

Interaktion von T-Zellen mit sinusoidalen Endothelzellen der Leber

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Arnhild Schrage

geb. am 26.01.1976 in Lippstadt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Alf Hamann
2. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
3. PD Dr. Hans-Willi Mittrücker

eingereicht: 18.01.2006

Datum der Promotion: 07.07.2006

Zusammenfassung

Auch unter physiologischen Bedingungen finden sich T-Zellen und andere Leukozyten nicht nur in den Sinusoiden, sondern auch im Parenchym der Leber. Da die Leber u. a. verschiedene Aufgaben für das Immunsystem übernimmt (z. B. Deletion aktivierter T-Zellen, Induktion peripherer Toleranz), könnte die Akkumulation der T-Zellen in der Leber - neben der immunologischen Überwachung der Leber - Voraussetzung für ihre Modulation sein. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Leber-sinusoidalen Endothelzellen (LSEC), der Barriere zwischen Blut und Leber-Parenchym, auf CD4⁺ T-Zellen untersucht. Zum einen zeigte sich, dass die LSEC sowohl die spontane Transmigration der T-Zellen, als auch ihre Chemotaxis zu CXCL9 und CXCL12 effizienter unterstützen als andere Endothelien. Eine endotheliale Aktivierung durch die Chemokine wurde als Mechanismus ausgeschlossen. Dagegen schien eine effiziente Präsentation der Chemokine auf der luminalen LSEC-Oberfläche nach Aufnahme von abluminal für die gesteigerte Transmigration der T-Zellen verantwortlich zu sein. Die LSEC könnten somit *in vivo* an der Rekrutierung von T-Zellen in die Leber beteiligt sein, indem sie eine rasche Wanderung der T-Zellen aus dem Blut ins Parenchym und möglicherweise auch zurück in die Zirkulation zulassen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die LSEC fähig sind, naive CD4⁺ T-Zellen *in vitro* Antigen-spezifisch zu aktivieren. Im Vergleich zu professionellen APZ war hierfür eine höhere Antigen-Dosis notwendig, die Expansion schwächer und es waren kaum Effektorzytokin-Produzenten detektierbar. Diese konnten jedoch durch Restimulierung mit professionellen APZ induziert werden (reversibler Phänotyp), was auf einen unreifen Differenzierungsstatus der T-Zellen schließen ließ. Es bleibt zu prüfen, in welchem Maße die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC *in vivo* stattfindet und diese durch LSEC aktivierten CD4⁺ T-Zellen funktionelle Bedeutung, z. B. regulatorische Kapazität, für das Immunsystem besitzen.

Leber Sinusoidale Endothelzellen, CD4⁺ T-Zellen, Transmigration, Chemokin-Präsentation, Antigen-Präsentation, Zytokin-Produktion

Abstract

The liver plays a major role for the metabolism, but it is also of general importance for the immune system, e.g. for the deletion of activated T cells or the induction of peripheral tolerance. Under physiological conditions T cells and other leukocytes can be found in the liver, in the sinusoids as well as in the parenchyma. This hepatic accumulation of T cells might be due to immunosurveillance, but it would also be a prerequisite for modulation of T cells by hepatic cells. The present study investigated two different aspects of the interaction of liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), the barrier between the sinusoidal lumen and the hepatic parenchyma, and CD4⁺ T cells. In the first part of the study it could be demonstrated that LSEC support the spontaneous transmigration of CD4⁺ T cells as well as their chemotaxis to CXCL12 and CXCL9 more efficiently than other endothelial cells. Whereas a direct endothelial activation by chemokines could be excluded the efficient chemokine presentation at the luminal LSEC surface (after abluminal uptake) might be responsible for the enhanced T cell transmigration. The findings suggest that LSEC might be involved in the recruitment of T cells by supporting a rapid transendothelial migration. The second part of the study focused on the characteristics of LSEC in the context of antigen presentation. LSEC were able to prime and expand naïve CD4⁺ T cells in vitro but less effective than professional APC as proven by weaker expansion of cells, a requirement for higher antigen concentration and the lack of cytokine producing T cells. The “immature effector” phenotype of the CD4⁺ T cells primed on LSEC was reversible since it could be overcome by restimulation on professional APC. In conclusion these data suggest that antigen presentation by LSEC results in activation but incomplete differentiation of CD4⁺ T cells.

liver sinusoidal endothelial cells, CD4⁺ T cells, transmigration, chemokine presentation, antigen presentation, cytokine production

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
1 Einleitung	1
1.1 Transendotheliale Migration der Leukozyten	1
1.1.1 Das Multi-Step-Modell	1
1.1.2 An der Transmigration beteiligte Moleküle	2
1.1.2.1 Selektine	2
1.1.2.2 Integrine	3
1.1.2.3 Chemokine	3
1.2 Interaktion von CD4⁺ T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen	7
1.3 Die Leber	10
1.3.1 Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber	10
1.3.2 Rekrutierung von Lymphozyten in die Leber	10
1.3.3 Induktion peripherer Toleranz in der Leber	13
2 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Geräte und Materialien	16
3.1.2 Reagenzien	17
3.1.3 Antikörper	19
3.1.4 Versuchstiere	20
3.1.5 Medien und Puffer	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Immunhistologie	21
3.2.2 Isolation verschiedener Zellpopulationen	22
3.2.2.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz	22
3.2.2.2 Isolation von hepatischen Lymphozyten und LSEC	23
3.2.3 Kultivierung der Endothelzellen	24
3.2.4 FACS-Färbung und -Analyse	25
3.2.4.1 Oberflächenfärbung	25
3.2.4.2 Färbung von Zellen aus murinem Blut	25
3.2.4.3 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen nach PMA/IM-Stimulation	25
3.2.4.4 Messung und Analyse	26
3.2.5 CFSE-Markierung	26
3.2.6 <i>In vitro</i> Generierung von Th1-Zellen	26
3.2.7 Generierung von Knochenmarkschimären	27
3.2.8 Antigen-spezifische Kokultur von CD4 ⁺ T-Zellen mit LSEC oder Milz-APZ	27
3.2.9 Transendothelialer Migrationsassay	28
3.2.9.1 Kultivierung der Endothelzellen auf den Transwell [®] -Einsätzen	28
3.2.9.2 Isolation und Transmigration der T-Zellen	28
3.2.9.3 Quantifizierung der transmigrierten T-Zell-Populationen	29
3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie	30
3.2.11 Zeitrafferaufnahmen der transendothelialen Migration	31
3.2.11.1 Kultivierung der Endothelzellen auf μ -Slides VI	31
3.2.11.2 Isolation und Behandlung der CD4 ⁺ T-Zellen	31
3.2.11.3 Aufnahme und Analyse	31
3.2.12 Graphische Darstellung und Statistik	32

4	Ergebnisse	33
4.1	<i>Ex vivo</i> Isolation der LSEC mit Hilfe des Antikörpers ME-9F1	33
4.2	Einfluss der LSEC auf die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen.....	34
4.2.1	Gesteigerte Transmigration von CD4 ⁺ T-Zellen in Anwesenheit der LSEC	35
4.2.2	Effekt der LSEC auf die Transmigration verschiedener CD4 ⁺ -Populationen.....	38
4.2.3	Kein erhöhter chemotaktischer Effekt von CCL20, CCL21 und CXCL16 in Anwesenheit der LSEC	41
4.2.4	Mechanismus der gesteigerten Transmigration in Anwesenheit der LSEC.....	42
4.2.4.1	Endotheliale Aktivierung durch CXCL9 und CXCL12	42
4.2.4.2	Konstitutive ICAM-1-Expression auf LSEC	44
4.2.4.3	Chemokin-Präsentation auf der Oberfläche der LSEC	44
4.3	Antigen-abhängige Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC	47
4.3.1	Aktivierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen durch LSEC bei hohen Antigen-Dosen.....	47
4.3.2	Myeloide APZ in der LSEC-Fraktion	49
4.3.2.1	Anteil myeloider APZ in der LSEC-Fraktion	49
4.3.2.2	Knochenmarkschimären als LSEC-Quelle ohne myeloide MHC-II-Expression	49
4.3.3	Proliferation naiver CD4 ⁺ T-Zellen nach Antigen-Präsentation durch LSEC	51
4.3.4	Keine Differenzierung in Effektorzellen nach Antigen-Präsentation durch LSEC	53
4.3.5	Aktivierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen unbeeinflusst vom Stimulationsgrad der LSEC	54
4.3.6	Induktion eines undifferenzierten, reversiblen Phänotyps nach Antigen- Präsentation durch LSEC	57
5	Diskussion.....	59
5.1	<i>Ex vivo</i> Isolation der LSEC mit Hilfe des Antikörpers ME-9F1	59
5.2	Einfluss der LSEC auf die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen.....	60
5.2.1	Erhöhte Transmigration durch LSEC im Vergleich zu anderen Endothelien.....	60
5.2.2	Mechanismus für die erhöhte Transmigration von CD4 ⁺ T-Zellen in Anwesenheit der LSEC	62
5.3	Antigen-abhängige Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC	66
5.3.1	Ausschluss kontaminierender professionelle APZ.....	66
5.3.2	Antigen-Dosis abhängige Expansion naiver CD4 ⁺ T-Zellen durch LSEC	67
5.3.3	Nach Aktivierung durch LSEC keine Differenzierung in IFN- γ -, IL-4- oder IL-10-Produzenten	69
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	72
6	Referenzen.....	74
	Anhang	89
	Abkürzungsverzeichnis.....	89
	Danksagung.....	92
	Publikationsliste.....	93
	Lebenslauf	94
	Eidesstattliche Erklärung.....	95

1 Einleitung

Die Hauptfunktion des Immunsystems ist das Erkennen und Eliminieren von Pathogenen sowie von körpereigenen apoptotischen oder nekrotischen Zellen. Dabei muss es nicht nur zwischen fremd und selbst, sondern auch zwischen gefährlich und ungefährlich unterscheiden können. Im Laufe der Evolution haben sich bei den Vertebraten hierfür hochentwickelte Mechanismen herausgebildet. Es gibt die angeborene (unspezifische) und die adaptive (erlernte oder spezifische) Immunantwort. Für die angeborene Immunität sind u. a. Granulozyten verantwortlich, die auf Pathogenen konservierte Oberflächenmoleküle erkennen können und darauf reagieren. Die adaptive Immunantwort wird durch B- und T-Lymphozyten vermittelt. Diese zeichnen sich durch Antigen-Spezifität sowie hohe Diversität aus. Ein weiteres Charakteristikum der adaptiven Immunantwort ist das immunologische Gedächtnis, durch das die Immunantwort schneller und effektiver erfolgt, wenn der Organismus bereits zuvor mit dem spezifischen Antigen Kontakt hatte.

1.1 Transendotheliale Migration der Leukozyten

Die Zellen des Immunsystems werden neben den Erythrozyten aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark gebildet. Sogenannte myeloide Stammzellen bringen die polymorphkernigen Leukozyten (Monozyten, basophile, eosinophile und neutrophile Zellen) hervor, aus lymphoiden Stammzellen entstehen T- und B-Lymphozyten. Nach Entstehung wandern sie aus dem Knochenmark aus, entweder um auszudifferenzieren oder um zu ihrem Funktionsort zu gelangen. So zirkulieren Monozyten im Blut und differenzieren fortwährend zu Makrophagen, sobald sie in die Gewebe einwandern. Naive Lymphozyten rezirkulieren innerhalb des Blutes und der sekundären lymphatischen Organe und Effektorzellen werden zu Infektionsorten ins Gewebe rekrutiert. Die Immunzellen haben somit – anders als organbildende Zellen – keine fixierte Position innerhalb des Organismus. Für sie ist die transendotheliale Migration aus dem Blut in lymphatische Organe oder andere Gewebe ein wichtiger Prozess.

1.1.1 Das Multi-Step-Modell

Die Wanderung von Leukozyten aus den Blutgefäßen heraus – auch Extravasation genannt – lässt sich in mehrere sequentielle Schritte unterteilen (Abb. 1) [1]. Zuerst nehmen die Leukozyten losen Kontakt mit dem Endothel auf. Sie werden abgebremst und rollen auf der Oberfläche des Endothels entlang. Dieses Rollen wird v. a. durch Selektine gesteuert. Während der transienten Adhäsion an das Endothel werden die Leukozyten dann über auf dem Endothel präsentierte Chemokine aktiviert. Dieses „Triggering“ der Leukozyten über

Chemokinrezeptoren führt zur Änderung der Integrin-Affinität oder -Avidität (inside-out signaling) und damit letztendlich zur festen Adhäsion an das Endothel. Die adhärenierten Leukozyten passieren das Endothel und migrieren aufgrund subendothelialer chemotaktischer Signale zu bestimmten Kompartimenten ins Gewebe.

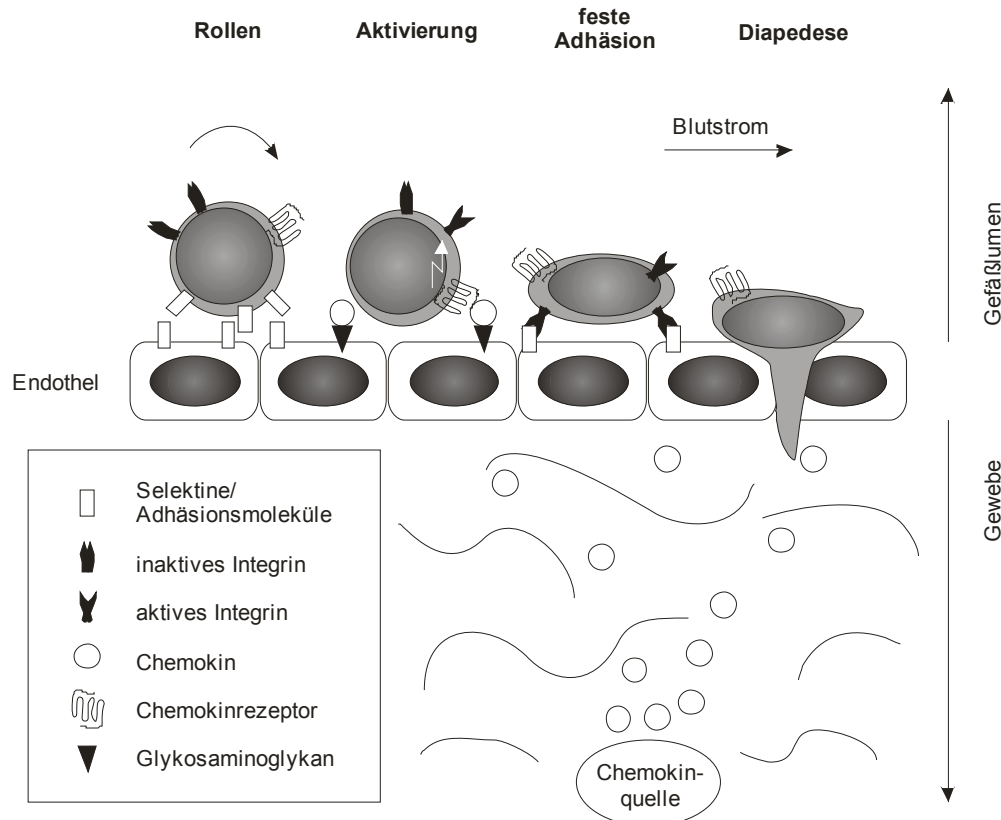


Abb. 1: Mehr-Schritt-Modell der Leukozyt/Endothel-Erkennung und Extravasation aus dem Blut. Die sequentiell erfolgenden Schritte Rollen entlang des Endothels, Aktivierung, feste Adhäsion und transendotheliale Migration und die dabei notwendigen Rezeptor-Ligand-Interaktionen ermöglichen das spezifische Homing bzw. Rekrutieren bestimmter Leukozyten-Populationen. Abbildung nach Schaerli & Moser, 2005 [2].

1.1.2 An der Transmigration beteiligte Moleküle

Die Transmigration der Leukozyten wird unter normalen sowie unter pathologischen Bedingungen von der Zusammensetzung der Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle auf den Leukozyten, aber auch von der Kombination vorhandener Chemokine und endothelialer Adhäsionsmoleküle bestimmt [3, 4].

1.1.2.1 Selektine

Die Selektine, die den ersten Schritt der Transmigrationskaskade vermitteln, gehören zu den Kalzium-abhängigen Lektinen, die als Typ 1 Transmembranproteine an sialylierte Carbohydratgruppen binden [5]. Die drei bekannten Selektine P-, E- und L-Selektin weisen große Strukturhomologien auf. P-Selektin, das zuerst auf Thrombozyten nachgewiesen wurde, aber auch von Endothelzellen exprimiert wird, und E-Selektin, das sich ebenfalls auf

Endothelzellen findet, binden beide z. B. PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1). Dieser wird vor allem von myeloiden, lymphoiden und dendritischen Zellen exprimiert und muss zur Bindungsfähigkeit mit fukosylierten und sialylierten Oligosacchariden modifiziert sein. L-Selektin wird von den meisten Leukozyten exprimiert und dient als Homingrezeptor für lymphatische Gewebe. Als Liganden sind die Adhäsionsmoleküle GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1), CD34 und Sgp200 bekannt, die z. B. von postkapillären Venolen (HEV = high endothelial venules) der Lymphknoten exprimiert werden. Auch PSGL-1 kann als Ligand für L-Selektin dienen.

1.1.2.2 Integrine

Die Integrine, die die feste Adhäsion von Leukozyten an das Endothel vermitteln, sind eine Familie heterodimerer transmembranärer Glykoproteine, die aus zwei nicht kovalent gebundenen Untereinheiten bestehen. Beim Menschen sind bisher 18 α - und 8 β -Ketten und von den möglichen Kombinationen 24 verschiedene Heterodimere gefunden worden. Die meisten Integrine binden Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM), einige erkennen Rezeptoren auf anderen Zellen. Das Integrin $\alpha_4\beta_7$, das eine Rolle beim Homing von Leukozyten zur Mukosa spielt, bindet z. B. Fibronectin (FN), aber auch die endothelialen Liganden MAdCAM-1 und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1 = leukocyte function-associated molecule-1) erkennt die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), -2 und -3 [6].

Für eine feste Bindung zwischen den Integrinen und ihren Liganden müssen sie durch Konformations- oder Aviditätsänderung, die durch Zellaktivierung ausgelöst wird, in einen bindungsfähigen Zustand überführt werden. Dieser Adhäsion vermittelnde, aktivierende Schritt kann durch Chemokine ausgelöst werden [7].

1.1.2.3 Chemokine

Die Chemokine sind kleine chemotaktische Zytokine, deren Erkennung Zellen gerichtet entlang eines Konzentrationsgradienten wandern lässt. Sie sind nicht nur an der Rezirkulation und Rekrutierung von Leukozyten beteiligt, sondern auch an der Organentwicklung, Angiogenese, Angiostase und der Immunregulation [8].

Einteilung der Chemokine

Innerhalb der Zytokine bilden die Chemokine mit fast 50 Mitgliedern die größte Gruppe. Ihre systematische Nomenklatur basiert auf der Anzahl N-terminaler Cystein-Reste und der

Anzahl dazwischen liegender Aminosäuren und unterteilt die Chemokine in vier Familien. In den beiden großen Familien sind die Cystein-Reste entweder benachbart (CC) oder durch eine Aminosäure getrennt (CXC). Die beiden kleinen Familien sind durch einen einzelnen Cystein-Rest (C) oder drei zwischen den Cystein-Resten liegenden Aminosäuren (CX₃C) gekennzeichnet. Eine komplette Liste der systematischen Nomenklatur für Chemokine und ihre Rezeptoren ist im Review von Kim, 2004 zu finden [9].

Neben der systematischen Nomenklatur lassen sich die Chemokine auch aufgrund ihrer Funktion klassifizieren [10]: Die meisten Chemokine gehören zu den inflammatorischen (oder induzierbaren) Chemokinen. Diese kontrollieren die Rekrutierung von Effektor-Leukozyten bei Infektion, Entzündung, Gewebsverletzung oder zu Tumoren. Die homeostatischen (oder konstitutiven) Chemokine – CCL18, CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13 und CXCL14 – dirigieren Leukozyten während der Hämatopoese im Knochenmark und im Thymus, während der Initiierung der adaptiven Immunantwort in Milz, Lymphknoten und den Peyer's Patches, sowie bei der Überwachung von gesundem peripheren Gewebe. Die Chemokine CCL1, CCL17, CCL20, CCL22, CCL25, CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CXCL16 können nicht eindeutig einer der beiden Kategorien zugeordnet werden, gelten damit als Chemokine mit dualer Funktion.

Chemokinrezeptoren

Die zelluläre Antwort auf ein Chemokin ist in der Regel schnell in ihrer Entstehung und transient in ihrer Dauer. Die Chemokinerkennung erfolgt über spezifische Chemokinrezeptoren, die zur Familie der Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren gehören. Diese sind an heterotrimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt; im Fall der Chemokinrezeptoren an die inhibitorischen G-Proteine (G_i) [11].

Für die Chemotaxis ist die Freisetzung der $\beta\gamma$ -Untereinheit sehr wichtig [12]: Über direkte Interaktion aktiviert diese z. B. die Phospholipase C-Isoformen PLC- β_2 und - β_3 , was zum einen durch Produktion von Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP₃) zur transienten Erhöhung des intrazellulären freien Kalziums führt, zum anderen durch Produktion von Diacylglycerol zur Aktivierung der Proteinkinase C. Ein weiterer Effektor der $\beta\gamma$ -Untereinheit ist die Proteinkinase B, die durch die Phosphatidylinositol-3-kinase γ (PI3K γ) aktiviert wird. Dies führt zu einer Kaskade von Phosphorylierungen durch z. B. MAP-Kinasen (mitogen activated protein kinase) und GTPasen wie Rac und Rho, womit zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Chemotaxis, Degranulierung und „respiratory burst“ ausgelöst werden [8]. Die α -Untereinheit ist trotz ihrer intrinsischen GTPase-Aktivität, welche die Bindung zwischen α - und $\beta\gamma$ -

Untereinheit reguliert, und einer möglichen Aktivierung von Kinasen der Src-Familie beim Chemokin-Signalweg von geringerer Bedeutung [11]. Dauer und Ausmaß des Signaltransduktion werden zusätzlich von der Internalisierung des Chemokin/Rezeptor-Komplexes (Homologe Desensibilisierung) sowie vom Abkoppeln des Rezeptors vom G-Protein (Heterologe Desensibilisierung) beeinflusst [2].

Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren richtet sich nach ihren Liganden. CXCL-bindende Rezeptoren beginnen mit CXCR, CCL-bindende mit CCR. Die meisten Rezeptoren haben mehrere Liganden, welche oft ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen (CXCR3 – CXCL9, CXCL10 und CXCL11), andere Rezeptoren haben nur einen Liganden (CXCR4 – CXCL12). Es gibt auch Chemokine, die mehrere Rezeptoren binden können (CCL5 – CCR1, CCR3, CCR5) [9].

Chemokin-Präsentation

Chemokine enthalten viele basische Aminosäuren, was ihnen erlaubt, an die negativ geladenen Zelloberflächen und an extrazelluläre Matrixproteine zu binden [9]. Diese Eigenschaft ist z. B. wichtig für die löslichen Chemokine, um die Diffusion weg vom Ort ihrer Entstehung zu verhindern und so lokale Gradienten aufzubauen [13].

