G. Huston, D. Duso, N. Lepak, E. Roman, and S. L. Swain. 2001. CD4+ T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nat Immunol* 2:705-710.
 96. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17:326-332.
 97. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 2001. Exploring pathways for memory T cell generation. *J Clin Invest* 108:805-806.
 98. Swain, S. L. 2000. CD4 T-cell memory can persist in the absence of class II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:407-411.
 99. Manz, R., M. Assenmacher, E. Pfluger, S. Miltenyi, and A. Radbruch. 1995. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1921-1925.
 100. Wu, C. Y., J. R. Kirman, M. J. Rotte, D. F. Davey, S. P. Perfetto, E. G. Rhee, B. L. Freidag, B. J. Hill, D. C. Douek, and R. A. Seder. 2002. Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nat Immunol* 3:852-858.
 101. de St Groth, B. F., A. L. Smith, W. P. Koh, L. Girgis, M. C. Cook, and P. Bertolino. 1999. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester and the virgin lymphocyte: a marriage made in heaven. *Immunol Cell Biol* 77:530-538.
 102. Cao, W., Y. Chen, S. Alkan, A. Subramaniam, F. Long, H. Liu, R. Diao, T. Delohery, J. McCormick, R. Chen, D. Ni, P. S. Wright, X. Zhang, S. Busch, and A. Zilberstein. 2005. Human T helper (Th) cell lineage commitment is not directly linked to the secretion of IFN-gamma or IL-4: characterization of Th cells isolated by FACS based on IFN-gamma and IL-4 secretion. *Eur J Immunol* 35:2709-2717.

103. Fields, P. E., S. T. Kim, and R. A. Flavell. 2002. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol* 169:647-650.
104. Guo, L., J. Hu-Li, and W. E. Paul. 2004. Probabilistic regulation of IL-4 production in Th2 cells: accessibility at the Il4 locus. *Immunity* 20:193-203.
105. Assenmacher, M., A. Scheffold, J. Schmitz, J. A. Segura Checa, S. Miltenyi, and A. Radbruch. 1996. Specific expression of surface interferon-gamma on interferon-gamma producing T cells from mouse and man. *Eur J Immunol* 26:263-267.
106. Scheffold, A., M. Assenmacher, L. Reiners-Schramm, R. Lauster, and A. Radbruch. 2000. High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells. *Nat Med* 6:107-110.
107. Groux, H., F. Cottrez, M. Rouleau, S. Mauze, S. Antonenko, S. Hurst, T. McNeil, M. Bigler, M. G. Roncarolo, and R. L. Coffman. 1999. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J Immunol* 162:1723-1729.
108. Howard, M., and A. O'Garra. 1992. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13:198-200.
109. Nishimura, T., K. Iwakabe, M. Sekimoto, Y. Ohmi, T. Yahata, M. Nakui, T. Sato, S. Habu, H. Tashiro, M. Sato, and A. Ohta. 1999. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 190:617-627.
110. Mehal, W. Z., F. Azzaroli, and I. N. Crispe. 2001. Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic t cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic t cell apoptosis. *J Immunol* 167:667-673.
111. Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27.
112. Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.
113. Crispe, I. N., and L. Huang. 1994. Neonatal, moribund and undead T cells: the role of the liver in T cell development. *Semin Immunol* 6:39-41.
114. Davidson, W. F., F. J. Dumont, H. G. Bedigian, B. J. Fowlkes, and H. C. Morse, 3rd. 1986. Phenotypic, functional, and molecular genetic comparisons of the abnormal lymphoid cells of C3H-lpr/lpr and C3H-gld/gld mice. *J Immunol* 136:4075-4084.
115. Crispe, I. N., T. Dao, K. Klugewitz, W. Z. Mehal, and D. P. Metz. 2000. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol* 174:47-62.
116. Limmer, A., J. Ohl, G. Wingender, M. Berg, F. Jungerkes, B. Schumak, D. Djandji, K. Scholz, A. Klevenz, S. Hegenbarth, F. Momburg, G. J. Hammerling, B. Arnold, and P. A. Knolle. 2005. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 35:2970-2981.
117. Watanabe, T., M. Yoshida, Y. Shirai, M. Yamori, H. Yagita, T. Itoh, T. Chiba, T. Kita, and Y. Wakatsuki. 2002. Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4+ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J Immunol* 168:2188-2199.
118. Callery, M. P., T. Kamei, and M. W. Flye. 1989. The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding. *J Surg Res* 46:391-394.

119. Callery, M. P., T. Kamei, and M. W. Flye. 1989. Kupffer cell blockade inhibits induction of tolerance by the portal venous route. *Transplantation* 47:1092-1094.
120. Nagano, H., M. Monden, M. Gotoh, Y. Nakano, T. Tono, T. Fukuzaki, T. Tanigawa, and T. Mori. 1992. Mechanisms involved in immunosuppression induced by intraportal injection of donor spleen cells in rats. *Transplant Proc* 24:2900-2901.
121. Nakano, Y., M. Monden, L. A. Valdivia, M. Gotoh, T. Tono, and T. Mori. 1992. Permanent acceptance of liver allografts by intraportal injection of donor spleen cells in rats. *Surgery* 111:668-676.
122. Garside, P., O. Millington, and K. M. Smith. 2004. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1029:9-15.
123. Bjorneboe, M., H. Prytz, and F. Orskov. 1972. Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1:58-60.
124. Triger, D. R., M. H. Alp, and R. Wright. 1972. Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* 1:60-63.

8) Genehmigungen

Für die durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen lag eine Genehmigung des LaGeSo (Genehmigungsnummer G 0202/03) vor. Die Versuchstiere wurden entsprechende den gesetzlichen Vorgaben des Tierschutzes gehalten und betreut.

Für die Labore des Deutschen Rheumaforschungszentrum und des Karl-Landsteiner-Hauses (Gentechnische Anlage Nr. 21/91), in denen Untersuchungen an T Zellrezeptor transgenen Tieren durchgeführt wurden, liegen Genehmigungen nach GenTSV für den Sicherheitslevel S₁ und S₂ vor.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich,

- dass ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- dass ich die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- dass mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 1.9.2007

Unterschrift
(Dr. med. K. Klugewitz)