Alle Chemokine können negativ geladene Glykosaminoglykane (GAGs) wie Heparin, Heparinsulfat, Dermatan-sulfat und Chondroitin-sulfat binden, dies ist allerdings deutlich weniger spezifisch als die Chemokin/Rezeptor-Interaktion. Eine N-terminale Region der Chemokine ist wichtig für die Rezeptorbindung [14], wohingegen die Interaktion mit GAGs C-terminal oder der N-terminalen Domäne gegenüberliegenden Loops stattfindet [15].

GAGs übernehmen viele biologische Funktionen, z. B. bei der Wachstumskontrolle, Signaltransduktion, Zelladhäsion, Hämostase und im Fettmetabolismus [16]. Es sind lange lineare und heterogen sulfatierte Polysaccharide, die - bis auf die löslichen GAGs Hyaluronsäure und Heparin – über Proteine immobilisiert sind, mit denen sie die Proteoglykane formen. Diese sind ubiquitär auf Zelloberflächen und der EZM verteilt und bilden einen makromolekularen „Überzug“, die Glykokalyx. Ihre Komposition hängt von Typ, Entwicklungsstadium und vom pathophysiologischen Zustand der jeweiligen Zelle ab [17].

Die Wichtigkeit der Chemokin/GAG-Interaktion wurde initial unterstützt durch Bindungsstudien von Chemokinen an aufgereinigte GAGs *in vitro* [18] sowie an Endothelzell-Oberflächen gebundene GAGs *in vitro* [19] und *in vivo* [20]. Dabei zeigen die Chemokine Unterschiede in den Affinitäten für verschiedene GAGs; ein Umstand, der zur spezifischen Rekrutierung von Leukozyten beitragen könnte [18, 21]. So steigert z. B.

Heparansulfat, nicht aber Heparin oder Chondroitinsulfat die CXCL8 (IL-8 = Interleukin-8) induzierte Migration von Neutrophilen *in vitro* [22].

Chemokine binden mit unterschiedlichen Effekten sowohl an immobilisierte als auch an lösliche GAGs. So sind an lösliche GAGs gebundene Chemokine unfähig, ihren Rezeptor zu binden, was zur Blockade der biologischen Aktivität führt, wohingegen Oberflächen-gebundene GAGs die lokale Chemokinkonzentration erhöhen und Chemokine zur Erkennung durch den Rezeptor präsentieren können [19].

Für die Präsentation von CXCL8 auf venösem Endothel konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass das Chemokin an der abluminalen Seite des Endothels aufgenommen wird, über bestimmte Vesikel, sogenannte Caveolae, transzytiert und an der luminalen Endotheloberfläche präsentiert wird [20]. Dabei erscheint die Interaktion mit GAGs notwendig, da mutiertes CXCL8 mit fehlender Bindungsfähigkeit zu Heparansulfat nicht mehr transportiert werden kann. Nach der Transzytose kommt es nicht zu einer gleichmäßigen Verteilung entlang der Endotheloberfläche, sondern CXCL8 wird auf den Spitzen der Mikrovilli zusammen mit bestimmten Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 präsentiert. Diese Kollokalisierung der an der transendothelialen Migration beteiligten Moleküle resultiert dann in erhöhter Transmigration [23]. Auch für andere Chemokine konnte ein Transport an die luminalen Oberfläche von Endothelzellen gezeigt werden: Transzytose von CCL19 (ELC = EBL-1-ligand chemokine/MIP-3 β = macrophage inflammatory protein) durch HEV [24] sowie luminalen Präsentation von CCL21 (6CKine/SLC = secondary lymphoid tissue chemokine) bzw. CCL2 (MCP-1 = monocyte chemoattractant protein) im drainierenden Lymphknoten nach subkutaner bzw. intrakutaner Injektion [25, 26]. Die Transzytose dient somit der lokalen Präsentation der im Gewebe produzierten Chemokine, um Lymphozyten ins Gewebe zu rekrutieren.

1.2 Interaktion von CD4⁺ T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen

Während der Rezirkulation der Lymphozyten innerhalb der lymphatischen Organe und der Rekrutierung zu den peripheren Organen wird der Organismus auf das Vorhandensein eingedrungener Pathogene überprüft. Neben den B-Zellen spielen dabei T-Lymphozyten eine besondere Rolle, da sie die einzigen Zellen sind, die mittels hochvariabler Rezeptormoleküle zur Erkennung und Unterscheidung verschiedenster Antigene in der Lage sind. T-Lymphozyten stammen aus dem Knochenmark, ihre Reifung erfolgt jedoch im Thymus. Sie erkennen Antigene nur in Form von Fragmenten, die an Moleküle des Haupt-histokompatibilitätskomplexes (MHC = major histocompatibility complex) gebunden sind. Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen. MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I), die Peptide aufnehmen, die beim Abbau von Antigenen im Cytosol entstanden sind, und MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II), die Peptide binden, die von in zellulären Vesikeln abgebauten Proteinen stammen. MHC-I-Moleküle finden sich auf nahezu allen zellkernhaltigen Körperzellen und MHC-I gebundene Antigene werden von CD8⁺ T-Zellen erkannt. Im Gegensatz dazu erkennen CD4⁺ T-Zellen Antigene, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. MHC-II-Moleküle werden nur von einigen Zelltypen exprimiert, die man unter dem Begriff Antigen-präsentierende Zellen (APZ) zusammenfasst. Zu diesen gehören die professionellen APZ, also dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen, aber auch aktivierte T-Zellen, Endothel- oder Epithelzellen [27].

Zur Eliminierung eingedrungener Pathogene ist die Effizienz der primären Immunantwort von großer Bedeutung. Ein kritischer Schritt ist hierbei die Entwicklung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Effektorzellen. Diese kann in mehrere Phasen unterteilt werden: Aktivierung, Proliferation und Differenzierung.

Die Aktivierung erfordert neben dem Signal des T-Zell-Rezeptors (TZR), das durch die Erkennung des Antigen/MHC-II-Komplexes ausgelöst wird, ein zweites, kostimulatorisches Signal durch akzessorische Moleküle auf der APZ-Oberfläche, die mit Rezeptoren auf der T-Zell-Seite interagieren (Abb. 2). CD28, der wichtigste kostimulatorische Rezeptor auf T-Zellen, bindet zwei Mitglieder der B7-Familie auf APZ: CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2). CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4), ein Homolog zu CD28 und ebenfalls Rezeptor für CD80 und CD86, wird nach Aktivierung der T-Zelle exprimiert und supprimiert T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion [28]. Der induzierbare Kostimulator ICOS ist das dritte Mitglied der CD28-Familie und erkennt den Liganden B7h, der auf B-Zellen, Makrophagen und nicht-lymphoidem Gewebe zu finden ist [29, 30]. Weitere akzessorische

Moleküle der B7-Familie sind PD-L1 (B7-H1) und PD-L2 (B7-DC), deren Rezeptor PD-1 ist. Für B7-H1 und B7-DC sind sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte auf Proliferation und Zytokin-Produktion beschrieben worden [31]. Auch ICAM-1 und -2, CD40, VCAM-1, CD24, CD70 und OX-40L gehören zu den kostimulatorischen Liganden [32-39].

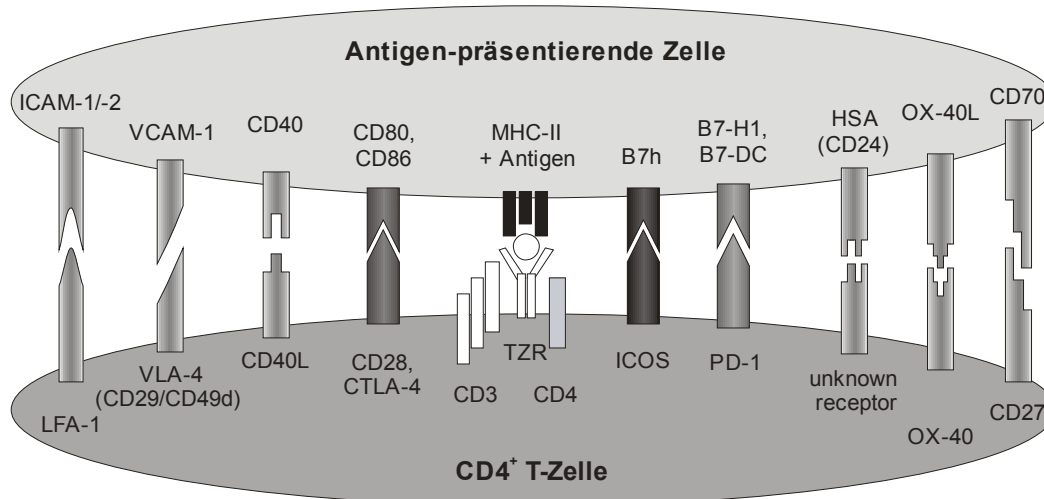


Abb. 2: Interaktionen zwischen T-Zelle und APZ. Neben dem TZR/Antigen/MHC-II-Komplex erfordert die T-Zell-Aktivierung weitere Interaktionen zwischen akzessorischen Molekülen der APZ und ihre zugehörigen Rezeptoren auf der T-Zell-Seite.

In der Proliferationsphase wird aus den wenigen, für ein Antigen spezifischen Zellen eine große Population generiert (klonale Expansion), die zu Zellen mit Effektorfunktion differenziert. Hierbei spielen viele Faktoren wie Intensität des TZR-vermittelten Signals, Art der Kostimulation oder Anwesenheit wachstumsfördernder oder polarisierender Zytokine eine Rolle. So beeinflusst das Zytokin IL-2, ein autokriner, potenter Wachstumsfaktor für T-Zellen, den Grad der Expansion. Ein starkes TZR-Signal, IL-12, IFN- γ (Interferon- γ) und das Fehlen von IL-4 generieren Th1-polarisierte Zellen, wohingegen ein schwächeres TZR-Signal, die Anwesenheit von IL-4 und das Fehlen von IFN- γ Th2-polarisierte Zellen begünstigt [40]. Die inflammatorisch wirkenden Th1-Zellen, die IFN- γ und TNF- α (Tumor Nekrosis Faktor- α) produzieren, aktivieren Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten, Th2-Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren, inhibieren eher die Zell-vermittelte Immunität und aktivieren die humorale Immunantwort (B-Zell-Helfer) [41].

Eine Differenzierung erfolgt nicht nur auf Ebene der auszuübenden Effektorfunktion, auch das Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren verändert sich: Während naive CD4⁺ T-Zellen für die Rezirkulierung u. a. CD26L und CCR7 (Rezeptor für CCL19 und CCL21) benötigen, exprimieren z. B. nahezu alle Th1-Zellen CXCR3 (Rezeptor für CXCL9, CXCL10 und CXCL11), die meisten Th2-Zellen dagegen CCR4 (Rezeptor für CCL17/TARC und CCL22/MDC) [42].

Der Großteil der Effektorzellen, die während der klonalen Expansion generiert werden, ist kurzlebig und stirbt durch aktivierungsinduzierten Zelltod. Daher ist die Anzahl langlebiger sogenannter Memoryzellen begrenzt und die Diversität des T-Zell-Repertoires bleibt erhalten [43]. Neben peripheren Memoryzellen, die die Effektorfunktion und Fähigkeit zur Rekrutierung in periphere Organe beibehalten, entstehen ruhende zentrale Memoryzellen, die die Fähigkeit zur Rezirkulierung in den sekundären lymphatischen Organen zurückgewinnen (Expression von CD62L und CCR7) [44]. Ob die Differenzierung zu Effektor- und Memoryzellen linear erfolgt (Entwicklung der Memoryzellen aus einigen Effektorzellen) oder ob Effektor- und Memoryzellen unabhängig von einander entstehen, ist noch ungeklärt [43, 45]. Effektor- und Memoryzellen lassen sich nicht durch einen spezifischen Marker voneinander abgrenzen, in der Literatur finden sich zum Teil sogar überlappende Definitionen. Daher wird in der vorliegenden Arbeit für beide Populationen ein gemeinsamer Begriff wie „Antigen-erfahrene“ oder „Effektor/Memory“ T-Zellen verwendet.

Es ist allgemein akzeptiert, dass eine optimale Stimulation der naiven CD4⁺ T-Zellen und damit eine effiziente von CD4⁺ T-Zellen vermittelte Immunantwort die Beteiligung aktivierter professioneller APZ voraussetzt. Durch inflammatorische Signale wie Lipopolysaccharide (LPS), CpG-Motive, aber auch TNF- α werden unreife DCs, die durch eine hohe phagozytotische Kapazität und eine geringe Expression kostimulatorischer Moleküle charakterisiert sind, aktiviert und können zu reifen DCs differenzieren. Kostimulatorische Liganden wie CD40, CD80 und CD86 werden hochreguliert, die zusätzlich zum TZR-Signal den notwendigen Kostimulus für die Initiierung der Immunantwort auslösen [46, 47]. Ein TZR-Signal in Abwesenheit von Kostimulation kann dagegen zur T-Zell-Anergie führen [48-50]. T-Zellen sind dann trotz optimaler Restimulation – z. B. aufgrund von fehlender IL-2-Produktion – nicht mehr in der Lage zu proliferieren.

1.3 Die Leber

Die Leber (griech. Hepar, lat. Jecur) ist das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels. Die wichtigsten Aufgaben sind die Produktion von Gerinnungsfaktoren, die Speicherung von Glukose, die Galleproduktion sowie Abbau und Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen. Die Stoffe werden von der Leber je nach Bedarf ans Blut abgegeben oder aus dem Blut entfernt. Die Blutzufuhr in der Leber erfolgt zum einen über die hepatische Arterie, zum andern wird nährstoffreiches Blut vom Darm über die Pfortader (*Vena portae*) in die Leber transportiert (Abb. 3). Das Blut strömt durch das Kapillarnetz der Leber, die Sinusoide, und verlässt die Leber letztendlich über die Lebervene (*Vena hepatica*).

1.3.1 Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber

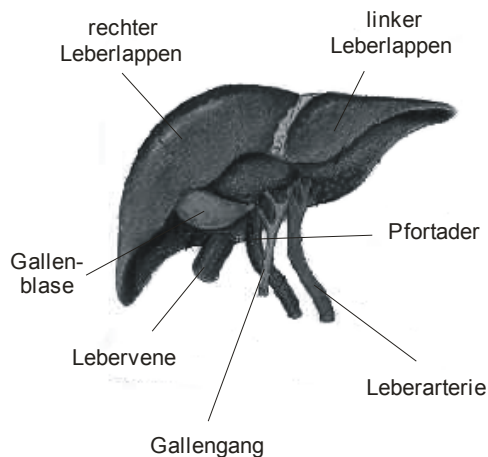
In der Leber adulter Säugetiere sind ca. 65 % der Zellen Hepatozyten, die übrigen sind nicht-parenchymale, hauptsächlich sinusoidale Zellen [51]. Die Sinusoide enthalten neben den Endothelzellen (LSEC = Leber-sinusoidale Endothelzellen) vor allem Leber-residente Makrophagen, genannt Kupffer Zellen, und Ito Zellen, die auch als Fett-speichernde Zellen bezeichnet werden [52]. Des Weiteren findet man in der Leber residente DCs [53] und Lymphozyten [54, 55].

Die hepatischen Sinusoide mit einem Durchmesser von 5-7 μm werden von einem Endothel ausgekleidet, welches sich morphologisch und phänotypisch von vaskulärem Endothel anderer Organe unterscheidet. Die LSEC sind nur durch den Disse'schen Raum von den darunterliegenden Hepatozyten getrennt, da die typische Basalmembran fehlt [56]. Die LSEC haben Fenestrae mit einem Durchmesser von ca. 150 nm, die in Clustern, sogenannten Siebplatten, angeordnet sind [57]. Diese sorgen zwischen dem sinusoidalen Lumen und dem Parenchym für einen intensiven Austausch von Stoffen. Zusammen mit den phagozytierenden Kupffer Zellen sind die LSEC aufgrund der Rezeptor-vermittelten Pinozytose ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems, indem sie an der Entsorgung zirkulierender Makromoleküle beteiligt sind [58].

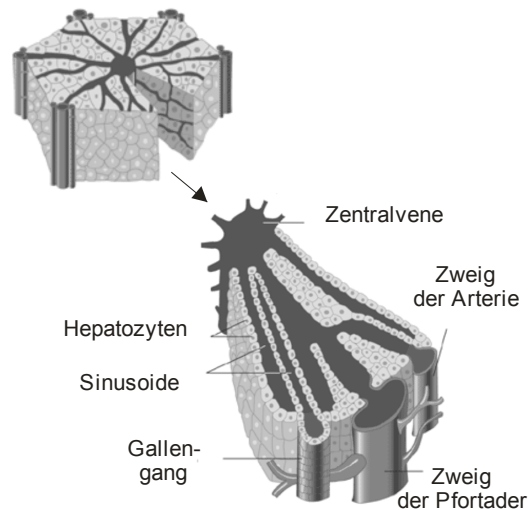
1.3.2 Rekrutierung von Lymphozyten in die Leber

Im Vergleich mit lymphoiden Geweben haben die Lymphozyten in der Leber eine andere Zusammensetzung und einen speziellen Phänotyp. Es finden sich z. B. vermehrt NK-Zellen (Natürliche Killerzellen), NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dazu ist unter den konventionellen $\alpha\beta$ -T-Zellen die Frequenz an Effektor-/Memory T-Zellen erhöht [55].

A) Leber



B) Lobulus



C) Sinusoid

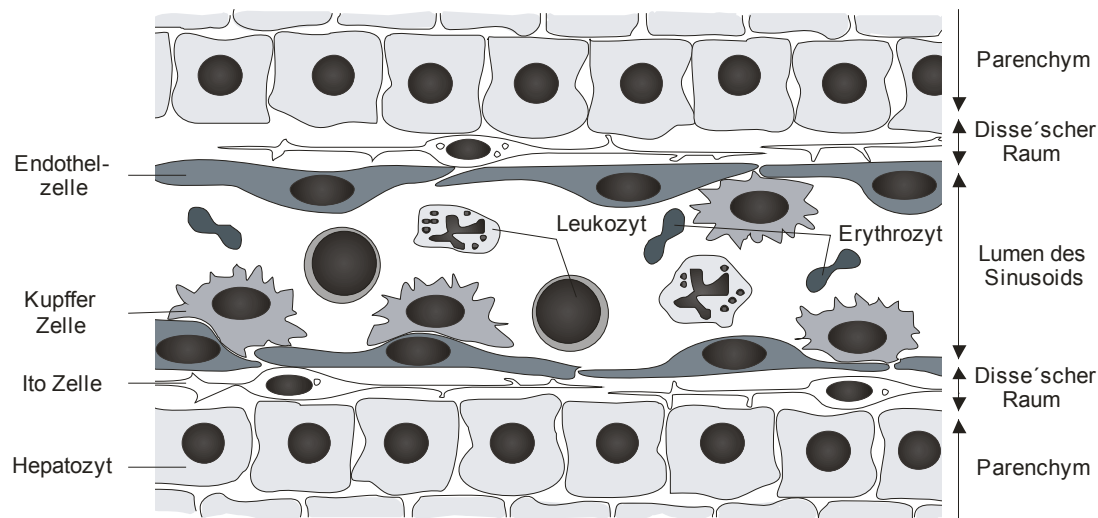


Abb. 3: Die Feinbau der Leber. Die Leber hat mehrere Leberlappen (A), die sich aus 1-2 mm großen Leberläppchen (Lobuli) zusammensetzen. An den Eckpunkten benachbarter Lobuli liegen die Periportalfelder, in denen jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang verläuft (B). Zwischen den Hepatozyten liegen die Kapillaren der Leber, die Sinusoide. Diese transportieren das Blut aus der Pfortader und der Arterie in Richtung Zentrum der Lobuli, wo es von einer Zentralvene aufgenommen wird. Die Venen vereinigen sich und das Blut verlässt die Leber letztendlich über die Lebervene. Die Sinusoide der Leber werden von spezialisiertem Endothel ausgekleidet und sind durch den Disse'schen Raum vom Parenchym getrennt (C). Im Lumen der Sinusoide sind die Leber-residenten Makrophagen, die Kupfer Zellen, angesiedelt, im Disse'schen Raum die Ito Zellen. Bildnachweis: A: http://www.wip.villa-bosch.de/PatInf/dr_topf/Galle_anatomie.htm, B: <http://www.niaaa.nih.gov/gallery/liver/lobulep295.htm>, C: nach Lalor & Adams, 2002 [59].

Die intrahepatischen Lymphozyten sind nicht nur im sinusoidalen Lumen, sondern auch im Parenchym zu finden [54, 60]. Neben intrahepatischer Expansion und Apoptose beeinflusst auch das Migrationsverhalten ihre zelluläre Zusammensetzung [61]. Die Einwanderung in die Leber scheint dabei hauptsächlich in den Sinusoiden stattzufinden, da v. a. dort die für die Transmigration notwendige Adhäsion beobachtet wurde. Im Unterschied zu anderen

Endothelien spielen hierbei Selektine nur eine minimale Rolle [62]. Der langsame Blutfluss in der Leber sowie der geringe Durchmesser der Sinusoide scheinen für die Initiierung der Adhäsion von Lymphozyten an das Endothel ausreichend. Die feste Adhäsion der Lymphozyten wird dann durch bestimmte, konstitutiv in der Leber exprimierte Adhäsionsmoleküle – z. B. ICAM-1, VCAM-1 und VAP-1 (vascular adhesion protein-1) – vermittelt [63, 64].

Ferner spielt die Chemokin-bedingte Aktivierung der Lymphozyten eine Rolle, da sie der festen Adhäsion und transendothelialen Migration vorausgeht. Einige der Chemokine sind nicht nur bei Infektion oder Inflammation, sondern auch konstitutiv in der Leber exprimiert:

CXCL9 (Mig = monokine-induced by IFN- γ) wird in der Leber, nicht aber in anderen peripheren Organen wie Lunge, Darm oder Gehirn konstitutiv exprimiert. Zusammen mit CXCL10 (IP-10 = interferon-inducible protein 10) und CXCL11 (ITAC = interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) bindet es den Rezeptor CXCR3, der u. a. auf Th1-polarisierten Lymphozyten exprimiert ist. Bei chronischer Hepatitis ist für sinusoidale Endothelzellen eine gesteigerte Proteinexpression von CXCL9 zusammen mit CXCL10 beschrieben [65-67].

Die konstitutive Expression von CXCL12 (SDF-1 α = stromal-cell-derived factor-1 α , Rezeptor ist CXCR4) ist u. a. in vielen peripheren Organen wie Leber, Niere, Herz und Muskel beschrieben. In der normalen Leber wird CXCL12 hauptsächlich von Gallengang-Epithelzellen exprimiert. Bei chronischer Hepatitis B oder C findet man eine Heraufregulierung auf dem Endothel neugebildeter Blutgefäße [68-70].

CCL21 (6Ckine/SLC, Rezeptor ist CCR7) konnte beim Menschen nur in den lymphoiden Organen, im murinen System u. a. in Lunge, Niere, Herz und Leber detektiert werden. In der Leber wird die konstitutive Produktion von CCL21 portalem lymphatischen Endothel sowie Bindegewebe bzw. einigen DCs im Periportalfeld zugeschrieben [69, 71-73].

Weitere konstitutiv exprimierte Chemokine sind u. a. CXCL16 (Bonzo-Ligand oder SexCkine, Rezeptor ist CXCR6) [74, 75] und CCL20 (MIP-3 α /LARC = Liver and activation-regulated chemokine, Rezeptor ist CCR6) [76-78], sowie die CCR1 bindenden Chemokine CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES = regulated on activation, normally T-cell-expressed and -secreted) und CCL15 (HCC-2/MIP-5) [79-81].

Die Kombination von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen bestimmt die Rekrutierung von Lymphozyten zu den peripheren Organen. In der Leber ist die Anzahl der beteiligten Moleküle unter physiologischen Bedingungen zwar begrenzt, das genaue Zusammenspiel der

konstitutiv exprimierten Chemokine und der auf den Leberendothelien vorhandenen Adhäsionsmoleküle muss jedoch noch geklärt werden.

1.3.3 Induktion peripherer Toleranz in der Leber

Neben den metabolischen Aufgaben übernimmt die Leber eine Anzahl wichtiger Funktionen für das Immunsystem. Bezüglich der angeborenen Immunantwort ist die Leber wichtig für die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und die Eliminierung apoptotischer Zellen. In Bezug auf die adaptive Immunantwort spielt die Leber nicht nur eine Rolle bei der Deletion aktivierter T-Zellen, die inflammatorischen Reaktionen aus dem ganzen Körper entstammen, und wahrscheinlich bei der extrathymischen T-Zell-Differenzierung, sondern sie ist auch an der Induktion peripherer Toleranz beteiligt [82]. So zeigen Transplantationsmodelle, dass die Leber im Vergleich zu anderen Organen nicht nur besser akzeptiert wird, sondern – bei gleichzeitiger Transplantation mehrerer Organe – auch die Akzeptanz anderer allogener Organe erhöht [83]. Die Leber scheint auch eine Rolle für die Etablierung von oraler Toleranz zu spielen, da die Induktion oraler Toleranz durch einen portocavalen Shunt, der die Blutzufuhr vom Darm zur Leber unterbricht, verhindert werden kann [84].

Über den Einfluss der Leber auf CD8⁺ T-Zellen ist bereits einiges bekannt. So akkumulieren aktivierte Antigen-spezifische CD8⁺ T Zellen in der Leber und werden dort mittels Apoptose eliminiert [85]. In Leber-Transplantationsmodellen werden allospezifische CD8⁺ T-Zellen in der Leber eliminiert oder *in vivo* moduliert [86, 87], was zu systemischer Donor-spezifischer Toleranz führt. Tiermodelle mit Leber-spezifischer Antigenexpression zeigen, dass Stimulation von CD8⁺ T-Zellen in der Leber durch Herunterregulierung der TZR-Expression [88], Deletion [89] oder Induktion von Anergie [90] zu systemischer Toleranz führen.

Über die Induktion von Toleranz durch die Modulation von CD4⁺ T-Zellen ist weniger bekannt. Analog zur Akkumulation von CD8⁺ T-Zellen nach Antigengabe, konnte dies auch für CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden [91]. Orale Gabe hoher Antigen-Dosen führt zur Generierung regulatorischer CD4⁺ T-Zellen in der Leber [92]. Die Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen durch *in vitro* generierte DCs, die aus Leber residenten Vorläufern stammen, führt zur Synthese der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 [93].

Wichtige Voraussetzung für die Modulation von CD4⁺ T-Zellen ist die Anwesenheit von Zellen, die Antigene über den MHC-II-Komplex präsentieren. In der Leber finden sich verschiedene Zellpopulationen, die diese Aufgabe übernehmen können. Neben den Kupffer Zellen und den hepatischen DCs gehören die LSEC zu den Leber-spezifischen APZ-Populationen [53]. Sie besitzen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose die Fähigkeit der Antigen-Aufnahme [94] und exprimieren für APZ charakteristische Oberflächenmoleküle:

MHC-I und MHC-II, CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1) sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [95-97]. Bisher konnte für CD8⁺ T-Zellen die Induktion oraler Toleranz nach Cross-Präsentation durch LSEC nachgewiesen werden [90, 98]. Bezüglich der Modulation von CD4⁺ T-Zellen sind in der Literatur konträre Ergebnisse zu finden. So wurde einerseits die Aktivierung CD4⁺ T-Zellen durch LSEC nachgewiesen [99, 100], andererseits wurde den LSEC die Fähigkeit zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen abgesprochen [101].

2 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Neben der metabolischen Funktion übernimmt die Leber verschiedenste Funktionen für das Immunsystem. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion zwischen den sinusoidalen Endothelzellen und CD4⁺ T-Zellen genauer zu untersuchen.

Zum einen sollte geprüft werden, inwieweit LSEC die Migration der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu anderen Endothelien beeinflussen können. Ferner sollte festgestellt werden, ob die LSEC als Sieb für bestimmte T-Zell-Populationen dienen und somit an der besonderen Zusammensetzung der Leber-residenten Lymphozyten beteiligt sein könnten. Dazu wurde folgender funktioneller Ansatz gewählt: In einem transendothelialen Migrationsassay wurde die Chemotaxis von CD4⁺ T-Lymphozyten *in vitro* untersucht. Dabei wurde der Einfluss der LSEC mit dem von Kontroll-Endothelien verglichen. Durch Verwendung von in der Leber konstitutiv exprimierten Chemokinen wurde das Migrationsverhalten der CD4⁺ T-Zellen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen betrachtet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob LSEC in der Lage sind, naive CD4⁺ T-Zellen Antigen-spezifisch zu modulieren und gegebenenfalls periphere Toleranz zu induzieren. Bezüglich der notwendigen Voraussetzungen, der MHC-II restringierten Antigen-Präsentation und der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen durch die LSEC, sind in der Literatur konträre Ergebnisse zu finden. Um den Einfluss der LSEC auf die Antigen-anhängige Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu klären, wurde in dieser Arbeit TZR-transgene naive CD4⁺ T-Zellen mit LSEC in Anwesenheit ihres Antigens *in vitro* kultiviert und anschließend ihre Proliferation und Zytokin-Produktion bestimmt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Materialien

μ-Slide VI flow through	Ibidi GmbH, Integrated BioDiagnostics, München
autoMACS	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Deckgläser, 24 x 50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Durchflusszytometer FACSCalibur [®] , LSR-I [®]	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmal-Spritzen und -Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Gammabestrahlungsanlage Biobeam 2000	STS Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH, Braunschweig
Heizplatte (inkl. Magnetrührer) Ikamag RCT	Janke & Kuntzel, Staufen
HSE Temperaturregler mit Anzeige	HugoSachs Elektronik, March-Hugstetten
Kryostat Microm HM500OM	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Laminar-Flow-Werkbank Herasafe HS18	Kendro Laboratory Products, Hanau
MACS-Säulen, -Magneten, -Ständer	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop für Zellkultur	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikroskop Leica DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Objektträger, 76 x 26 mm	R. Langenbrinck, Teningen
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen
Prä-Separationsfilter	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Rotlichtlampe Osram Theratherm, 250 W	Osram, München
Rundsieb Rotilabo [®]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schüttler (TH 25)	Edmund Bühler, Tübingen
TissueTek [®] Cryomold [®] , intermediate	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
Transwell [®] -Einsätze für 24-Loch-Platten (5 μm Porendurchmesser)	Corning Costar über WCP, Berlin
Zellkulturgefäße, -platten	Nunc oder Corning Costar über WCP, Berlin
Zellsieb (70 μm Nylon)	BD Falcon [™] über WCP, Berlin
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products, Hanau

3.1.2 Reagenzien

β-Mercaptoethanol (50 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Accutase™	Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA, USA
Aceton	J. T. Baker, Mallinckrodt, Deventer, NL
AcLDL-BODIPY® FL	Molecular Probes, Leiden, NL
Antiinfektivum Baytril®, 2,5 %	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester (CFSE)	Molecular Probes, Leiden, NL
Chemokine (murines CCL20, CCL21, CXCL9, CXCL12, CXCL16)	R&D Systems, Wiesbaden
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diamidinophenylindol (DAPI)	Molecular Probes, Leiden, NL
Diethylether	Merck KgaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KgaA, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) + 4500 g/l Glucose + L-Glutamin + Pyruvat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Entellan® (Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie)	Merck KgaA, Darmstadt
Ethanol	J. T. Baker, Mallinckrodt, Deventer, NL
Fetales Kälberserum (FCS), hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C	Biochrom AG, Berlin
Fibronektin (murin, human, bovin)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fluoresbrite™ plain YG 20.0 micron microspheres	Poysciences, Inc., Warrington, PA, USA
Formaldehydlösung (min. 37 %)	Merck KgaA, Darmstadt
Fluoromount-G™	Biozol Diagnostica GmbH, Eching
Giemsa Stain Stock Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt
Heparinase I aus Flavobacterium heparinum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin	Biochrom AG, Berlin
HEPES (1 M)	Biochrom AG, Berlin

Histopaque® -1083	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, NL
Hühnereiweißalbumin (OVA), Grad V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
IFN- γ (murin, rekombinant)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12 (murin, rekombinant)	R&D Systems, Wiesbaden
Ionomycin Calcium Salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaisers Glyceringelatine f. d. Mikroskopie	Merck KgaA, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Metrizamid, Grad 1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MicroBeads (anti-FITC und anti-PE, anti-Maus-CD62L, -CD4, -CD90)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Novalyse	Dianova GmbH, Hamburg
NycoPrep™ Universal	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
OVA-Peptid (Sequenz: ³²³ ISQAVHAAHAEINEAGR ³⁹³)	Institut für Biochemie, HU Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KgaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10000 μ g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Pertussis Toxin aus <i>Bordetella pertussis</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ratten IgG (ChromePure, whole molecule)	Dianova GmbH, Hamburg
Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 + GlutaMAX-I™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sigma FAST™ DAB Peroxidase Substrate Tablet Sets	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
TNF- α (murin, rekombinant)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe

Trypan-Blau (0,4 %)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

TSA™ Fluorescence Systems Kit

NEN™ Life Science Products, Boston, USA

3.1.3 Antikörper

Für die Immunhistologie wurden Peroxidase gekoppeltes Maus-anti-Ratten Immunglobulin (IgG) von Dianova GmbH, Hamburg und anti-Fluorescein-POD (Fab-Fragment) von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim verwendet. Beim Panning wurde u. a. Kaninchen-anti-Ratten IgG (polyklonal, kreuzreaktiv zu Maus IgG) von DakoCytomation, Hamburg eingesetzt. Weitere Antikörper, die beim Panning, bei magnetischer Sortierung und im Durchflusszytometer eingesetzt wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die verwendeten Fluorochrome finden sich in Tabelle 2.

Tabelle 1: für Zellisolation bzw. im Durchflusszytometer verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Herkunft
CD4	GK1.5 H129.19 RM4-5	Ratte-anti-Maus (R α M)	IgG2b IgG2a IgG2a	Deutsches Rheuma- Forschungszentrum (DRFZ), Berlin
CD8 α	53-6.72	R α M	IgG2a	DRFZ, Berlin
CD11b (Mac-1)	M1/70	R α M	IgG2b	DRFZ, Berlin
CD11c	N418	Armenischer Hamster-anti- Maus (ArmH α M)	IgG	DRFZ, Berlin
CD16/32 (FCRII/III)	2.4G2/75	R α M	IgG2b	DRFZ, Berlin
CD25	PC61.5	R α M	IgG1	DRFZ, Berlin
CD45R/B220	RA3.6B2	R α M	IgG2a	DRFZ, Berlin
CD45RB	16A	R α M	IgG2a	Becton Dickinson GmbH (BD), Heidelberg
CD54 (ICAM-1)	3E2	ArmH α M	IgG1	BD, Heidelberg
CD62L	MEL-14	R α M	IgG2a	E. Butcher, Stanford, CA, USA
CD90 (Thy 1.2)	53-2.1	R α M	IgG2a	BD, Heidelberg
CD184 (CXCR4)	2B11	R α M	IgG2b	BD, Heidelberg
Endothel	ME-9F1	R α M	IgG2a	A. Hamann, Berlin
IFN- γ	AN18.17.24	R α M	IgG1	DRFZ, Berlin
IL-10	JES5-16E3	R α M	IgG2b	BD, Heidelberg
IL-2	JES6-SH4	R α M	IgG2b	BD, Heidelberg
IL-4	11B11	R α M	IgG1	BD, Heidelberg

MHC-II	M5/114	R α M	IgG2b	DRFZ, Berlin
OVA-TZR ^{tg}	KJ1.26	R α M	IgG2a	DRFZ, Berlin
Pan-Endothel	Meca32	R α M	IgG2a	BD, Heidelberg
V β 5.1, 5.2 TZR	MR9-4	Maus-anti-Maus	IgG1	BD, Heidelberg

Um digoxigenierte oder biotinylierte Antikörper zu detektieren, wurden anti-Digoxigenin-Antikörper (DRFZ, Berlin) oder Fluoreszenz-konjugiertes Streptavidin (BD, Heidelberg) eingesetzt. Die Isotypkontrollen stammen ebenfalls von BD, Heidelberg.

Tabelle 2: verwendete Fluorochrome mit ihren Extinktions- und Emissionsmaxima

Fluoreszenzkonjugat	Extinktionsmaximum (λ in nm)	Emissionmaximum (λ in nm)
APC (Allophycocyanin)	650	660
BODIPY [®] FL	503	512
Cy5 (Indodicarbocyanin)	650	670
Cychrome	480; 565; 649	670
DAPI	340	488
FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat)	495	519
Hoechst 33342	355	465
PE (R-Phycoerythrin)	480; 565	613
PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	490	675
PI	550	650

3.1.4 Versuchstiere

Es wurden Mäuse zur Organentnahme und Isolierung von Lymphozyten bzw. Endothelzellen verwendet, die per Genickbruch getötet wurden. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen (spezifisch Pathogen-frei) gehalten.

Die Wildtyp- (wt) Stämme BALB/c (H-2^d) und C57Bl/6 (H-2^b) wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin oder von Charles River, Sulzfeld gekauft. Die OVA-TZR transgenen Stämme DO11.10 (H-2^d) [102] und OT-II (H-2^b) [103], deren transgene TZR spezifisch für das gleiche Ovalbuminpeptid (OVA-Peptid₃₂₉₋₃₃₇) sind [104], wurden ebenfalls vom BfR, Berlin gekauft. Ferner wurden die Mausstämmen CXCR3^{-/-} (H-2^b) [105] und ICAM-1^{-/-} (H-2^b) [106] vom BfR, Berlin bezogen. Die MHC-II^{-/-}-Mäuse des Stamms ABBN5-M (H-2^b) [107] wurden von Taconic, Germantown, NY, USA gekauft.

3.1.5 Medien und Puffer

Einfriermedium	50 % (v/v) FCS, 40 % (v/v) Medium, 10 % (v/v) DMSO
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10 mM KHCO ₃ , 155 mM NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5

Fixierungslösung (PFA/PBS)	1xPBS, 2 g/l PFA, pH 7
Giemsa-Färbelösung	2,6 % (v/v) Giemsa Stain Stock Solution in Aqua dest.
Komplett-DMEM (cDMEM)	D-MEM, 10 % (v/v) FCS, 2 % (v/v) Natrium-Pyruvat, 2 % (v/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) MEM NEAA, 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Komplett-RPMI (cRPMI)	RPMI 1640 mit GlutaMAX-I™, 25 mM HEPES, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Natrium-Pyruvat, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Metrizamid (30%ig)	30 % (w/v) Metrizamid in PBS
Migrationsmedium	RPMI 1640 ohne Phenolrot, 5 g/l BSA
Nycodenz-Lösung (17%ig)	26 % (v/v) RPMI 1640, 17 % (v/v) Nycoprep™ Universal, 10 % (v/v) FCS in Aqua dest.
Nycodenz-Lösung (30%ig)	50 % (v/v) Nycoprep™ Universal in Aqua dest.
PBS/BSA	PBS, 2 g/l BSA
Saponin-Puffer	PBS, 2 g/l BSA, 5 g/l Saponin
Th1-Medium	cRPMI, 5 μ g/ml OVA-Peptid, 20 ng/ml IFN- γ , 10 ng/ml IL-12, 5 μ g/ml anti-IL-4
TNB-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,5 % (v/v) Blocking Reagenz (aus TSA™ Fluorescence Systems Kit)
Verdaumedium	RPMI 1640 mit GlutaMAX-I™, 25 mM HEPES, 5 % (v/v) FCS, 0,05 % (w/v) Collagenase Typ IV, 0,002 % (w/v) DNase I

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistologie

Leber, Niere und Milz wurden BALB/c-Mäusen entnommen und in der Gießform Tissue-Tek® Cryomold® mit dem Gewebeeinfriermedium Tissue-Tek® O.C.T. Compound in flüssigem Stickstoff eingefroren. Am Kryostat wurden 6 μ m Kryoschnitte angefertigt und über 5 min auf einer Heizplatte bei 50°C getrocknet. Nach 10 min Inkubation in eiskaltem Aceton und anschließender Trocknung bei Raumtemperatur (RT) konnten die Schnitte bis zur immunhistologischen Färbung bei -20°C gelagert werden. Die Schnitte wurden nach dem Auftauen erneut für 10 min in eiskaltem Aceton inkubiert und getrocknet, anschließend für 30 min bei RT mit TNB-Puffer und dann 60 min mit ME-9F1 in TNB inkubiert. Nach hintereinanderfolgender Inkubation mit Maus-anti-Ratte IgG konjugierter Peroxidase über 30 min, Signal-Amplifikation mit Hilfe des TSA™ Fluorescence Systems Kit und Anti-Fluorescein-POD über 30 min wurde die Peroxidaseaktivität mit Hilfe des Sigma FAST™ DAB Peroxidase Substrate Tablet Sets detektiert. Nach jedem Schritt wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit Hämatoxylin für 5 min und anschließendem Waschen mit Leitungswasser wurden die Schnitte in 37°C warmer

Kaisergelatine eingebettet. Die Schnitte wurden am Photomikroskop Axiophot analysiert; dabei wurden Dia-Aufnahmen (auf Kodak EPT 160T Film) gemacht.

3.2.2 Isolation verschiedener Zellpopulationen

3.2.2.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz

Zur Gewinnung lymphoider Zellen wurden Lymphknoten und/oder Milz entnommen. Die unter der Haut befindlichen Lymphknoten – Unterkiefer- (*Lnn mandibularis*) und Halslymphknoten (*Lnn cervicales superficiales*), die Lymphknoten des Achsellymphzentrums (*Lnn axillares et cubiti*) und die Kniefaltenlymphknoten (*Lnn subiliaci*) – fasst man als periphere Lymphknoten (pLN) zusammen. Die Darm-assoziierten Lymphknoten (*Lnn jejuni*, *Lnn iliaci*, *Lnn colici*) – bezeichnet man als mesenteriale Lymphknoten (mLN).

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe nach Zerkleinern mit einer Schere mit Hilfe eines Spritzenkolbens durch ein Metallsieb gerieben. Die Suspension wurde einmal mit Medium gewaschen (Auffüllen und Zentrifugation bei 300xg für 10 min) und anschließend zum einen zur Dichtegradientenzentrifugation auf Histopaque®-1083 geschichtet und für 20 min bei RT ohne Bremse mit 755xg zentrifugiert. Lebende, mononukleäre Zellen sammeln sich dabei in der Interphase, die abpipettiert und zweimal gewaschen wurden. Zum andern wurde die Einzelzellsuspension einfach für 3 min auf Eis mit dem Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert und danach zweimal gewaschen.

Panning

Beim Panning wurden CD4⁺ T-Zellen durch Depletion unerwünschter Zell-Populationen isoliert bzw. angereichert.

Petrischalen wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µg/ml Kaninchen-anti-Ratte Immunglobulin inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS, einmal mit cRPMI gewaschen und dann die Zellsuspension für 15 min bei RT auf diesen Platten inkubiert, so dass B-Zellen über Zelloberflächen-exprimierte IgGs auf der Platte adhärten. Ungebundene Zellen wurden abgeerntet und mit einer Antikörper-Mischung aus anti-CD8 und anti-CD11b (Panning-Mix) für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen in PBS/BSA und Abzentrifugieren (300xg für 10 min) wurden die Zellen erneut auf solche Platten gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nun adhärten alle Antikörper-gebundenen Zellen an die Platte und die verbleibenden nicht-adhären Zellen konnten abgesammelt werden.

CD4⁺ T-Zellen aus Milzen wurden damit auf 68-85 % angereichert. Für die Anreicherung von Memory/Effektor CD4⁺ T-Zellen aus Milzen wurde 1,5 µg/ml anti-CD62L zum Panning-Mix dazugegeben. Der Anteil der Memory/Effektor-Zellen stieg dadurch von 30 % auf 60 %.

Für die Isolation naiver CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten wurde dem Panning-Mix anti-CD25 und anti-CD16/CD32 zugegeben. Nach dem Panning lag der Anteil der CD4⁺ T-Zellen bei 97-99 %. Anschließend wurden die naiven Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) weiter aufgereinigt (> 98 % CD62L⁺ CD4⁺).

MACS

Die zu sortierenden Zellen wurden nach Angaben des Herstellers mit Antikörpern, an die magnetische Mikro-Kügelchen (Beads) gekoppelt sind, inkubiert, mit PBS/BSA gewaschen und in einem Magnetfeld auf eine ferromagnetische Säule gegeben. Dies geschah entweder manuell über eine L/S-Säule an einem MACS-Magneten oder mittels autoMACS. In beiden Fällen wurden durch Spülen der Säule mit PBS/BSA ungebundene Zellen ausgewaschen und die Beads-tragenden Zellen konnten nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden.

Mit dieser Methode wurden zum einen naive CD4⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten über Selektion auf CD4 und CD62L sortiert. Teilweise wurden zuvor die APZ über anti-MHC-II, anti-B220, anti-CD11b und anti-CD11c depletiert. Dies führte zu einer Reinheit der naiven CD4⁺ T-Zellen von ~ 99 % mit < 1 % MHC-II⁺ Zellen. Des Weiteren wurden Milz-APZ durch CD90-Depletion sortiert (> 95 % MHC-II⁺).

3.2.2.2 Isolation von hepatischen Lymphozyten und LSEC

Die Leber 8-10 Wochen alter Mäuse wurde freigelegt und mittels einer 27xG-Kanüle auf einer 20-ml-Spritze über die *Vena portae* mit 4-5 ml Verdaumedium gespült. Nach Abtrennen der Gallenblase wurde die Leber herausgenommen, mit Schere und Pinzette zerkleinert und in Verdaumedium für 30 min bei 37°C mit 200 rpm im Schüttler verdaut. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde die Suspension zuerst über ein Metallsieb, dann über ein Zellsieb gegeben und übriggebliebene Organstücke wurden mittels eines Spritzenkolbens zerkleinert. Nach Waschen und Resuspendieren in RPMI 1640 wurden die nicht-parenchymatischen Zellen (NPZ) der Leber von den Hepatozyten über einen Einschnitt-Gradienten getrennt. Dafür wurden die Leberzellen in einer 24%igen Metrizamid- oder einer 26%igen Nycodenz-Lösung (Dichte = 1,136 g/l) unter cRPMI unterschichtet und mit 1180xg ohne Bremse bei RT zentrifugiert. Die Interphase, hauptsächlich bestehend aus NPZ, wurde abgenommen, in PBS/BSA gewaschen und nach Inkubation für 3 min auf Eis in Erythrozyten-Lyse-Puffer erneut gewaschen.

Hepatische Lymphozyten in der NPZ-Fraktion wurden im Durchflusszytometer über Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) erkannt und über Oberflächenmarker analysiert.

Die LSEC wurden mittels MACS aus der NPZ-Fraktion gewonnen. Nach Blockade unspezifischer Bindungen mit 1 µg anti-FcγRII/III pro 1×10^6 Zellen wurden die Zellen mit dem Endothel-spezifischen Antikörper ME-9F1-FITC und mit anti-FITC-MicroBeads inkubiert. Nach Entfernen möglicher Aggregate durch einen Pre-Separation-Filter wurden die Endothelzellen im autoMACS in der Positivfraktion angereichert. Die Zellen wurden mit 2×10^6 /ml cRPMI ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch gründliches Waschen mit PBS entfernt, wohingegen die adhärenenten Endothelzellen auf der Platte verblieben.

Parallel erfolgte die Reinheitskontrolle mittels BODIPY[®] FL konjugiertem acetyliertem „low density lipoprotein“ (AcLDL), welches spezifisch von Endothelzellen aufgenommen wird [108]: Nach der magnetischer Anreicherung der Endothelzellen wurde ein Aliquot der Zellen über Nacht mit 1 µg/ml AcLDL inkubiert und am nächsten Tag wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Dann wurden die Endothelzellen nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C mit Accutase[™] von der Zellkulturplatte abgeerntet und im Durchflusszytometer analysiert. LSEC mit einer Reinheit über 95 % wurden für Experimente verwendet.

3.2.3 Kultivierung der Endothelzellen

Die LSEC wurden in cRPMI kultiviert und einen Tag – nur für die Filmaufnahmen zwei Tage – nach der *ex vivo* Isolation im Experiment verwendet.

Die Zelllinie mIEND wurde aus primären Endothelzellkulturen von murinen mesenterialen Lymphknoten generiert [109]. Die adhärenent wachsenden Zellen wurden in T25-Flaschen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und zweimal pro Woche mit frischem cRPMI versetzt. Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen 2-3 Tage nach Erreichen der Konfluenz 1:3 bis 1:5 gesplittet. Hierfür wurden sie einmal mit PBS gewaschen, für ca. 5 min mit Accutase[™] im Brutschrank inkubiert, abgeerntet, gewaschen und in frischem Medium ausgesät. Für die Experimente wurden die Zellen ebenfalls mit Accutase[™] abgeerntet.

Die Endothelioma-Zelllinie bEND5 entstammt aus Gehirn von BALB/c-Mäusen [110, 111]. Die adhärenent wachsenden Zellen wurden wie die mIEND kultiviert, dabei wurde cDMEM verwendet. Da die Linie empfindlich gegenüber zu häufigem Passagieren ist, wurden die Zellen frühestens 14 Tage nach Erreichen der Konfluenz für die Experimente oder zur Weiterkultivierung abgeerntet.

3.2.4 FACS-Färbung und -Analyse

3.2.4.1 Oberflächenfärbung

Mit der Oberflächenfärbung werden Moleküle auf der Zelle angefärbt, die unterschiedliche Entwicklungsstadien/-linien von Leukozyten repräsentieren oder distinkte Funktionen haben. Sie wurden ursprünglich als Differenzierungsantigene bezeichnet. Gruppen von Antikörpern, welche das gleiche Differenzierungsantigen erkennen, definieren ein „cluster of differentiation“ (CD).

Für die Färbungen wurden jeweils ca. 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen oder Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, und mit 300xg zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, enthält die Färbelösung (PBS/BSA) neben den Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern 10 µg/ml anti-FCR2/3 und 10 µg/ml Ratten-IgG. Die Zellen werden 15 min auf Eis inkubiert, mit PBS/BSA gewaschen und in frischem PBS/BSA resuspendiert. Wurde ein Sekundärreagenz bzw. -antikörper verwendet, wurde die zweite Färbung nach gleichem Protokoll durchgeführt. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die ideale Konzentration der Antikörper und Sekundärreagenzien wurde vorher durch Titration bestimmt. Sie liegt meist bei 1-5 µg/ml. Die verwendeten Antikörper bzw. Fluorochrome sind in Tabelle 1 bzw. 2 aufgeführt.

3.2.4.2 Färbung von Zellen aus murinem Blut

4-5 Tropfen Blut wurde über die Schwanzvene entnommen und mit 10 µl Heparin versetzt. 50 µl Blut wurden mit 50 µl PBS/BSA vermischt, nach Antikörperzugabe 15 min bei 4°C inkubiert und danach mit PBS/BSA gewaschen. Die Zellen wurden dann in 100 µl Novalyse resuspendiert, für 10 min bei RT inkubiert, mit 1 ml Aqua dest. aufgefüllt, erneut für 10 min bei RT inkubiert und wieder zentrifugiert. Zur Messung wurden die Zellen abschließend in 0,5 % PFA/PBS resuspendiert.

3.2.4.3 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen nach PMA/IM-Stimulation

Mit der intrazellulären Färbung wurden von der Zelle produzierte Zytokine detektiert. Da *ex vivo* isolierte T-Zellen spontan nahezu keine Zytokine exprimieren, wurden die Zellen vor dem Färben stimuliert: Mit einer Zellkonzentration von max. 5×10^6 /ml cRPMI wurden die Zellen für 4 h mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (IM) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. 2 h vor Ende der Inkubation wurden 10 µg/ml Brefeldin A hinzugegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen in PBS/BSA gewaschen, Oberflächen-gefärbt und mit 2 % PFA/PBS für 15 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/BSA wurden die Zellen durch Resuspendierung in Saponin-Puffer permeabilisiert. Anschließend wurde die

intrazelluläre Färbung in Saponin-Puffer, der neben den Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern 10 µg/ml Ratten-IgG enthielt, über 30 min bei RT im Dunkeln durchgeführt. Nach Waschen mit Saponin-Puffer und dann mit PBS/BSA wurden die Zellen in 0,5 % PFA/PBS resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunklen aufbewahrt. Zur Überprüfung der spezifischen Färbung wurden Antikörper der entsprechenden Spezies und des gleichen Isotyps verwendet (Isotyp-Kontrolle).

3.2.4.4 Messung und Analyse

Die Messung wurde am Durchflusszytometer FACSCalibur[®] oder LSR-I[®] durchgeführt und zur Auswertung wurde das Programm CellQuestPro[®] verwendet. Bei Messung unfixierter Zellen wurden tote Zellen durch Anfärbung mit PI bzw. mit DAPI ausgeschlossen, lebende Lymphozyten sowie Endothelzellen wurden durch FSC und SSC im Zweiparameter-Punktdiagramm (Dot Plot) erkannt. Mit Hilfe der Negativ- bzw. Isotypkontrollen konnten die Fluoreszenz-markierten Zellen bestimmt werden. Die Frequenzen und Fluoreszenzintensitäten ließen sich dann im Dot Plot oder im Histogramm darstellen.

3.2.5 CFSE-Markierung

Durch Markierung von Zellen mit CFSE ließ sich deren Proliferation im Durchflusszytometer verfolgen, da dieser Farbstoff bei Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird [112]. Dafür wurden die Zellen erst zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml mit 5 µM CFSE bei RT inkubiert. Nach 2 min 40 s wurde die Reaktion mit kaltem cRPMI gestoppt, die Zellen wurden zweimal gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Zur Analyse der Proliferation wurde der GeoMean der CFSE-Fluoreszenzintensität angegeben oder die mittlere Anzahl der Teilungen (d) berechnet: $d = \sum (n_i/n_t \times g_i)$ mit g_i = Generationszahl beginnend mit 0 für die ungeteilten Zellen, n_i = Zellzahl innerhalb jeder Generation und n_t = Gesamtzellzahl.

3.2.6 *In vitro* Generierung von Th1-Zellen

Naive CD4⁺ T-Zellen werden aus Lymphknoten und Milz OVA-TZR-transgener Mäuse über CD4- und CD62L-MACS isoliert und mit CD90-depletierten APZ im Verhältnis 1:3 in Th1-Medium für 6 Tage kultiviert. Vor Verwendung werden die Zellen über einen 17%igen Nycodenz-Gradienten gegeben. Die Qualität der *in vitro* generierten Th1-Zellen wird über den Anteil IFN-γ-produzierender Zellen nach PMA/IM-Restimulation kontrolliert; dieser sollte mehr als 60 % betragen.

3.2.7 Generierung von Knochenmarkschimären

Zur Generierung von Knochenmarkschimären (KMCh) wurden die Rezipienten-Mäuse mit 10,4 Gy in der Gammabestrahlungsanlage Biobeam 2000 lethal bestrahlt. Am nächsten Tag wurden $3\text{-}5 \times 10^6$ CD90-depletierte Knochenmark-Zellen über die Schwanzvene intravenös (i. v.) injiziert. Das Knochenmark wurde dazu aus Femur und Tibia der beiden hinteren Extremitäten der Spender-Mäuse isoliert: Die Knochen wurden entnommen und von anhaftendem Gewebe weitgehend befreit. Dann wurde das Knochenmark mit einer Spritze und 27xG-Kanüle herausgespült und durch Resuspendieren vereinzelt. Nach Lyse der Erythrozyten wurden CD90⁺ Zellen über MACS depletiert und die Zellzahl bestimmt.

Die Rezipienten wurden eine Woche vor Bestrahlung und bis 4 Wochen nach dem Knochenmarkstransfer mit 0,4 % (v/v) Antiinfektivum Baytril[®] im Trinkwasser behandelt. Nach 6 Wochen wurde das Ausmaß der Bestrahlung und der Rekonstitution durch Anfärben von MHC-II⁺, CD4⁺, CD8⁺ und B220⁺ Zellen im Blut überprüft. Bei erfolgreicher Rekonstitution wurden Leber- und Milzzellen 8-10 Wochen nach Knochenmarkstransfer isoliert; entweder aus naiven KMCh oder aus vorbehandelten KMCh, denen nach i. v. Injektion von OVA-TZR-transgenen CD4⁺ T-Zellen OVA-Protein oral oder i.v. verabreicht worden war.

3.2.8 Antigen-spezifische Kokultur von CD4⁺ T-Zellen mit LSEC oder Milz-APZ

Naive CD4⁺ T-Zellen wurden aus OVA-TZR-transgenen Mäusen isoliert; entweder aus Lymphknoten durch Panning und anschließender CD62L-Selektion mit MACS, oder aus Milz und Lymphknoten durch MACS (CD4- und CD62L-Selektion, z. T. mit vorgeschalteter APZ-Depletion). Dann wurden die Zellen mit CFSE markiert.

5×10^5 naive CD4⁺ T-Zellen wurden mit LSEC und OVA-Peptid kultiviert. Die LSEC waren einen Tag zuvor *ex vivo* isoliert, in einer 24-Loch-Platte mit einer Konzentration von 2×10^6 /ml cRPMI über Nacht kultiviert und gründlich gewaschen worden. CD90-depletierte Milz-APZ – je 1×10^6 pro Ansatz – dienten dabei als Kontroll-APZ. Es wurden das Maß der Proliferation und die Höhe der Zytokin-Produktion über die Zeit und bei verschiedenen Antigenkonzentrationen untersucht.

In einigen Experimenten wurden die mit LSEC oder Milz-APZ kultivierten CD4⁺ T-Zellen nach 6 Tagen erneut Antigen-spezifisch kultiviert. Dazu wurden die CD4⁺ T-Zellen geerntet und nach einem 17%igen Nycodenz-Gradienten und MHC-II-Depletion durch MACS mit frischen LSEC bzw. Milz-APZ und OVA-Peptid für weitere 6 Tage in Kultur genommen.

In anderen Experimenten wurden die LSEC direkt nach der Isolation mit 20 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α in cRPMI über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden dann nach 24 h

gründlich gewaschen und für die Antigen-spezifische Kokultur mit naiven CD4⁺ T-Zellen eingesetzt oder abgeerntet und im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.9 Transendothelialer Migrationsassay

Zur Untersuchung des Transmigrationsverhaltens verschiedener T-Zellpopulationen *in vitro* wurde das Transwell[®]-System von Corning Costar verwendet (24-Loch-Platten mit Transwell[®]-Einsätzen, deren Boden aus einer Polycarbonat-Membran mit 5 µm großen Poren besteht).

3.2.9.1 Kultivierung der Endothelzellen auf den Transwell[®]-Einsätzen

Die LSEC wurden wie oben beschrieben eine Tag vor dem Experiment *ex vivo* isoliert. Nach MACS wurden 5x10⁵ Zellen in 200 µl cRPMI auf den Transwell[®]-Einsätzen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Membranen der Einsätze waren vorher 1 h mit 10 µg/ml Fibonektin (FN) inkubiert worden und nach Absaugen des FN für 2 h bei 27°C getrocknet. Für einige Experimente wurden die LSEC entweder mit 10 ng/ml Pertussis Toxin (PTX) oder Heparinase I (0,001 U/ml, 0,1 U/ml oder 5 U/ml) in cRPMI für 2 h bei 37°C vorinkubiert und dann nach gründlichem Waschen im Transmigrationsassay eingesetzt.

Die verwendeten Endothelzelllinien wurden zwei Tage vor dem Transmigrationsexperiment auf den FN beschichteten Transwell[®]-Einsätzen ausgesät. Wegen der unterschiedlichen Größen der Endothelzellen wurden verschiedene Zellzahlen ausgesät, um am Tag des Transmigrationsexperiments vergleichbare Konfluenzen der Monolayer zu erhalten: 4x10⁴ mlEND in 200 µl cRPMI und 5x10⁴ bEND5 in 200 µl cDMEM. Als Kontrollen wurden nur mit FN beschichtete Transwell[®]-Einsätze verwendet.

Zur Überprüfung der Endothel-Monolayer wurden die Transwell[®]-Einsätze nach Ende des Experiments zweimal mit PBS gewaschen, für 2 h über Formaldehydlösung (min. 37 %) fixiert und für 10 min mit 2,6 % Giemsa in Aqua dest. gefärbt. Die Membranen wurden von den Transwell[®]-Einsätzen gelöst und auf Objektträgern in Entellan[®] eingebettet. Dann konnte die Belegung der Membranporen durch die Endothelzellen am Photomikroskop Axiophot quantifiziert werden: Die Endothelien bedeckten etwa 80 % der Poren.

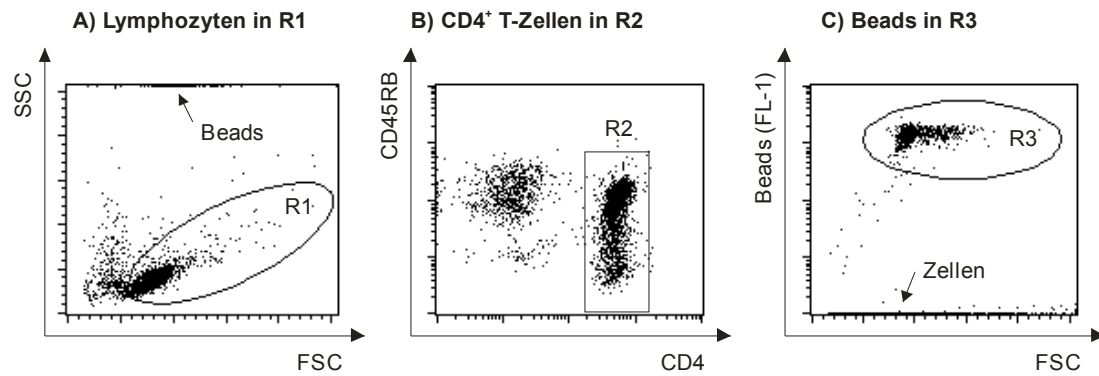
3.2.9.2 Isolation und Transmigration der T-Zellen

Milzzellen wurden nach Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque[®]-1083 durch Panning auf CD4⁺ T-Zellen angereichert. Für die Analyse von Zytokin-produzierenden CD4⁺ T-Zellen wurde zusätzlich der Anteil an CD62L^{low} Zellen erhöht, um eine höhere Frequenz an Zytokin-produzierenden Effektor-/Memory T-Zellen zu erhalten. Dann wurden die Zellen auf 5x10⁶/ml in Migrationsmedium eingestellt.

Kurz vor dem Transmigrationsassay wurden die Transwell[®]-Einsätze, auf denen die Endothelzellen kultiviert worden waren, dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Dann wurden 5×10^5 T-Zellen in die obere Kammer pipettiert und anschließend 600 μ l Migrationsmedium mit oder ohne Chemokin in die untere Kammer. Folgende Chemokine wurden verwendet: CXCL12 (10 bzw. 50 nM), CXCL9 (100 nM), CXCL16 (10 und 100 nM), CCL20 (10, 50 und 100 nM) und CCL21 (10 und 100 nM). Die optimale Konzentration der Chemokine war entweder in Vorexperimenten bestimmt oder hier titriert worden. Für die Bestimmung der Zahl eingesetzter Zellen (Input) wurden 5×10^5 T-Zellen in ein Loch einer 24-Loch-Platte ohne Transwell[®]-Einsätze überführt und auf 600 μ l aufgefüllt. Nach 90 minütiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die transmigrierten Zellen aus der unteren Kammer analysiert.

3.2.9.3 Quantifizierung der transmigrierten T-Zell-Populationen

Zur Quantifizierung wurden aus der unteren Kammer 5/6 der Zellsuspension (500 μ l) nach sorgfältiger Resuspendierung entnommen und in ein FACS-Röhrchen überführt, in welches zuvor 10 μ l Fluoresbrite[™] Microspheres, im folgenden als „Beads“ bezeichnet, verdünnt mit PBS vorgelegt worden waren. Analog wurden mit den Zellen des Inputs verfahren. Nach Blockade von unspezifischen Bindungen wurden Fluoreszenz-konjugierte Antikörper gegen CD4 und CD62L bzw. CD45RB zugegeben. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte ohne vorhergehendes Waschen. Die Zielzellen wurden über Größe, Granularität und die eingesetzten Antikörper identifiziert (Abb. 4A, B), die Beads konnten aufgrund ihrer Größe und der starken Fluoreszenzintensität im Fluoreszenz-Detektionskanal 1 (FL-1) getrennt von den Zellen detektiert werden (Abb. 4C). Nach Zählung von mindestens 3000 Zielzellen oder 4000 Beads pro Probe wurden die relativen Zahlen der Zielzellen und zugehörigen Beads bestimmt und damit die Transmigrationsraten berechnet; dargestellt als Prozent vom Input (Abb. 4D).



D) Berechnung der Transmigrationsraten als % vom Input

$$1.) \quad \text{abs. Zahl der CD4}^+ \text{ T-Zellen pro Probe} = \frac{\text{Ereignisse in R1} \cdot \text{R2}}{\text{Ereignisse in R3}} \times \text{abs. Zahl der Beads}$$

$$2.) \quad \% \text{ migrierter CD4}^+ \text{ T-Zellen pro Probe} = \frac{100}{\text{abs. Zahl des Inputs}} \times \text{abs. Zahl der CD4}^+ \text{ T-Zellen pro Probe}$$

Abb. 4: Quantifizierung der transmigrierten T-Zellen. Die transmigrierten Zellen wurden geerntet, mit Fluoresbrite™ Beads versetzt und im Durchflusszytometer über FSC/SSC (A) und die eingesetzten Fluoreszenz-konjugierten Antikörper (B) detektiert. Aus der absoluten Zahl der Zellen (R1*R2) und der der Fluoresbrite™ Beads (C: R3) in den Proben sowie im Input ließ sich dann die Transmigrationsrate berechnen (D). Hierbei ist es nicht notwendig, die absolute Zahl der Beads zu kennen, da dieser Wert in der Gleichung 2 in Zähler und Nenner erscheint, wenn Gleichung 1 und 2 kombiniert werden.

Für die Bestimmung der Migration von Zytokinproduzenten wurden Zellen aus 7-27 unteren Kammern zusammengeführt und mit PMA/IM stimuliert. Nach CD4-Oberflächenfärbung und intrazellulärer Färbung von IFN- γ , IL-4, und IL-10 konnten die Frequenzen der Zytokin-positiven Zellen unter den CD4⁺ T-Zellen ermittelt werden. Auch hier wurde ein Aliquot an Input-Zellen analog behandelt. Mit den erhaltenen Frequenzen ließen sich die Zellzahlen pro Probe berechnen, die dann ebenfalls in Prozent vom Input ausgedrückt werden konnten.

3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Ex vivo isolierte LSEC (2×10^5 in 50 μ l cMedium) wurden auf FN beschichteten Objektträgern über Nacht mit BODIPY® FL-konjugiertem AcLDL (1:1000) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellkerne nach gründlichem Waschen mit PBS mit 10 μ g/ml Hoechst 33342 über 15 min bei RT gefärbt. Die Zellen wurden dann in Fluoromount-G™ eingebettet und am Photomikroskop Axiophot analysiert. Dabei wurden digitale Aufnahmen mit Hilfe des Programms MetaVue gemacht.

3.2.11 Zeitrafferaufnahmen der transendothelialen Migration

Die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch das Leberendothel sollte *in vitro* beobachtet werden. Dazu wurden T-Zellen auf einen LSEC-Monolayer gegeben und ihr Migrationsverhalten am Phasenkontrastmikroskop aufgenommen und im Zeitraffer analysiert.

3.2.11.1 Kultivierung der Endothelzellen auf μ -Slides VI

Aus BALB/c-Mäusen isolierte LSEC wurden 2 Tage vor dem Experiment mit 2×10^6 /ml cRPMI in 6-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie gründlich gewaschen, mit AccutaseTM geerntet und je 1×10^6 in 30 μ l cRPMI für weitere 24 h auf μ -Slides VI kultiviert, die zuvor 40 min bei RT mit 120 μ g/ml FN inkubiert worden waren. Die Vergleichsendothelien bEND5 wurden zwei Tage vor dem Experiment mit 1×10^5 in 30 μ l cDMEM auf FN beschichteten μ -Slides VI ausgesät. Am Tag des Versuchs wurden die Endothelien dreimal mit warmem Medium gewaschen. Für die Chemokin-Präinkubation wurden die Endothelien über 2 h mit 50 nM CXCL12 in Medium im Brutschrank inkubiert und vor Zugabe der CD4⁺ T-Zellen erneut dreimal gründlich gewaschen.

3.2.11.2 Isolation und Behandlung der CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen wurden aus BALB/c-Milzen mittels MACS sortiert (> 99,4 % CD4⁺), 2 h in cRPMI im Brutschrank inkubiert und zur Dichtegradientenzentrifugation über 17%ige Nycodenz-Lösung geschichtet und für 10 min bei RT mit 755xg zentrifugiert. Dann wurden 1×10^6 Zellen in 30 μ l cRPMI auf die mit Endothelzellen bewachsenen μ -Slides VI gegeben. Nach 20 min wurden die Zellen einmal mit 100 μ l cRPMI gewaschen, um nicht-adhärenente CD4⁺ T-Zellen zu entfernen, und dann in 100 μ l cRPMI gehalten. Während des gesamten Versuchs wurden die Zellen mittels einer Rotlichtlampe und einem Temperatursensor auf 37 °C gehalten.

3.2.11.3 Aufnahme und Analyse

Für die Analyse wurden Fotos am Leica DM IRE2 Mikroskop mit dem Programm Leica Confocal Software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) im Phasenkontrast mit 80-facher Vergrößerung erstellt. Zur Berechnung der Adhäsion von CD4⁺ T-Zellen an die Endothelien wurden vor und nach dem Waschen 5 Bereiche auf den Objektträgern fotografiert. Für die Untersuchung wandernder bzw. transmigrierender Zellen wurden je Objektträger 3 Bereiche ausgewählt, die über einen Zeitraum von 10 min alle 5 Sekunden fotografiert wurden. Diese Serien wurden dann als Filme (avi-Format) mit Zeitraffer (10 Bilder/s, 1 s Filmzeit = 50 s Echtzeit) exportiert und ausgewertet. Dabei wurden die CD4⁺ T-Zellen in 3 Typen unterteilt: 1.) unbeweglich: Zellen liegen nicht adhärierend auf dem Endothel. Sie erscheinen im

Phasenkontrast sehr hell. 2.) mobil: Zellen flachen nach Adhäsion an das Endothel ab und wandern auf der Oberseite des Endothels um mehr als $\frac{1}{2}$ Zelldurchmesser. Sie erscheinen im Phasenkontrast mittel- bis dunkelgrau. 3.) transmigrierend: Zellen wandern unter das Endothel und z. T. zurück an die Oberseite. Sie erscheinen im Phasenkontrast dunkelgrau bis schwarz.

3.2.12 Graphische Darstellung und Statistik

Alle Graphen wurden mit den Programmen Excel (Microsoft) oder GraphPadPrism erstellt. Zur Berechnung von Signifikanzen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant angesehen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

4 Ergebnisse

4.1 *Ex vivo* Isolation der LSEC mit Hilfe des Antikörpers ME-9F1

Zur *ex vivo* Gewinnung muriner LSEC wurde der Endothel-spezifische Antikörper ME-9F1 verwendet. Die Eignung des Antikörpers zur Detektion der LSEC wurde zuerst in der Histologie überprüft: Auf Kryoschnitten von Leber, aber auch von Niere und Milz ließ sich das Endothel spezifisch mit dem Antikörper ME-9F1 anfärben (Abb. 5). Auf den Leberschnitten konnten mit diesem Antikörper neben den Endothelien größerer Blutgefäße auch die sinusoidalen Endothelzellen, die anhand ihrer Morphologie erkannt wurden, detektiert werden. Auch am Durchflusszytometer konnten die LSEC mit dem Antikörper ME-9F1 detektiert werden (Abb. 6A). Zur Kontrolle wurde das Endothel dabei mit dem Pan-Endothelmarker Meca32 gegengefärbt.

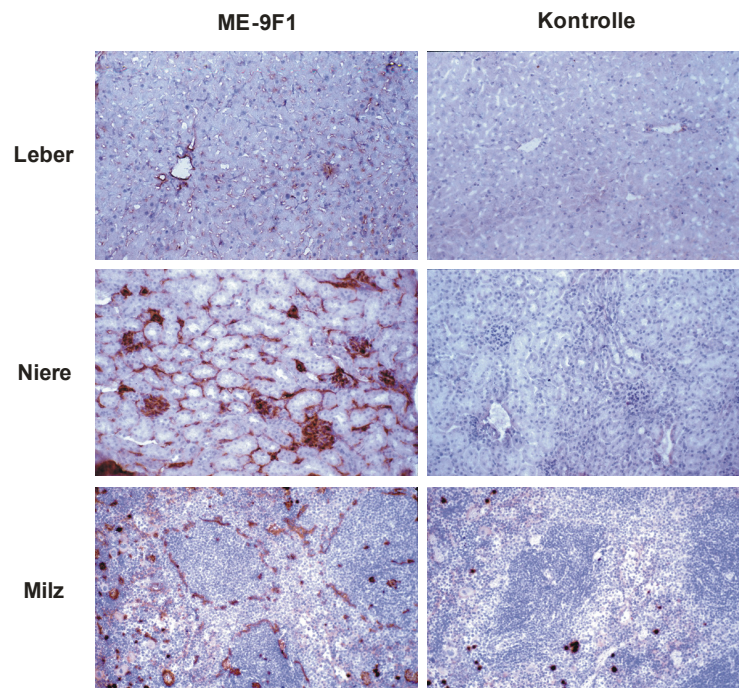


Abb. 5: Detektion des Endothels mit Hilfe des ME-9F1 auf Kryoschnitten von Leber, Niere und Milz. Auf Kryoschnitten von muriner Leber, Niere und Milz wurde das Endothel nach Inkubation mit dem Antikörper ME-9F1 und anti-Ratte-Peroxidase über Zugabe des Peroxidase-Substrats detektiert. Färbungen ohne den Primärantikörper dienten als Negativkontrollen. Zusätzlich wurden mit Hämatoxylin alle Zellkerne gefärbt. Anschließend wurden am Mikroskop Dias mit 20xVergrößerung aufgenommen.

Neben der Detektion der LSEC war der Antikörper ME-9F1 auch für die *ex vivo* Isolation der LSEC (siehe Material und Methoden, 3.2.2.2) geeignet. In der nicht-parenchymatischen Fraktion der Leber waren 15-30 % der Zellen ME-9F1⁺, nach magnetischer Sortierung mit ME-9F1 konnte der Anteil an Endothelzellen auf über 90 % gesteigert werden (Abb. 6B). Durch die anschließende über-Nacht-Kultur und das Entfernen aller nicht-adhärenen Zellen lag der Anteil der Endothelzellen bei > 95 % (Abb. 6C). Die Reinheit der Endothelzellen nach

der über-Nacht-Kultur wurde mittels AcLDL kontrolliert, welches spezifisch von Endothelzellen über den Mannose-Rezeptor aufgenommen [108] und durch Fluoreszenz-Kopplung im Durchflusszytometer detektiert werden kann.

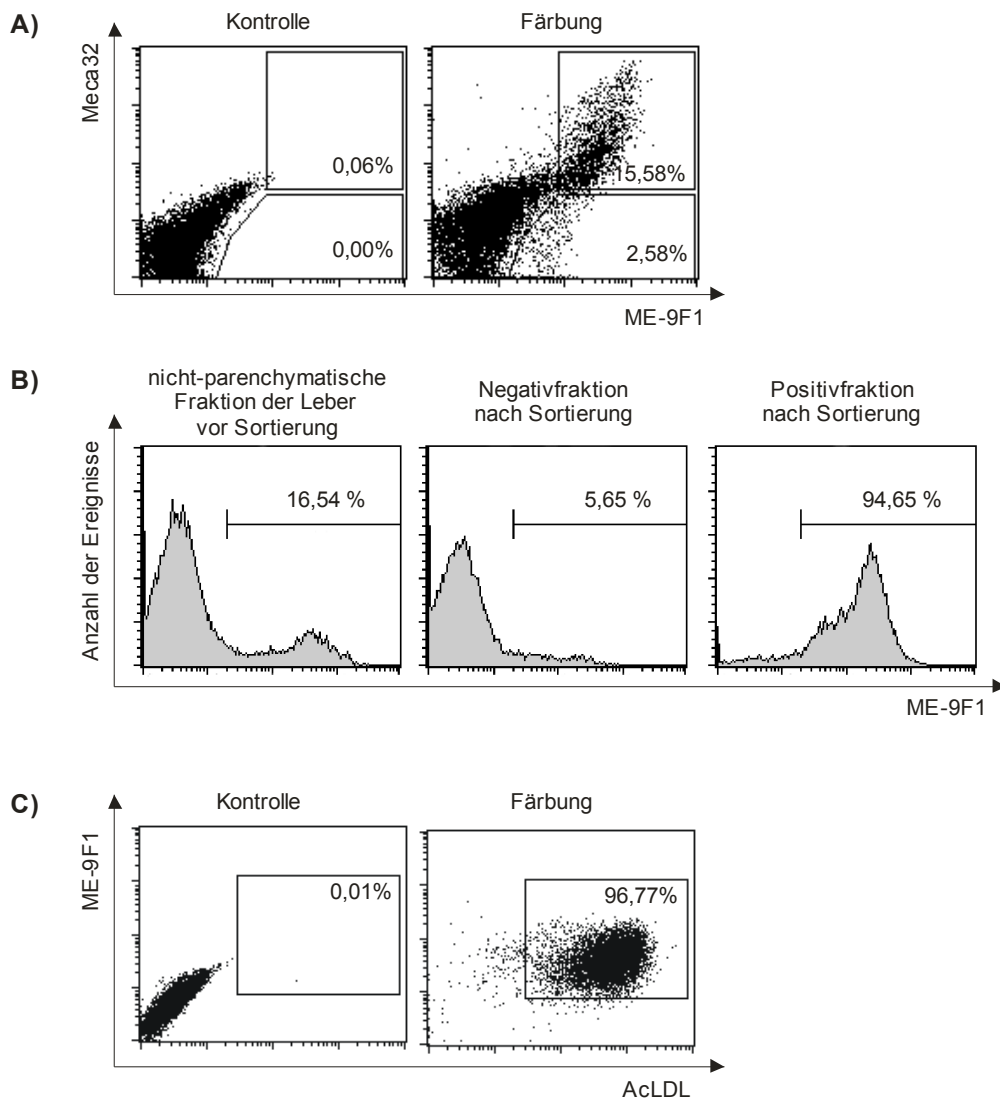


Abb. 6: Detektion der LSEC im Durchflusszytometer. Nach Collagenase-Verdau der Leber und einem Einschnitt-Gradienten konnten die LSEC in der nicht-parenchymatischen Fraktion der Leber mit dem Antikörper ME-9F1 detektiert werden; der Standardmarker für Endothel Meca32 zeigte eine deutliche Kofärbung (A). Der Antikörper ME-9F1 war auch in der magnetischen Sortierung verwendbar (B): Nach Inkubation der nicht-parenchymatischen Fraktion der Leber mit dem Antikörper ME-9F1-FITC und mit anti-FITC-MicroBeads wurden die Endothelzellen in der Positivfraktion auf > 90 % angereichert. Die Reinheit der LSEC-Isolation wurde über die spezifische Aufnahme von Fluoreszenz-gekoppeltem-AcLDL nach über-Nacht-Kultur im Durchflusszytometer kontrolliert (C). Die Prozentangaben sind repräsentative Werte.

4.2 Einfluss der LSEC auf die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen

Der Einfluss der LSEC auf die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen wurde in An- und Abwesenheit der LSEC im Transwell[®]-System und am Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die CD4⁺ T-Zellen wurden *ex vivo* aus Milzen isoliert. Nach Abreicherung von CD8⁺, CD11b⁺ und B-Zellen lag der Anteil der CD4⁺ T-Zellen bei 68-85 %. Mit Hilfe des Markers CD45RB, der auf naiven CD4⁺ T-Zellen sehr hoch exprimiert ist (CD45RB^{high}) und während

der Differenzierung in Effektor/Memory-Zellen herunter reguliert wird (CD45RB^{low}), zeigte sich, dass etwa 2/3 der *ex vivo* isolierten CD4⁺ Milzzellen naive, 1/3 Effektor/Memory-Zellen waren.

4.2.1 Gesteigerte Transmigration von CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit der LSEC

Zuerst wurde die transendotheliale Migration der gesamten CD4⁺ T-Zellen durch LSEC mit der Migration durch andere Endothelien verglichen. Die Migration durch Endothel-freie Transwell[®]-Membranen diente dabei als Standard.

Die spontane Transmigration der CD4⁺ T-Zellen durch eine Endothel-freie Membran lag bei $8,1 \pm 4,4$ %, welche durch die Anwesenheit der LSEC nicht verändert wurde ($8,6 \pm 5,1$ %). Die Anwesenheit der Kontroll-Endothelien bEND5 und mlEND hingegen führte zu einer signifikanten Verminderung der Transmigration auf $2,1 \pm 2,7$ % und $2,8 \pm 1,6$ % (Abb. 7A).

Durch den chemotaktischen Gradienten mit CXCL12 erhöhte sich die Transmigration der CD4⁺ T-Zellen durch Membranen ohne Endothel auf $26,7 \pm 10,3$ %. Durch den LSEC-Monolayer wurde diese Transmigration signifikant auf $49,6 \pm 16,8$ % gesteigert. Im Gegensatz dazu zeigte sich auf den Kontroll-Endothelien bEND5 und mlEND eine signifikant niedrigere Transmigration von $10,8 \pm 2,7$ % und $5,2 \pm 2,8$ % (Abb. 7B). Somit war die Chemotaxis der T-Zellen zu CXCL12 in Anwesenheit der LSEC nicht nur im Vergleich zur Migration durch die Kontrollendothelien erhöht, sondern auch im Vergleich zum Endothel-freien System.

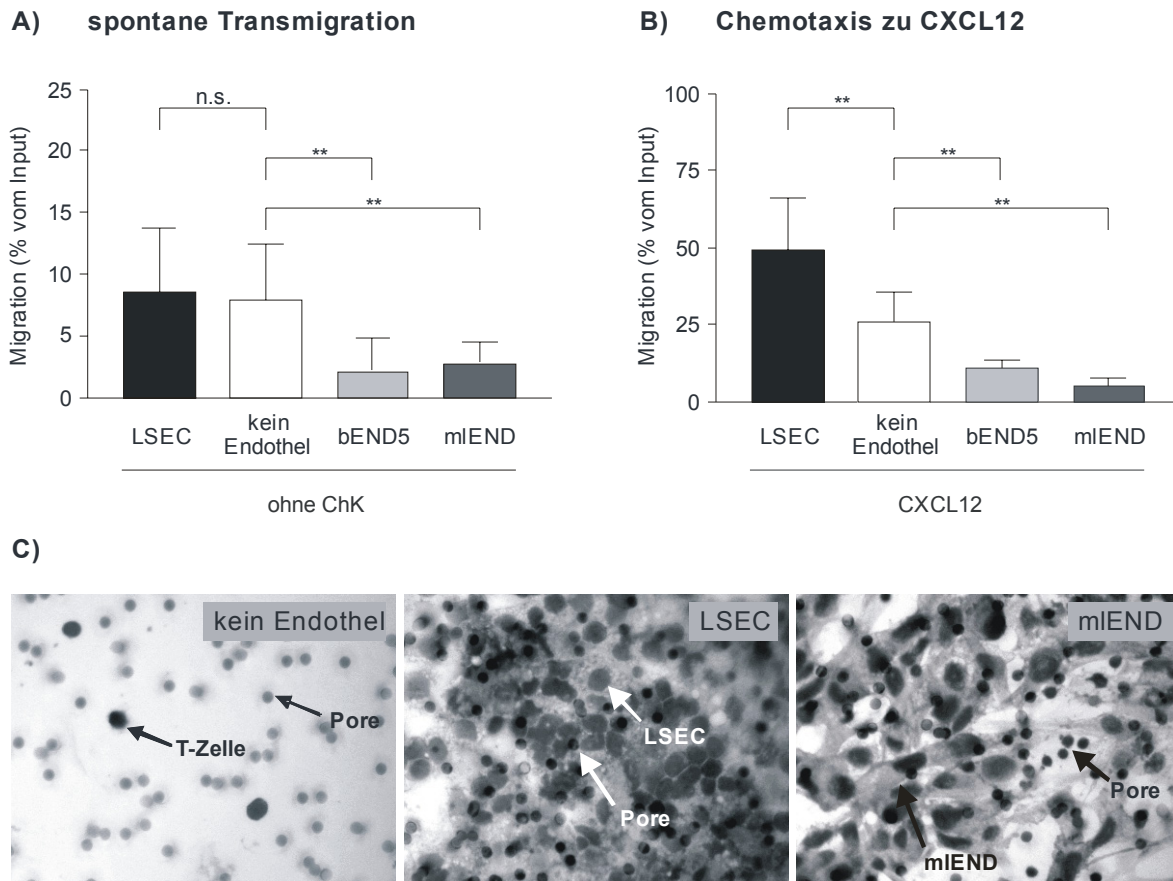


Abb. 7: Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit verschiedener Endothelien im Vergleich zum Endothel-freien System. Die *ex vivo* isolierten LSEC sowie die Kontroll-Endothelien bEND5 und mIEND wurden auf FN-beschichteten Transwell®-Einsätzen kultiviert; als Kontrolle dienten nur FN-beschichtete Einsätze. Die spontane Transmigration (A) und die Chemotaxis zu CXCL12 (B) von *ex vivo* isolierten $CD4^+$ T-Zellen der Milz wurde in An- und in Abwesenheit der verschiedenen Endothelzellen quantifiziert. Dazu wurden die transmigrierten T-Zellen nach 90 min Migrationszeit geerntet, mit Fluoresbrite™ Beads versetzt und nach Oberflächenfärbung im Durchflusszytometer analysiert. Über die Zahl der Zellen und der Fluoresbrite™ Beads in den Proben und im Input ließ sich dann die Migrationsrate berechnen. Die Diagramme zeigen Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) von mindest. 4 unabhängigen Experimenten mit n.s. = nicht signifikant und ** = $p < 0,01$. Nach dem Experiment wurden die Endothelzellen auf den Transwell®-Einsätzen mit Giemsa gefärbt und ihr Aussehen am Mikroskop kontrolliert (C).

Das Migrationsverhalten der $CD4^+$ T-Zellen auf LSEC wurde nicht nur im Transwell®-System, sondern auch am Phasenkontrastmikroskop untersucht. Als Vergleichsendothel wurden hier die bEND5-Zellen verwendet. Dabei wurde neben der Anzahl transmigrierender T-Zellen auch die Zahl adhätierender bzw. mobiler Zellen bestimmt: Auf Bildaufnahmen vor und nach Waschen der Zellen konnte die Anzahl adhätierender $CD4^+$ T-Zellen auf den Endothel-Monolayern berechnet werden, die Menge mobiler bzw. transmigrierender Zellen wurde in Zeitraffer-Aufnahmen quantifiziert (Abb. 8). Auf den LSEC adhätierten nach 20 min etwa 30 % der T-Zellen, auf den bEND5 waren es ca. 8 %. Während der 10 min Beobachtungszeit am Mikroskop wanderten ca. 6 % der T-Zellen entlang des LSEC-Monolayers und 1 % transmigrierte durch die LSEC, wohingegen auf den bEND5 nur bei

knapp 2 % der T-Zellen Mobilität und bei 0,1 % Transmigration beobachtet wurde. Ein Effekt durch Vorinkubation der Endothelien mit CXCL12 ließ sich nicht beobachten.

Da die Adhäsion an das Endothel Voraussetzung für die Transmigration der Zellen ist, könnte die erhöhte Adhäsion der CD4⁺ T-Zellen an die LSEC ein Grund für ihre gesteigerte Transmigration durch die LSEC sein.

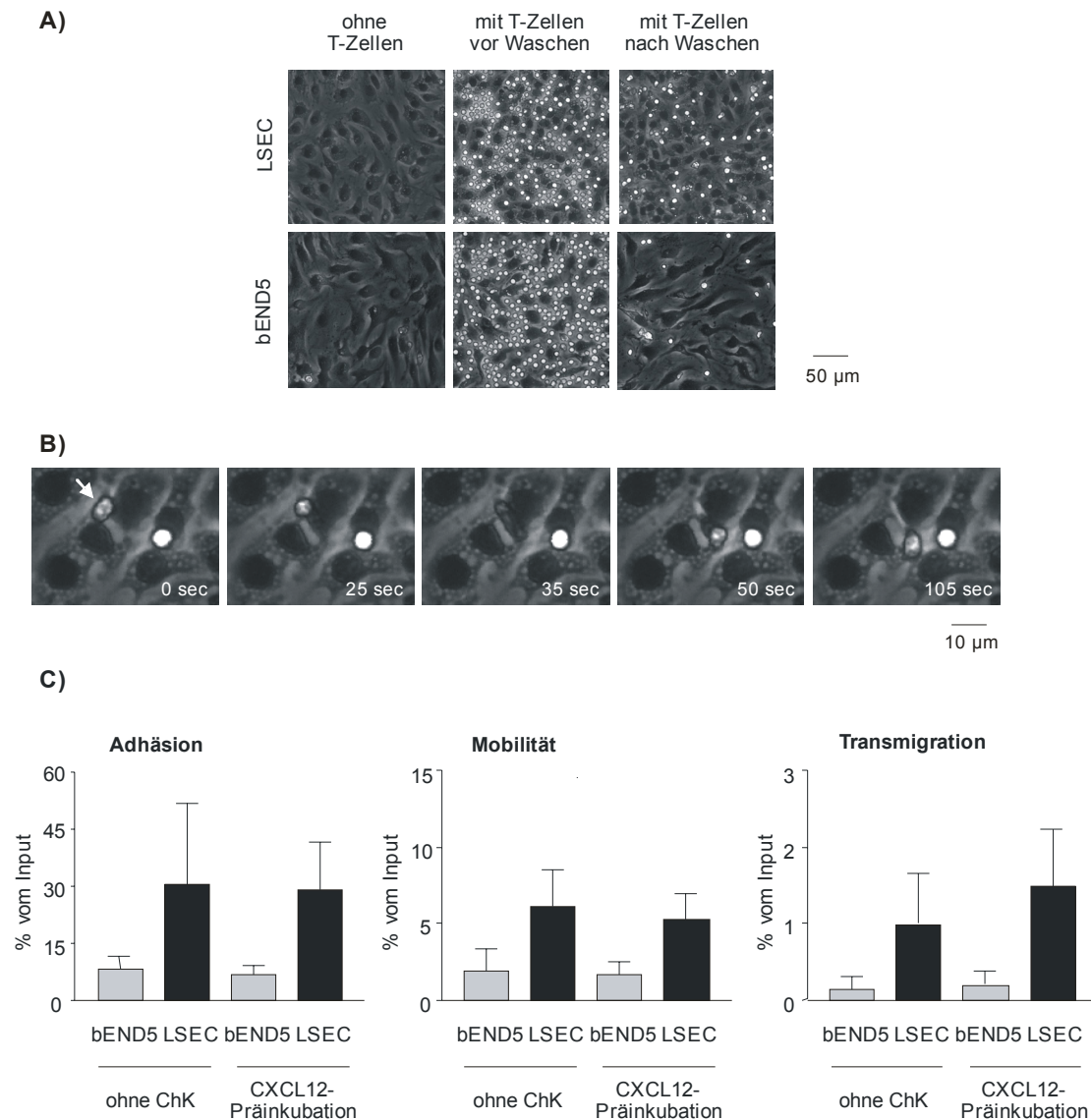


Abb. 8: Adhäsion und Migration von CD4⁺ T-Zellen auf LSEC bzw. bEND5. LSEC und bEND5 wurden auf FN-beschichteten µ-slides VI über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Milz isoliert, auf die Endothel-Monolayer, die zuvor mit oder ohne CXCL12 inkubiert worden waren, gegeben und im Phasenkontrast beobachtet. Zur Berechnung der Adhäsion der T-Zellen an die Endothelien wurden die T-Zellen auf den LSEC bzw. bEND5 vor und nach Waschen gezählt. Dann wurden die T-Zellen 10 min lang auf den Endothelien gefilmt und ihre Bewegungen anschließend im Zeitraffer analysiert: T-Zellen, die nach der Adhäsion ans Endothel abflachten und auf der Oberseite des Endothels um mehr als einen ½ Zeldurchmesser wanderten, galten als „mobil“. Wanderten die Zellen unter das Endothel bzw. zurück an die Oberseite, wurden sie als „transmigrierend“ definiert. Neben repräsentativen Aufnahmen zur Bestimmung der Adhäsion (A) ist beispielhaft die Transmigration einer CD4⁺ T-Zelle durch einen LSEC-Monolayer dargestellt (weißer Pfeil) (B). Die Diagramme zur Adhäsion, Mobilität und Transmigration (C) zeigen MW und SD von drei unabhängigen Experimenten.

Damit konnte am Phasenkontrastmikroskop bestätigt werden, dass die CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit der LSEC erhöhte Transmigration zeigen. Die niedrigeren Prozentzahlen der Transmigrationsraten könnten hierbei auf die kürzere Versuchszeit zurückzuführen sein: Am Mikroskop wurden die Zellen für 10 min beobachtet, im Transwell[®]-System akkumulierten die transmigrierten Zellen in der unteren Kammer und die Transmigrationsraten wurden nach 90 min Migrationszeit berechnet.

4.2.2 Effekt der LSEC auf die Transmigration verschiedener CD4⁺-Populationen

In vivo ist für die Leber eine präferentielle Akkumulation von Memory CD4⁺ T-Zellen, nicht jedoch von naiven CD4⁺ T-Zellen beschrieben [61]. Auch konnte mittels Intravitalmikroskopie gezeigt werden, dass Th1-polarisierte Zellen besser als Th2-polarisierte Zellen am sinusoidalen Endothel adhäreren [113]. Bisher konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass LSEC die Transmigrationsraten von CD4⁺ T-Zellen erhöhen. Nun sollte untersucht werden, ob die LSEC als Filter für bestimmte CD4⁺ T-Zell-Subsets fungieren, somit selektiv das Migrationsverhalten bestimmter Subsets beeinflussen.

Zuerst wurde die Transmigration von naiven und Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen untersucht, die über den Markers CD45RB (CD45RB^{hi} vs. CD45RB^{low}) detektiert wurden (Abb. 9A). Zu CXCL12 migrierten erwartungsgemäß beide Populationen, da auf beiden der Rezeptor CXCR4 zu finden ist: 32,5 ± 11,0 % der naiven und 24,7 ± 10,4 % der Effektor/Memory Zellen migrierten durch Endothel-freie Membranen. In Anwesenheit der LSEC konnte eine signifikante Steigerung der Chemotaxis von naiven bzw. Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen auf 59,5 ± 21,7 % bzw. 56,6 ± 15,0 % detektiert werden (Abb. 9B, C). Somit wurde die Transmigration beider CD4⁺ Populationen durch die LSEC gesteigert.

Neben CXCL12 wurde auch CXCL9, dessen Rezeptor CXCR3 nicht auf naiven, aber z. B. auf Th1-polarisierten T-Zellen exprimiert ist, im Chemotaxisassay verwendet. Erwartungsgemäß ließ sich im Endothel-freien System kein chemotaktischer Effekt auf die naiven CD4⁺ T-Zellen beobachten. Auch durch LSEC war keine erhöhte Migration detektierbar. Die Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen zeigten dagegen einen signifikant erhöhte Transmigration zu CXCL9 (16,3 ± 5,6 %). Diese Chemotaxis konnte in Anwesenheit der LSEC signifikant auf 26,3 ± 8,8 % gesteigert werden (Abb. 9c).

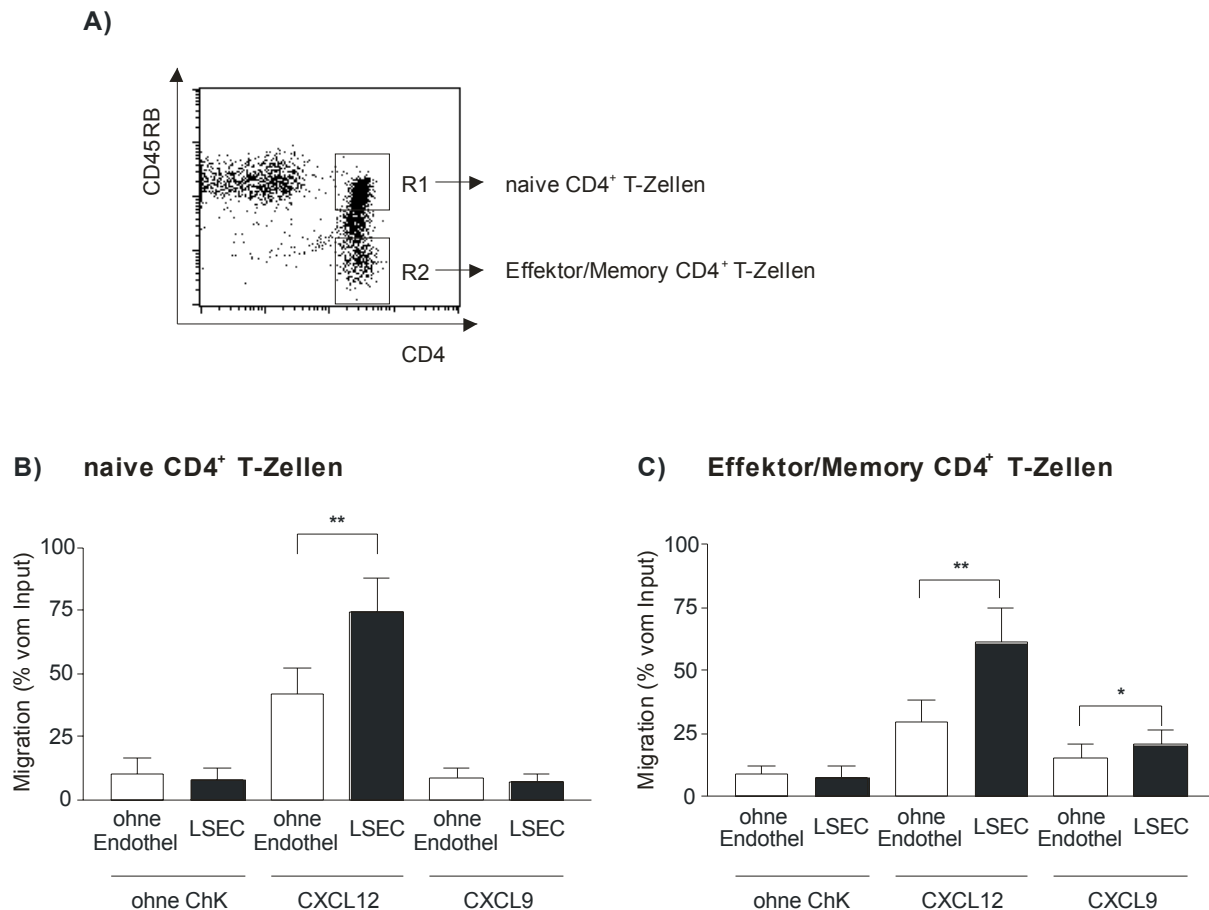
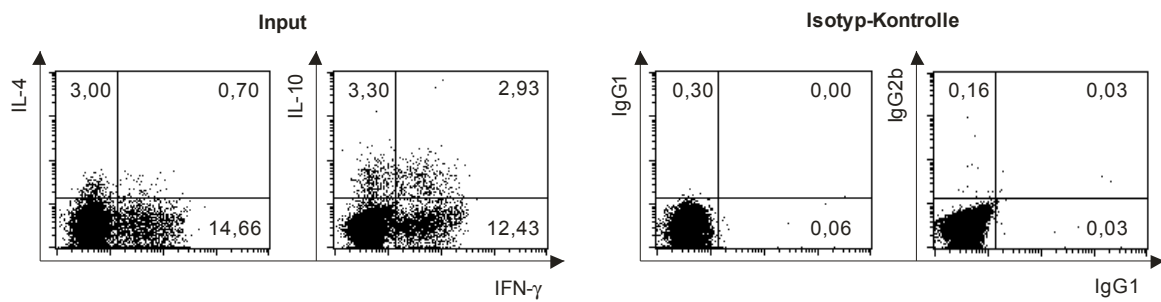
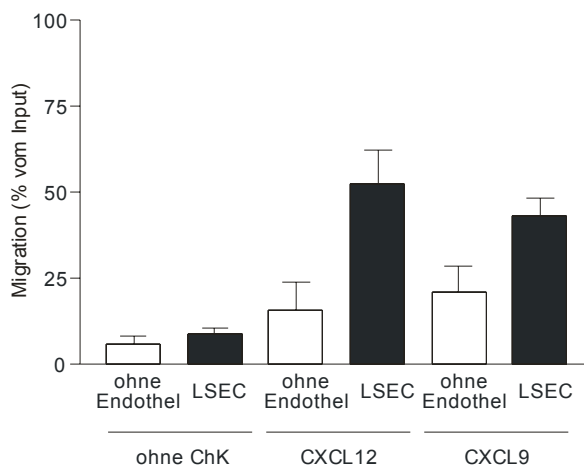
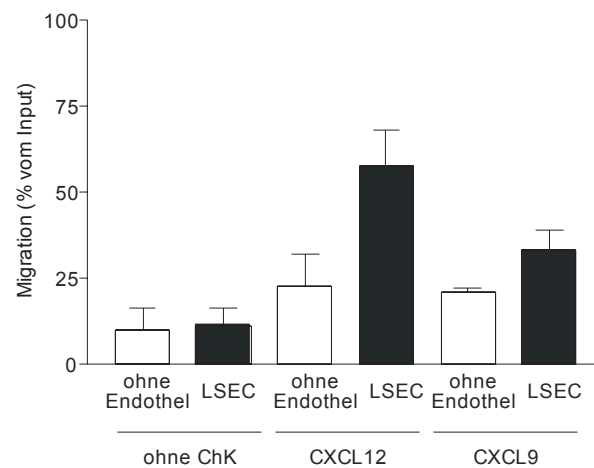
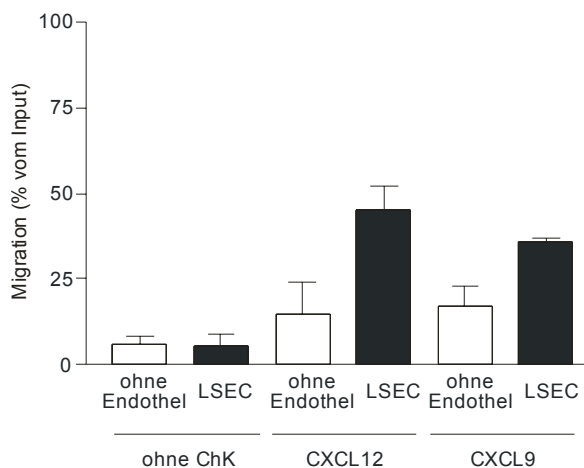


Abb. 9: Transmigration von naiven und Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen zu CXCL12 und CXCL9 in An- und Abwesenheit der LSEC. LSEC wurden auf FN-beschichteten Transwell®-Einsätzen kultiviert, als Kontrolle dienten nur FN-beschichtete Einsätze. Am nächsten Tag wurde die Transmigration von naiven und Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen zu CXCL12 und CXCL9 untersucht. Dazu wurden naive und Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen mit dem Marker CD45RB unterschieden (A) und die Transmigrationsraten wie in Abb. 7 beschrieben quantifiziert. Die Diagramme zeigen MW und SD von 8-18 unabhängigen Experimenten mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$.

Des Weiteren wurde die Transmigration einiger Zytokin-Produzenten (IFN- γ , IL-4 und IL-10-Produzenten) bestimmt. Es wurden ebenfalls *ex vivo* isolierte Milzzellen verwendet. Um eine ausreichende Anzahl an Zytokin-Produzenten zu erhalten, war durch Abreichern der CD62L^{high}-Fraktion der Anteil an Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen von 30 % auf 60 % erhöht worden. Die Migration wurde dann ohne weitere Vorbehandlung der Zellen durchgeführt. Anschließend wurde die Fähigkeit zur Zytokinsekretion durch PMA/IM-Stimulation und intrazelluläre Färbung der Zytokine detektiert (Abb. 10A). Alle drei Zytokin-Produzenten zeigten in Anwesenheit der LSEC gesteigerte Transmigrationsraten zu den Chemokinen CXCL12 und CXCL9 (Abb. 10B-D). Die „Nicht-Produzenten“ (IFN- γ ⁻ IL-4⁻ IL-10⁻ CD4⁺ T-Zellen) zeigten in Anwesenheit der LSEC ebenfalls eine erhöhte Chemotaxis zu CXCL12, aber nicht zu CXCL9 (Abb. 10E). Sie wanderten also erwartungsgemäß wie naive T-Zellen.

A)

B) IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-ZellenC) IL-4⁺ CD4⁺ T-ZellenD) IL-10⁺ CD4⁺ T-Zellen

E) "Nicht-Produzenten"

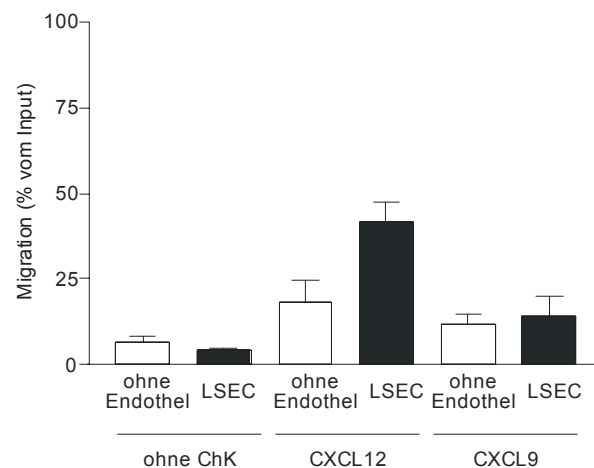


Abb. 10: Transmigration verschiedener Zytokin-Produzenten zu CXCL12 und CXCL9 in An- und Abwesenheit der LSEC. LSEC wurden auf FN-beschichteten Transwell®-Einsätzen kultiviert, als Kontrolle dienten nur FN-beschichtete Einsätze. Nach Isolation von CD62L^{low} angereicherten CD4⁺ T-Zellen aus der Milz wurden die Transmigrationsraten von IFN- γ , IL-4- und IL-10- produzierenden CD4⁺ T-Zellen zu CXCL12 und CXCL9 in An- und Abwesenheit der LSEC untersucht. Dazu wurden die migrierten T-Zellen nach PMA/IM-Stimulation neben CD4 intrazellulär für IFN- γ , IL-4 und IL-10 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (A). Zusätzlich wurden – wie in Abb. 7 beschrieben – Ansätze zur Quantifizierung mitgeführt. Über den Anteil der CD4⁺ T-Zellen ließ sich dann die Transmigration der Zytokin-Produzenten (B-D) sowie der „Nicht-Produzenten“ (E) berechnen. Die Diagramme zeigen MW und SD von 3-5 unabhängigen Experimenten.

Damit konnte für alle untersuchten CD4⁺ T-Zellpopulationen eine erhöhte Chemotaxis in Anwesenheit der LSEC festgestellt werden. Voraussetzung für die gesteigerte Transmigration

war dabei die Reaktivität der T-Zellen auf das verwendete Chemokin. Durch die LSEC wurde die Transmigration reaktiver T-Zellen gefördert, nicht die Transmigration bestimmter Subpopulationen.

4.2.3 Kein erhöhter chemotaktischer Effekt von CCL20, CCL21 und CXCL16 in Anwesenheit der LSEC

In der Leber werden neben CXCL9 und CXCL12 weitere Chemokine, wie CCL20, CCL21 und CXCL16 konstitutiv exprimiert [59]. Daher wurde nun der Einfluss der LSEC auf die Chemotaxis von CD4⁺ T-Zellen zu diesen drei Chemokinen untersucht.

Zu CCL21 migrierten über 70 % der naiven und mehr als 60 % der Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen. Dies war unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen der LSEC (Abb. 11A). Die Chemotaxis von CD4⁺ T-Zellen zu CCL20 und CXCL16 waren eher gering, aber wie zu CCL21 durch die Anwesenheit der LSEC im Vergleich zu Endothel-freien Membranen nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

A) CD4⁺ T-Zellen der Milz

B) CD4⁺ T-Zellen der Leber

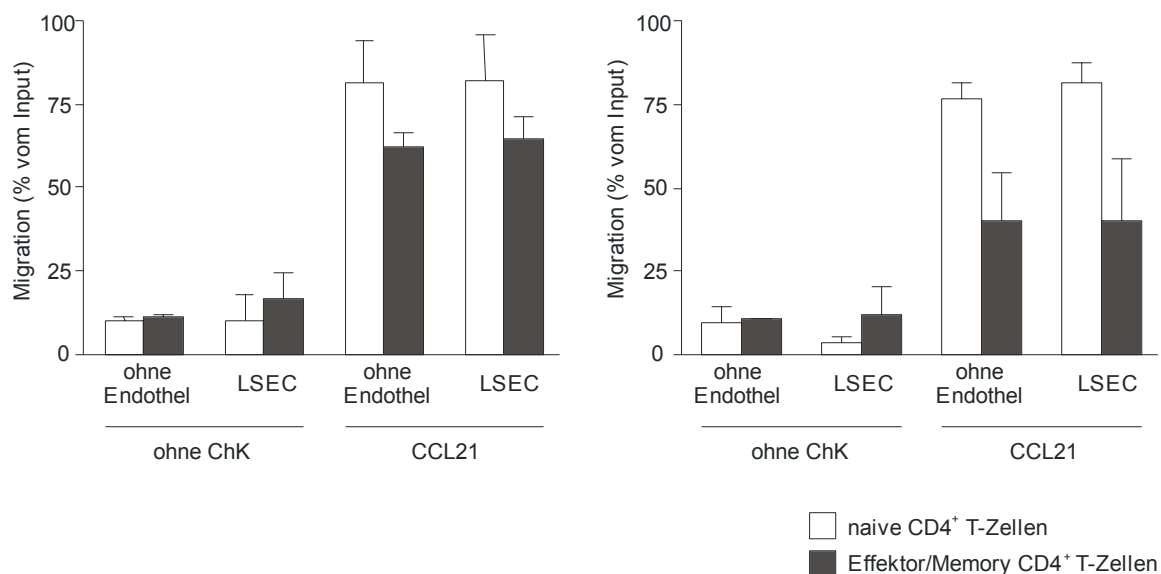


Abb. 11: Transmigration der CD4⁺ T-Zellen zu CCL21 in An- und Abwesenheit von LSEC. LSEC wurden auf FN-beschichteten Transwell[®]-Einsätzen kultiviert, als Kontrolle dienten nur FN-beschichtete Einsätze. Am nächsten Tag wurde die Transmigration von naiven und Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen aus Milz (A) und Leber (B) zu CCL21 untersucht und wie in Abb. 7 beschrieben quantifiziert. Die Einteilung in naive und Effektor/Memory Zellen erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben mit dem Marker CD45RB. Das Diagramm zeigt MW und SD eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten.

Durch die Anwesenheit der LSEC ließ sich somit die Chemotaxis von CD4⁺ T-Zellen zu CXCL9 und CXCL12 signifikant steigern, nicht jedoch zu den Chemokinen CCL20, CCL21 und CXCL16.

Neben der Transmigration von CD4⁺ Milzzellen wurde auch das Migrationsverhalten von intrahepatischen CD4⁺ T-Zellen untersucht: Diese zeigten ebenfalls durch die Anwesenheit der LSEC keine erhöhte Chemotaxis zu CCL20, CCL21 und CXCL16. Allerdings war der chemotaktische Effekt von CCL21 auf Leber-residente Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen geringer als auf die der Milz (Abb. 11B).

4.2.4 Mechanismus der gesteigerten Transmigration in Anwesenheit der LSEC

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch die Anwesenheit der LSEC beeinflusst wird: Zum einen wirken die LSEC bei der spontanen Transmigration im Gegensatz zu anderen Endothelien nicht als Barrieren, zum anderen wird der chemotaktische Effekt bestimmter Chemokinen durch die Anwesenheit der LSEC gesteigert. Nun sollte geklärt werden, welcher Mechanismus für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Dazu wurden eine direkte Aktivierung des Endothels durch die Chemokine, der Einfluss endothelialer Adhäsionsmoleküle und die Fähigkeit der LSEC zur Chemokin-Präsentation untersucht.

4.2.4.1 Endotheliale Aktivierung durch CXCL9 und CXCL12

Da Endothelzellen ebenso wie Leukozyten Chemokinrezeptoren exprimieren können [114], wurde zunächst untersucht, ob eine direkte Aktivierung der LSEC nach Chemokin/Rezeptor-Interaktion erfolgt. Dazu standen CXCR3^{-/-}-Mäusen zur Verfügung, aus denen die LSEC isoliert wurden. So konnte dann die Transmigration von CD45RB^{low} Effektor/Memory CD4⁺ T-Zellen zu CXCL9 in Anwesenheit der Knockout- und wt-LSEC miteinander verglichen werden (Abb. 12A). Die Migration der T-Zellen durch CXCR3^{-/-}-LSEC war mit $31,3 \pm 3,6$ % im Vergleich zur Migration durch wt-LSEC unverändert ($26,3 \pm 8,8$ %). Die LSEC schienen somit nicht direkt durch das Chemokin beeinflusst zu werden. Dagegen konnte erwartungsgemäß bei den T-Zellen aus CXCR3^{-/-}-Mäusen keine Chemotaxis zu CXCL9 beobachtet werden (Abb. 12B).

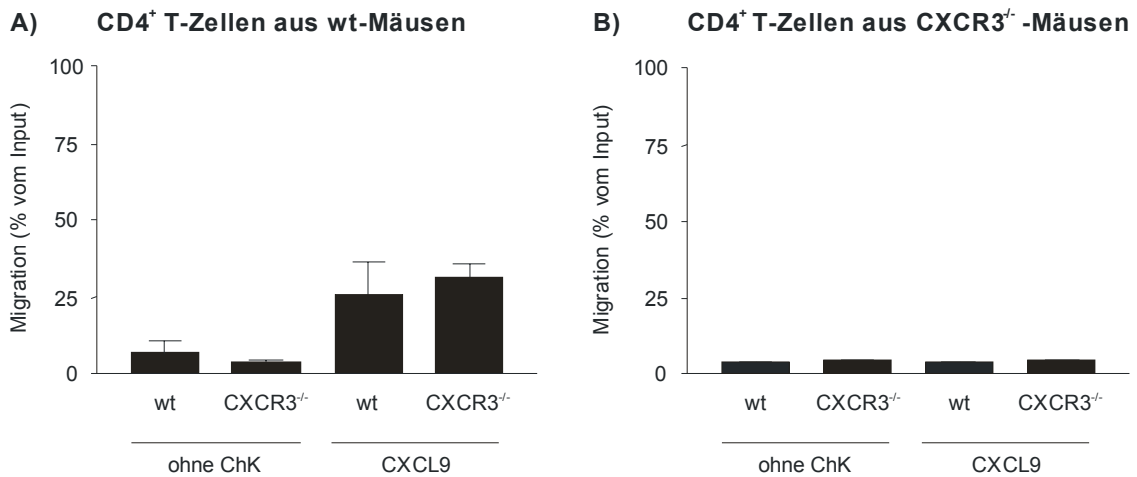


Abb. 12: Unveränderte Transmigration von CD45RB^{low} CD4⁺ T-Zellen zu CXCL9 durch CXCR3^{-/-}-LSEC im Vergleich zur Migration durch wt-LSEC. LSEC wurden aus wt- bzw. CXCR3^{-/-}-Mäusen isoliert und auf FN-beschichteten Transwell[®]-Einsätzen kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Transmigration von CD45RB^{low} CD4⁺ T-Zellen aus wt-Milzen zu CXCL9 untersucht und wie in Abb. 7 beschrieben quantifiziert (A). Zusätzlich wurde die transendotheliale Migration von CD45RB^{low} CD4⁺ T-Zellen aus CXCR3^{-/-}-Milzen zu CXCL9 analysiert (B). Die Diagramme zeigen MW und SD von 3-9 unabhängigen Experimenten.

Da keine CXCR4^{-/-}-Maus zur Verfügung stand, wurde die mögliche endotheliale Aktivierung durch CXCL12 mittels Blockade der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion untersucht (Abb. 13A). Dazu wurden die LSEC mit Pertussis Toxin (PTX) vorbehandelt, welches die Signaltransduktion der an die Chemokinrezeptoren gekoppelten G_i-Proteine blockiert: PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung eines spezifischen Cysteinrests in der α-Untereinheit von G_i. Diese kovalente Modifikation blockiert die Spaltung in α- und βγ-Untereinheit und hält G_i in der inaktiven GDP-Form fest [115].

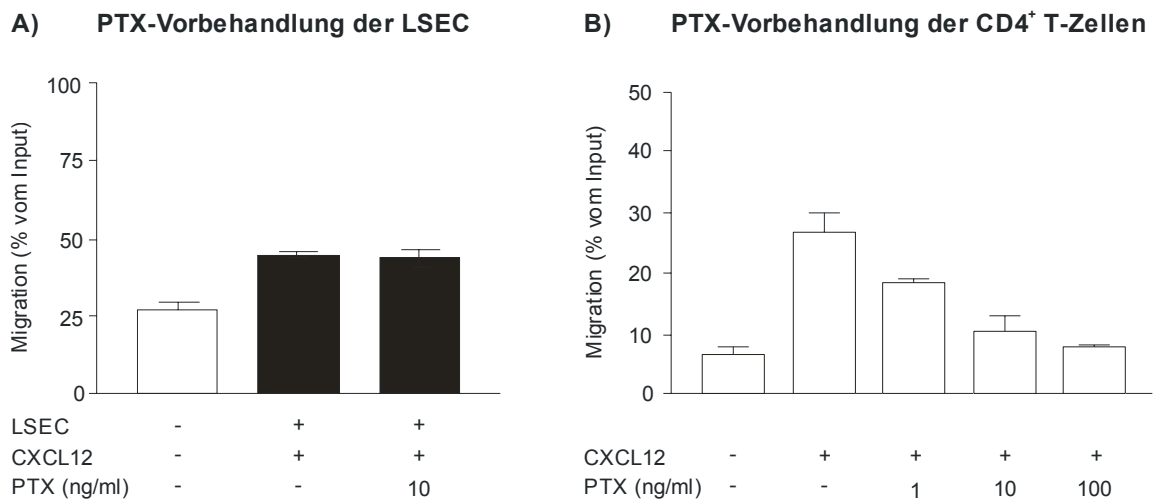


Abb. 13: Unveränderte Transmigration der CD4⁺ T-Zellen zu CXCL12 nach Vorbehandlung der LSEC mit PTX. LSEC wurden auf FN-beschichteten Transwell[®]-Einsätzen kultiviert und am nächsten Tag 2 h mit oder ohne PTX bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit der LSEC untersucht und wie in Abb. 7 beschrieben quantifiziert (A). Die Aktivität des PTX wurde im Endothel-freien Transmigrationsassay durch Vorbehandlung der transmigrierenden CD4⁺ T-Zellen mit steigenden PTX-Konzentrationen überprüft (B). Die Diagramme zeigen MW und SD eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Präinkubation der Endothelzellen mit PTX zeigte wiederum keinen Effekt auf die Transmigration der CD4⁺ T-Zellen, wohingegen die Vorbehandlung der T-Zellen mit PTX erwartungsgemäß zu einer Dosis-abhängigen Blockade der Transmigration führte (Abb. 13B).

4.2.4.2 Konstitutive ICAM-1-Expression auf LSEC

Neben den Chemokinen nehmen die endothelialen Adhäsionsmoleküle Einfluß auf die Transmigration von Leukozyten. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 scheint dabei nicht nur für die Adhäsion, sondern auch für den Durchtritt der Lymphozyten durch das Endothel eine Rolle zu spielen [116] und wird auf LSEC konstitutiv auf hohem Level exprimiert. Daher wurde der Einfluss von ICAM-1 auf die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von LSEC aus ICAM-1^{-/-}-Mäusen untersucht (Abb. 14).

Die Transmigration zu CXCL12 durch ICAM-1^{-/-}-LSEC war mit $34,1 \pm 10,2$ % im Vergleich zur Transmigration durch wt-LSEC ($49,6 \pm 16,8$ %) geringfügig, jedoch nicht signifikant reduziert ($p = 0,11$). Vergleichbares galt auch für die spontane Transmigration der T-Zellen.

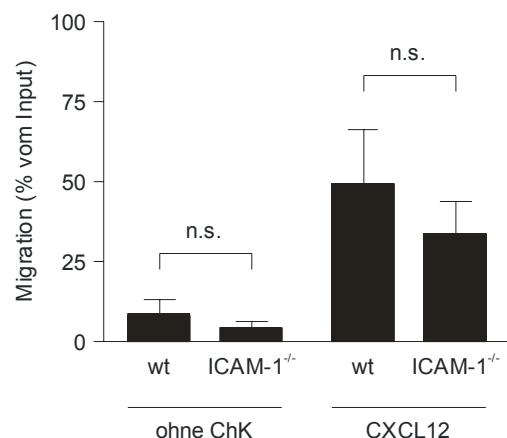


Abb. 14: Kein drastischer Einfluß der ICAM-1-Expression auf LSEC auf die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen. LSEC wurden aus wt- oder aus ICAM-1^{-/-}-Mäusen isoliert und auf FN-beschichteten Transwell®-Einsätzen kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen aus der Milz durch LSEC aus wt- und aus ICAM-1^{-/-}-Mäusen untersucht und wie in Abb. 7 beschrieben quantifiziert. Das Diagramm zeigt MW und SD von mindest. 4 unabhängigen Experimenten mit n.s. = nicht signifikant.

4.2.4.3 Chemokin-Präsentation auf der Oberfläche der LSEC

Endothelzellen können Chemokine aus der Umgebung aufnehmen und über Glykosaminoglykane (GAGs) präsentieren [23]. Diese auf Endothelzellen präsentierten Chemokine können im Vergleich zu löslichen Chemokinen zu einer effektiveren Aktivierung, verstärkten Adhäsion und erhöhten Transmigration der Lymphozyten führen [19].

Zur Untersuchung der Chemokin-Präsentation durch GAGs wurde die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von LSEC gemessen, die mit dem GAG-schneidenden Enzym Heparinase I vorbehandelt worden waren (Abb. 15). Die Transmigration der T-Zellen durch

Heparinase I behandelte LSEC entsprach der durch unbehandelte LSEC. Die Vorbehandlung zeigte damit keinen Effekt auf die Transmigration der CD4⁺ T-Zellen.

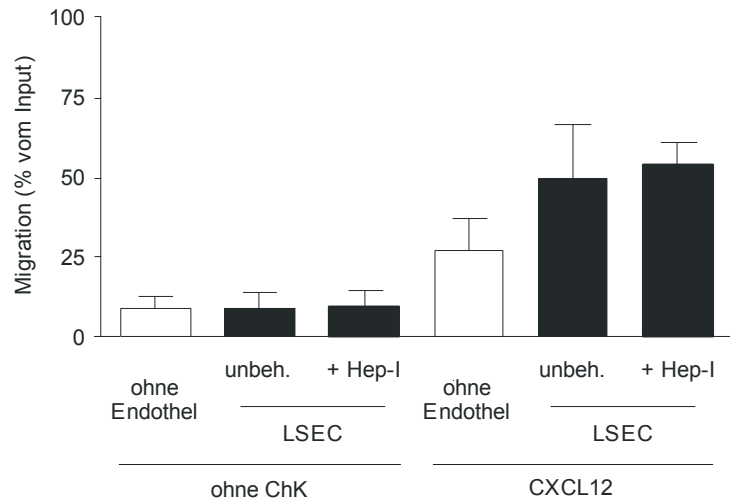


Abb. 15: Unveränderte Transmigration der CD4⁺ T-Zellen nach Vorbehandlung der LSEC mit Heparinase I. Die LSEC wurden auf FN-beschichteten Transwell[®]-Einsätzen kultiviert und am nächsten Tag mit oder ohne Heparinase I (Hep-I) für 2 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen im Endothel-freien System und durch Hep-I-behandelte bzw. durch unbehandelte LSEC untersucht und wie in Abb. 7 beschrieben quantifiziert. Das Diagramm zeigt MW und SD von drei unabhängigen Experimenten.

Die Chemokin-Präsentation auf der Oberfläche der LSEC wurde dann durch Vorinkubation der Endothelzellen mit dem Chemokin weiter untersucht. Dazu wurden die LSEC von oben (= luminal) oder von unten (= abluminal) mit CXCL12 vorinkubiert. Während der Transmigrationsphase der T-Zellen wurde dann kein Chemokin verwendet. Abb. 16 zeigt, dass die Vorinkubation der LSEC mit dem Chemokin von oben im Vergleich zur spontanen Transmigration nicht zu einer signifikant erhöhten Transmigration der T-Zellen führte ($9,0 \pm 3,1\%$ bzw. $12,0 \pm 11,5\%$). Dies konnte auch in den Zeitrafferaufnahmen am Mikroskop beobachtet werden (Abb. 8C). Dagegen führte die Vorinkubation des Endothels mit dem Chemokin von unten zu einer signifikanten Steigerung der Transmigrationsrate auf $50,2 \pm 16,5\%$. Die LSEC waren somit in der Lage, das Chemokin auf ihrer Oberfläche zu binden und zu präsentieren, allerdings war ein Effekt auf die Transmigration der T-Zellen abhängig vom Ursprungsort des Chemokins.

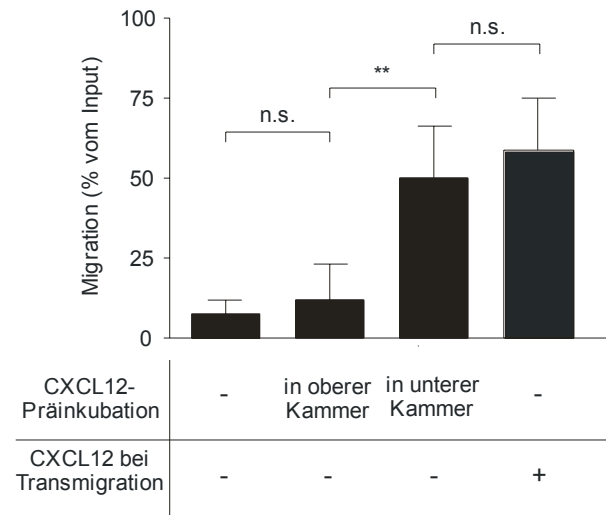


Abb. 16: Gesteigerte Transmigration der CD4⁺ T-Zellen nach Vorinkubation der LSEC mit CXCL12. Die LSEC wurden auf FN-beschichteten Transwell[®]-Einsätzen kultiviert und am nächsten Tag entweder von oben oder von unten für 2 h mit 50 nM CXCL12 inkubiert. Die spontane Transmigration von CD4⁺ T-Zellen wurde in Anwesenheit dieser vorbehandelten LSEC mit der durch unbehandelte LSEC ohne Chemokin bzw. mit der Chemotaxis zu CXCL12 verglichen und wie in Abb. 7 beschrieben quantifiziert. Das Diagramm zeigt MW und SD von 4-5 Experimenten mit n.s. = nicht signifikant und ** = $p < 0,01$.

4.3 Antigen-abhängige Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC

Im Unterschied zu anderen mikrovaskulären Endothelien besitzen die LSEC Charakteristika Antigen-präsentierender Zellen: Neben der Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme exprimieren sie konstitutiv MHC-II- und kostimulatorische Moleküle [94-96]. Allerdings ist umstritten, ob es eine Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-abhängige Antigen-Präsentation gibt. Einerseits ist die Induktion von Zytokinproduktion nachgewiesen [99], andererseits wird eine unzureichende T-Zell-Proliferation beschrieben [101].

Neben dem Einfluss der LSEC auf das Migrationsverhalten von CD4⁺ T-Zellen wurde daher im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Rolle der LSEC bei MHC-II restringierter Antigen-Präsentation näher untersucht.

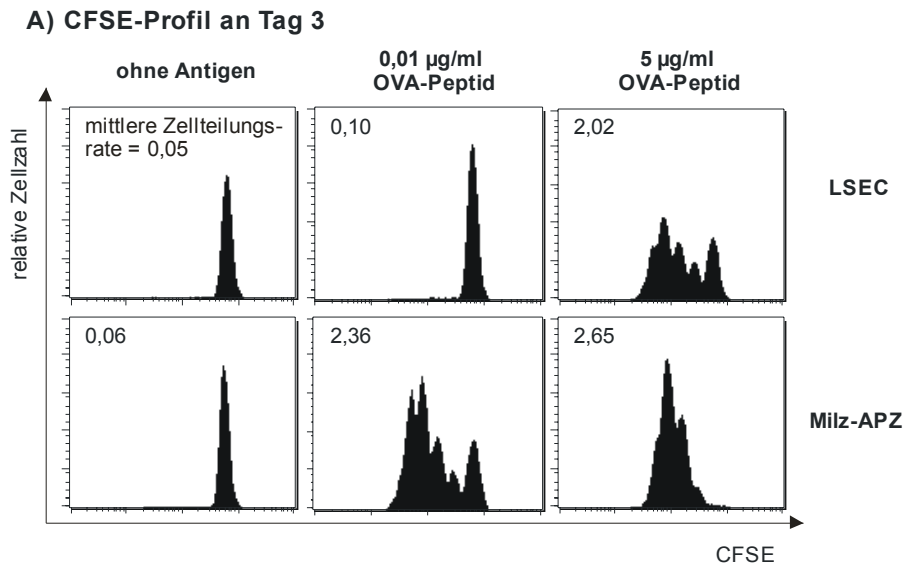
Ex vivo isolierte naive CD4⁺ T-Zellen wurden Antigen-spezifisch mit LSEC kokultiviert und anschließend analysiert. Hierfür wurden die CD4⁺ T-Zellen besonders sorgfältig aufgereinigt (z. T. mit vorgeschalteter Entfernung der APZ durch Depletion der MHC-II⁺, B220⁺, CD11b⁺ und CD11c⁺ Zellen) und ihre Reinheit im Proliferationsexperiment überprüft (CD4⁺ T-Zellen mit Antigen ohne APZ).

4.3.1 Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC bei hohen Antigen-Dosen

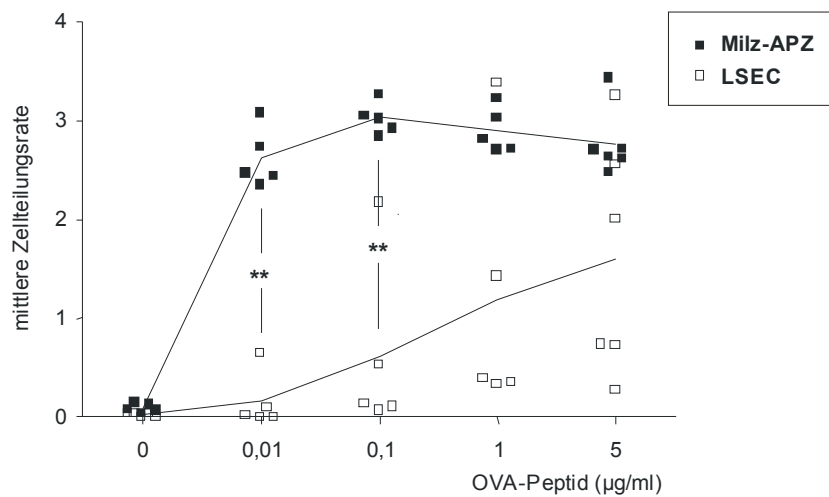
Zuerst wurden LSEC aus wt-Mäusen isoliert und mit naiven OVA-TZR transgenen CD4⁺ T-Zellen Antigen-spezifisch kultiviert. Als Kontroll-APZ wurden professionelle Milz-APZ aus wt-Mäusen verwendet. Die Proliferation der naiven CD4⁺ T-Zellen nach Kokultur mit den LSEC oder Milz-APZ wurde an Tag 3 und Tag 6 bei verschiedenen Antigen-Konzentrationen analysiert (Abb. 17).

An Tag drei war nach Kokultur mit den LSEC bei niedrigen Antigen-Dosen (0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml OVA-Peptid) kaum Proliferation der CD4⁺ T-Zellen detektierbar, erst bei hohen Antigen-Dosen (1 µg/ml und 5 µg/ml) zeigte sich Proliferation. Im Gegensatz dazu proliferierten die T-Zellen, die mit Milz-APZ kultiviert worden waren, schon bei niedrigen OVA-Konzentrationen; die mittlere Zellteilungsrate war signifikant erhöht. An Tag 6 war die Proliferation der T-Zellen nach Kokultur mit LSEC bei niedrigen Antigen-Dosen weiterhin signifikant niedriger als nach Kokultur mit Milz-APZ; bei hoher Antigen-Gabe war kein deutlicher Unterschied in der mittleren Zellteilungsrate mehr zu sehen.

Die LSEC waren somit nur bei hohen Antigen-Konzentrationen in der Lage, die Proliferation naiver CD4⁺ T-Zellen zu induzieren.



B) mittlere Zellteilungsrate an Tag 3



C) mittlere Zellteilungsrate an Tag 6

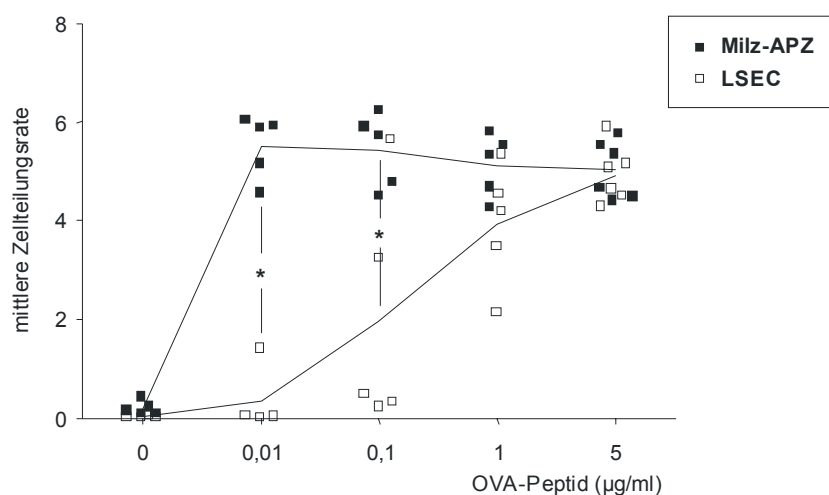


Abb. 17: Mittlere Zellteilungsrate der CD4⁺ T-Zellen an Tag 3 und 6 der Kokultur mit LSEC oder Milz-APZ und verschiedenen Antigen-Dosen. CFSE-markierte OVA-spezifische naive CD4⁺ T-Zellen aus DO11.10-Mäusen wurden mit verschiedenen OVA-Peptid-Konzentrationen in Anwesenheit von LSEC oder CD90⁻ Milz-APZ aus wt-Mäusen kultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde über das CFSE-Profil am Durchflusszytometer detektiert (A) und die mittleren Zellteilungsraten nach Kokultur mit LSEC oder Milz-APZ an Tag 3 (B) und Tag 6 (C) miteinander verglichen. Die Diagramme zeigen die Werte von 5-6 unabhängigen Experimenten mit ** = $p < 0,01$.

4.3.2 Myeloide APZ in der LSEC-Fraktion

4.3.2.1 Anteil myeloider APZ in der LSEC-Fraktion

Für die *in vitro* Untersuchungen zur Antigen-spezifischen Interaktion zwischen LSEC und T-Zellen ist die Reinheit der *ex vivo* isolierten Zellpopulationen von großer Bedeutung, da schon geringe Mengen professioneller APZ ausreichen, um die Proliferation von naiven T-Zellen zu induzieren. Daher wurde in der LSEC-Fraktion nicht nur der prozentuale Anteil der Endothelzellen überprüft, sondern auch der Anteil an nicht-endothelialen MHC-II⁺ Zellen. Die Reinheit der LSEC-Fraktion nach *ex vivo* Isolation und über-Nacht-Kultur wurde mit Fluoreszenz-konjugiertem AcLDL im Durchflusszytometer überprüft und lag jeweils bei über 95 %. Eine Analyse der nicht-endothelialen Zellen (AcLDL⁻) aus der LSEC-Isolation ergab, dass $0,48 \pm 0,44$ % (bezogen auf die Gesamtzellen) MHC-II⁺ waren. Zusätzlich wurden der Anteil verschiedener Marker für professionelle APZ bestimmt: $0,72 \pm 0,15$ % der Gesamtzellen waren CD11b⁺, $0,13 \pm 0,12$ % CD11c⁺ und $0,24 \pm 0,24$ % CD45R/B220⁺. Aufgrund der hohen Effizienz, naive CD4⁺ T-Zellen Antigen-spezifisch zu aktivieren, konnte eine Induktion der Proliferation von T-Zellen durch diese geringen Mengen kontaminierender professioneller APZ nicht ausgeschlossen werden.

4.3.2.2 Knochenmarkschimären als LSEC-Quelle ohne myeloide MHC-II-Expression

Um die Antigen-Präsentation über myeloide APZ auszuschließen, wurden Knochenmarkschimären (KMCh) aus C57Bl/6- und MHC-II^{-/-}-Mäusen generiert. Nach Bestrahlung wurden C57Bl/6-Mäuse mit MHC-II^{-/-}-Knochenmark rekonstituiert. Das führte zu fehlender MHC-II-Expression auf myeloiden Zellen, z. B. auf den professionellen APZ. In diesen chimären Mäusen war die MHC-II-Expression somit auf nicht-myeloide Zellen, z. B. Endothelzellen, beschränkt.

Um das Ausmaß der Depletion endogener Zellen sowie der Rekonstitution mit MHC-II^{-/-}-Zellen zu überprüfen, wurde den KMCh 6 Wochen nach Bestrahlung und Injektion des MHC-II^{-/-}-Knochenmarks Blut entnommen und dieses für MHC-II und CD4 gefärbt (Abb. 18A). Außerdem wurde der Anteil an MHC-II⁺-Zellen in Milz und Leber überprüft (Abb. 18B). Zellen aus C57Bl/6- oder MHC-II^{-/-}-Mäusen dienten dabei als Kontrollen.

Im Vergleich zu den wt-Mäusen wurde bei den KMCh der Anteil MHC-II⁺ Zellen im Blut von fast 60 % auf $0,11 \pm 0,11$ % gesenkt, in der Milz von 65 % auf $0,18 \pm 0,25$ %. In der Leber konnte der Anteil nicht-endothelialer MHC-II⁺-Zellen durch die Bestrahlung von ca. 35 % auf knapp 1 % reduziert werden. Dies bedeutete eine 99%ige Depletion der endogenen myeloiden in Blut und Milz und eine 95%ige Depletion in der Leber.

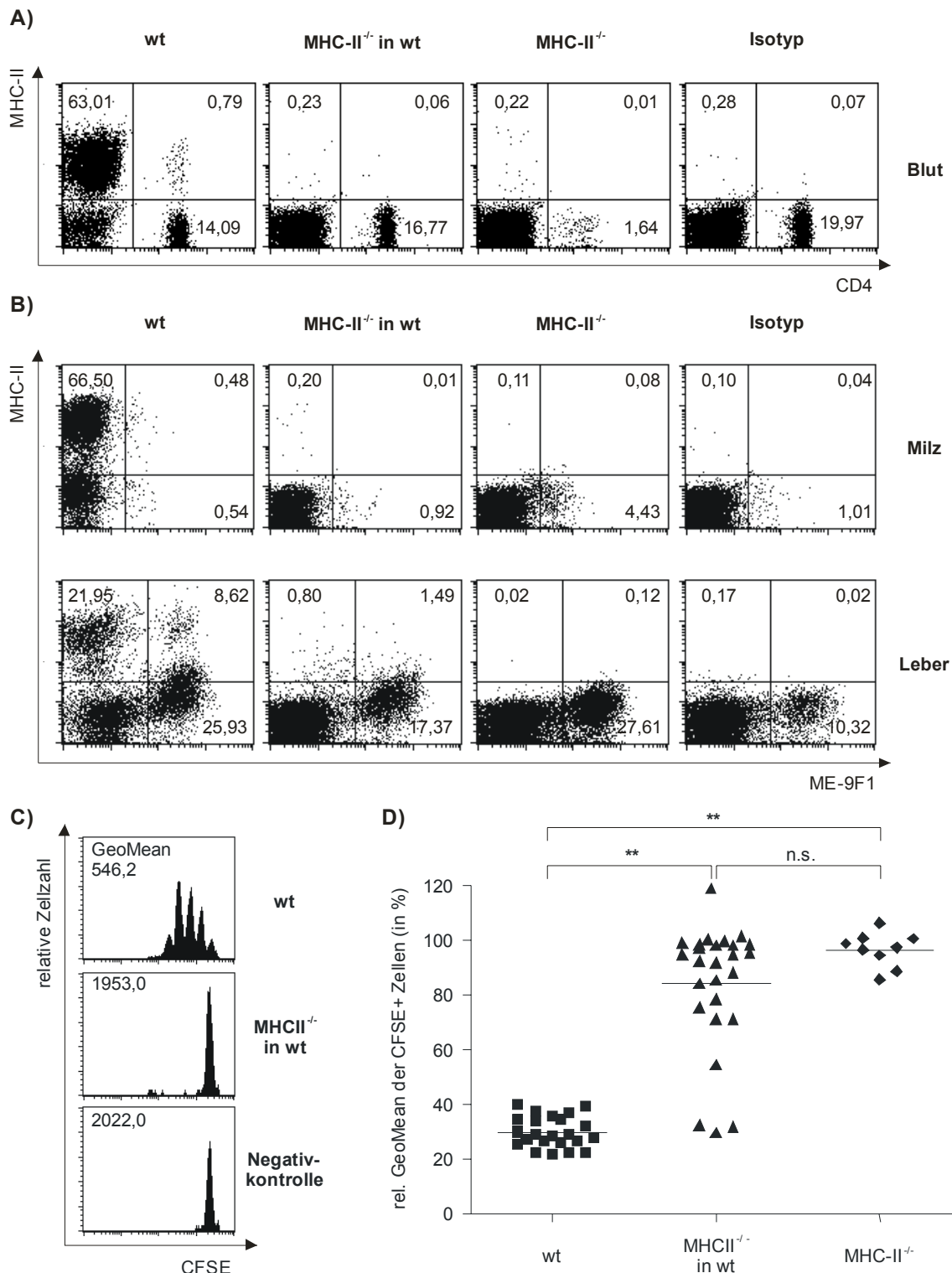


Abb. 18: Depletion endogener professioneller APZ und Rekonstitution mit MHC-II^{-/-}-Knochenmark. 6 Wochen nach Bestrahlung und Rekonstitution mit MHC-II^{-/-}-Knochenmark wurde den C57Bl/6-Rezipienten Blut entnommen und die Menge an MHC-II⁺ und CD4⁺ Zellen analysiert (A). 2-3 Wochen später wurden bei Milz- und Leberzellen Endothelzellen über den Antikörper ME-9F1 sowie MHC-II⁺ Zellen detektiert (B). Zellen von C57Bl/6- bzw. MHC-II^{-/-}-Mäusen dienten als Positiv- bzw. Negativkontrollen. Zur Überprüfung der funktionellen MHC-II-Expression wurden CD90⁻ Milzzellen der KMCh zur Antigen-spezifischen *in vitro* Stimulation CFSE-markierter OVA-spezifischer naiver CD4⁺ T-Zellen eingesetzt. An Tag 3 nach Kokultur mit wt-, KMCh- oder MHC-II^{-/-}-Milzzellen wurde die Proliferation über den GeoMean der CFSE-Fluoreszenzintensität detektiert (C). Mit dem GeoMean der Negativkontrolle (Kokultur ohne Antigen-Zugabe) = 100 % wurde anschließend der relative GeoMean nach Kokultur mit den verschiedenen Milzzellen berechnet und die Proliferation auf KMCh-Milzzellen mit der auf wt- und MHCII^{-/-}-Zellen verglichen (D). Es gilt n.s. = nicht signifikant und ** = p < 0,01.

Die Analyse am Durchflußzytometer zeigte ferner, dass die LSEC der KMCh (ME-9F1⁺) erwartungsgemäß nicht durch MHC-II⁺ LSEC ersetzt wurden, sondern schwach MHC-II⁺ blieben (Abb. 18B).

In der Milz reagiert der Endothel-spezifische Antikörper ME-9F1 mit einer kleinen Zellpopulation (ca. 1 %), bei der es sich wahrscheinlich um NK-Zellen handelt (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war der Anteil dieser ME-9F1⁺-Zellen in der Milz der MHC-II^{-/-}-Mäuse auf 4 % erhöht. Da die MHC-II^{-/-}-Maus kaum CD4⁺ T-Zellen enthält, könnte der erhöhte prozentuale Anteil der NK-Zellen auf den geringen prozentualen Anteil an CD4⁺ T-Zellen in der Milz (2 % statt 15-20 %) zurückzuführen sein.

Die Depletion endogener MHC-II⁺ professioneller APZ wurde außerdem *in vitro* funktionell überprüft: die Fähigkeit der Antigen-Präsentation wurde durch Antigen-spezifische Kultur CFSE-markierter naiver CD4⁺ T-Zellen mit CD90-depletierten Milzzellen der einzelnen KMCh getestet. An Tag 3 wurden die T-Zellen analysiert und der GeoMean der CFSE-Fluoreszenzintensität bestimmt (Abb. 18C, D). Nach Kokultur mit Milzzellen aus MHC-II^{-/-}-Mäusen wurde erwartungsgemäß keine Proliferation festgestellt. Der relative GeoMean lag bei $96,71 \pm 6,38$ % (mit GeoMean der Negativkontrolle, also Kokultur ohne Antigen = 100 %). Nach Kokultur mit wt-Milzzellen war der GeoMean der CFSE⁺ T-Zellen auf $29,71 \pm 5,64$ % reduziert, da die Zellen proliferiert waren. Nach Kokultur mit KMCh-Milzzellen war in 5 von 6 unabhängigen Experimenten (mit n = 21) keine bzw. nur minimale Proliferation meßbar. Trotz deutlicher T-Zell-Proliferation in einem Experiment (mit n = 5) war mit einem GeoMean von $84,00 \pm 23,23$ % kein signifikanter Unterschied zur Kokultur mit MHC-II^{-/-}-Milzzellen vorhanden. Der GeoMean nach Kokultur mit wt-Milzzellen war dagegen signifikant vermindert. Somit zeigte auch der funktionelle Test die effiziente Depletion der endogenen professionellen APZ.

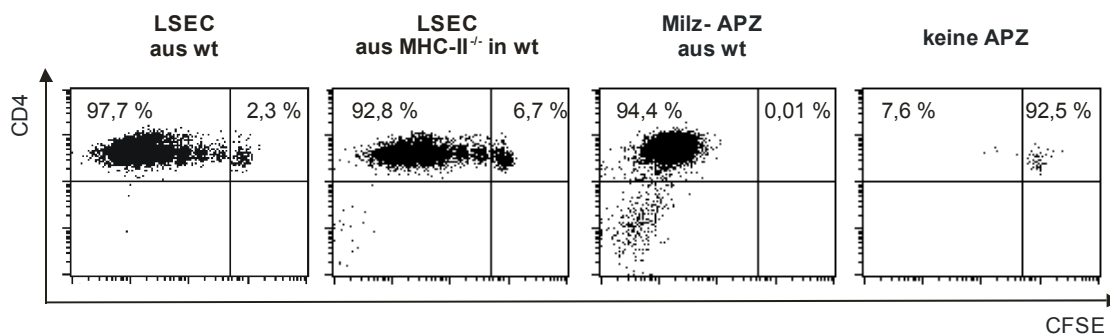
Der Anteil endogener MHC-II⁺-Zellen in der LSEC-Fraktion, der schon in den Fraktionen aus wt-Mäusen nur 1 % betrug, wurde durch Verwendung der Knochenmarkschimären um 95 % reduziert. Damit war die Menge myeloider APZ in der LSEC-Fraktion so gering, dass ein Einfluss auf die Proliferation von naiven T-Zellen ausgeschlossen werden konnte.

4.3.3 Proliferation naiver CD4⁺ T-Zellen nach Antigen-Präsentation durch LSEC

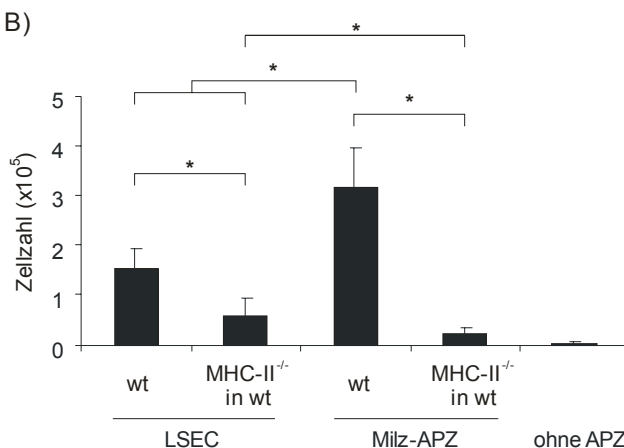
Für die Antigen-spezifische Kokultur mit naiven OVA-TZR transgenen CD4⁺ T-Zellen und 5 µg/ml OVA-Peptid wurden die LSEC aus wt-Mäusen und aus den KMCh isoliert. An Tag 6 wurden das Maß der Proliferation über CFSE-Profil und Zellzahl (Abb. 19), sowie die Zytokin-Produktion analysiert (Abb. 20).

Wie nach Kokultur mit den wt-LSEC proliferierten die naiven $CD4^+$ T-Zellen auch in Anwesenheit der LSEC aus den KMCh. Das CFSE-Profil der $CD4^+$ T-Zellen zeigte, dass nach Kokultur mit den KMCh-LSEC mehr T-Zellen in der ungeteilten Fraktion verblieben als nach Kokultur mit wt-LSEC (Abb. 19A). Auch die Zellzahl war mit $0,6 \cdot 10^5 \pm 0,3 \cdot 10^5$ niedriger als nach Kokultur mit wt-LSEC ($1,6 \cdot 10^5 \pm 0,4 \cdot 10^5$) (Abb. 19B). Die Proliferation war nach Kokultur mit den Kontroll-APZ der wt-Milz am stärksten, es verblieben keine Zellen in der G_0 -Fraktion und die Zellzahl war mit $3,2 \cdot 10^5 \pm 0,8 \cdot 10^5$ signifikant höher als nach Kokultur mit den beiden LSEC-Fraktionen.

A)



B)



C)

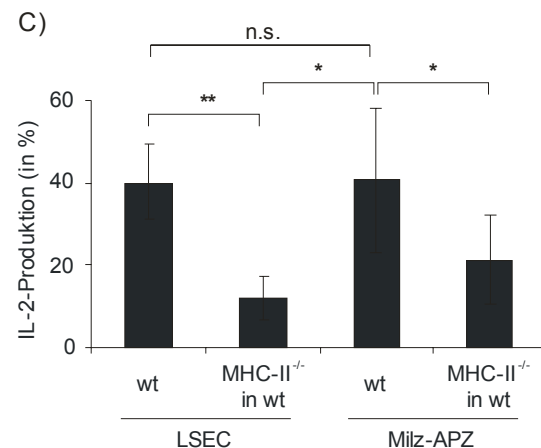


Abb. 19: Proliferation und IL-2-Produktion naiver $CD4^+$ T-Zellen nach Antigen-spezifischer Kokultur mit LSEC aus KMCh. CFSE-markierte OVA-TZR transgene naive $CD4^+$ T-Zellen wurden aus OT-II-Mäusen isoliert und mit $5 \mu\text{g/ml}$ OVA-Peptid und LSEC bzw. $CD90^+$ Milz-APZ aus C57Bl/6-Mäusen oder KMCh kultiviert. Nach 6 Tagen wurde das Maß der Proliferation über das CFSE-Profil (A) und über die Zellzahl (B) sowie die IL-2-Produktion (C) nach PMA/IM-Restimulation und intrazellulärer Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. Die Dot Plots zeigen repräsentative CFSE-Profile. Das Diagramm zur Zellzahl zeigt MW und SD von 6 Experimenten, das Diagramm zur IL-2-Produktion MW und SD von 5-7 Experimenten mit n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$.

Nach Kokultur mit den KMCh-Milzzellen ließ sich – wie schon in Abb. 18 für Tag 3 gezeigt – nur minimale Proliferation messen; die Zellzahl lag bei $0,2 \cdot 10^5 \pm 0,1 \cdot 10^5$. In der Negativkontrolle ($CD4^+$ T-Zellen mit Antigen ohne APZ) war keine Proliferation detektierbar; die T-Zell-Fraktion enthielt somit keine kontaminierenden professionellen APZ. Da die meisten Zellen starben, war die Zellzahl an Tag 6 sehr gering ($< 0,02 \cdot 10^5$). Auch

die Kokultur der T-Zellen mit den verschiedenen APZ ohne Antigen zeigte erwartungsgemäß keine Proliferation (Daten nicht gezeigt).

Somit ließ sich auch mit LSEC aus KMCh, bei denen ein Effekt durch professionellen APZ ausgeschlossen war, die Proliferation naiver $CD4^+$ T-Zellen induzieren. Im Vergleich zur Kokultur mit wt-LSEC ließ sich hierbei ein quantitativer Unterschied feststellen, der auf die professionellen APZ in der wt-LSEC-Fraktion zurückzuführen sein könnte.

Da IL-2, das von aktivierten T-Zellen gebildet wird und z. B. als autokriner Wachstumsfaktor die Expansion der T-Zellen beeinflusst, wurde der Einfluss der LSEC auf die IL-2-Produktion untersucht. Nach PMA/IM-Restimulierung der $CD4^+$ T-Zellen wurde IL-2 intrazellulär angefärbt und im Durchflusszytometer detektiert (Abb. 19C).

Nach Kokultur der naiven $CD4^+$ T-Zellen mit wt-LSEC waren $40,15 \pm 9,14$ % IL-2-Produzenten detektierbar, nach Kokultur mit LSEC aus KMCh nur $11,73 \pm 5,24$ %. Diese signifikant geringere IL-2-Produktion könnte für die niedrigere Zellzahl nach Kokultur mit KMCh-LSEC verantwortlich sein.

Nach Kokultur mit professionellen Milz-APZ aus wt-Mäusen lag der Anteil der IL-2-Produzenten bei $40,66 \pm 17,80$ %. Dies ist vergleichbar mit der IL-2-Produktion nach Kokultur mit wt-LSEC. Bei letzterer wurde dennoch eine signifikant geringere Zellzahl detektiert. Möglicherweise war bei Kokultur mit Milz-APZ an Tag 6 die maximale IL-2-Produktion schon überschritten, so dass ein Unterschied in der IL-2-Produktion nur zu Beginn der Kokultur detektiert werden könnte.

4.3.4 Keine Differenzierung in Effektorzellen nach Antigen-Präsentation durch LSEC

Neben der Proliferation wurde auch der Einfluss der LSEC auf die Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen ohne Zugabe weiterer Zytokine kokultiviert („neutrale Kultur“). An Tag 6 der Kokultur wurde dann die Frequenz der IFN- γ -, IL-4- und IL-10-Produzenten mittels intrazellulärer Zytokinfärbung nach PMA/IM-Restimulation bestimmt (Abb. 20).

Nach Kokultur mit wt- oder KMCh-LSEC produzierten nur ca. 2 % der T-Zellen IFN- γ , während $17,13 \pm 7,50$ % der $CD4^+$ T-Zellen, die mit APZ aus wt-Milzen kokultiviert worden waren, IFN- γ produzierten. Nach Kokultur mit Milzzellen aus KMCh wurden ebenfalls ca. 2 % IFN- γ^+ Zellen detektiert. IL-4- und IL-10-Produzenten wurden nicht generiert. Eine Differenzierung zu IFN- γ -produzierenden Zellen ließ sich somit nur auf den professionellen APZ aus wt-Milzen erreichen. Auf LSEC – sowohl aus wt-Mäusen als auch aus KMCh – war die Generierung dieser Effektorzellen nicht zu beobachten.

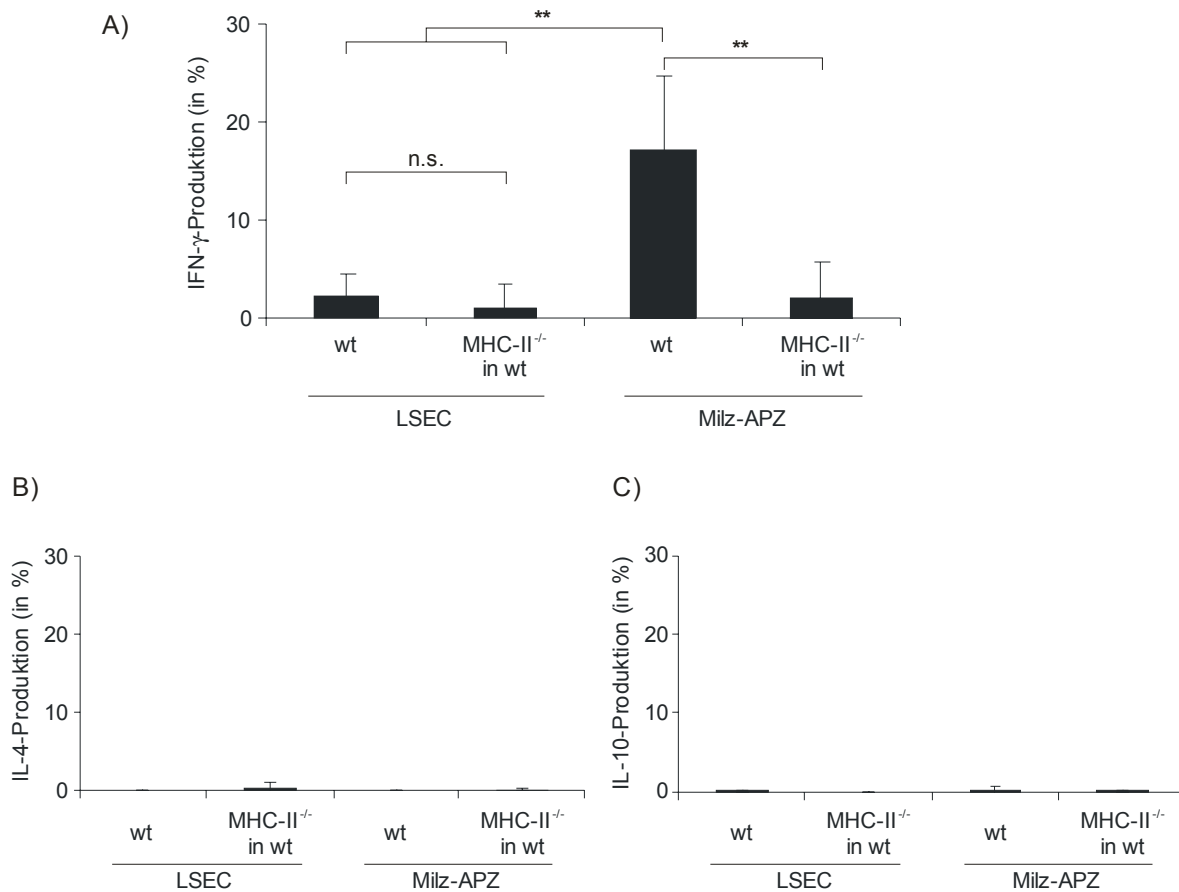


Abb. 20: Fehlenden Expression von IFN γ , IL-4 und IL-10 nach Antigen-spezifischer Kokultur mit LSEC. CFSE-markierte OVA-spezifische naive CD4⁺ T-Zellen wurden aus OT-II-Mäusen isoliert und für 6 Tage mit 5 μ g/ml OVA-Peptid und LSEC bzw. CD90⁻ Milz-APZ aus C57Bl/6-Mäusen oder KMCh kultiviert. Nach PMA/IM-Restimulation wurde intrazelluläres IFN γ , IL-4 und IL-10 am Durchflusszytometer detektiert. Die Diagramme zeigen MW und SD von 5-7 unabhängigen Experimenten mit n.s. = nicht signifikant und ** = p < 0,01.

4.3.5 Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen unbeeinflusst vom Stimulationsgrad der LSEC

Nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen oder mikrobiellen Substanzen ist auf Endothelzellen die Expression von MHC-II sowie die verstärkte Expression von kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen zu beobachten [50, 117-120]. Um die Auswirkung der Stimulation von LSEC auf die Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden die LSEC für 24 h mit IFN- γ und TNF- α inkubiert und dann in der Antigen-spezifischen Kokultur mit naiven CD4⁺ T-Zellen aus OVA-TZR transgenen Mäusen eingesetzt. Die Analyse der LSEC im Durchflusszytometer zeigte erwartungsgemäß eine Heraufregulierung der MHC-II-Expression (Abb. 21A). Bei den wt-LSEC stieg der Anteil der Endothelzellen mit deutlicher MHC-II-Expression von $4,25 \pm 2,10$ % auf $16,55 \pm 4,71$ %. Dies war bei den LSEC aus KMCh mit einem Anstieg von $3,18 \pm 1,25$ % auf $20,20 \pm 6,98$ % ähnlich. Auch die ICAM-1-Expression, die schon ohne Stimulation auf der gesamten LSEC-Population sehr hoch war, konnte durch die pro-inflammatorischen Zytokine gesteigert

werden: Im Durchflusszytometer war nach Stimulation der wt- und KMCh-LSEC eine Verdopplung der mittleren Fluoreszenzintensität zu beobachten.

Um den Einfluss der aktivierten LSEC auf die Stimulation der naiven CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden auch hier Zellzahl, sowie die Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- γ bestimmt (Abb. 21B-D). Nach Kokultur mit LSEC aus KMCh führte die Aktivierung des Endothels weder zur veränderten Expansion noch war die Zytokinproduktion beeinflusst. Trotz der erhöhten MHC-II- und ICAM-1-Expression waren die LSEC nicht in der Lage, eine stärkere Aktivierung der T-Zellen herbeizuführen.

Interessanterweise konnte nach Kokultur mit wt-LSEC durch die Aktivierung des Endothels ein Effekt detektiert werden: Die Kokultur mit aktivierten wt-LSEC führte zu einer verminderten Zellzahl und IL-2-Produktion. Dies könnte auf einen Effekt von IFN- γ und/oder TNF- α auf die Wechselwirkung zwischen den wenigen professionellen APZ und den LSEC bzw. T-Zellen zurückzuführen sein, der möglicherweise durch Deletion dieser Zellen die erhöhte Proliferation und IL-2-Produktion im Vergleich zur Kokultur mit KMCh-LSEC verhindert hat. Ein Effekt auf die IFN- γ -Produktion der CD4⁺ T-Zellen war aber auch hier nicht detektierbar.

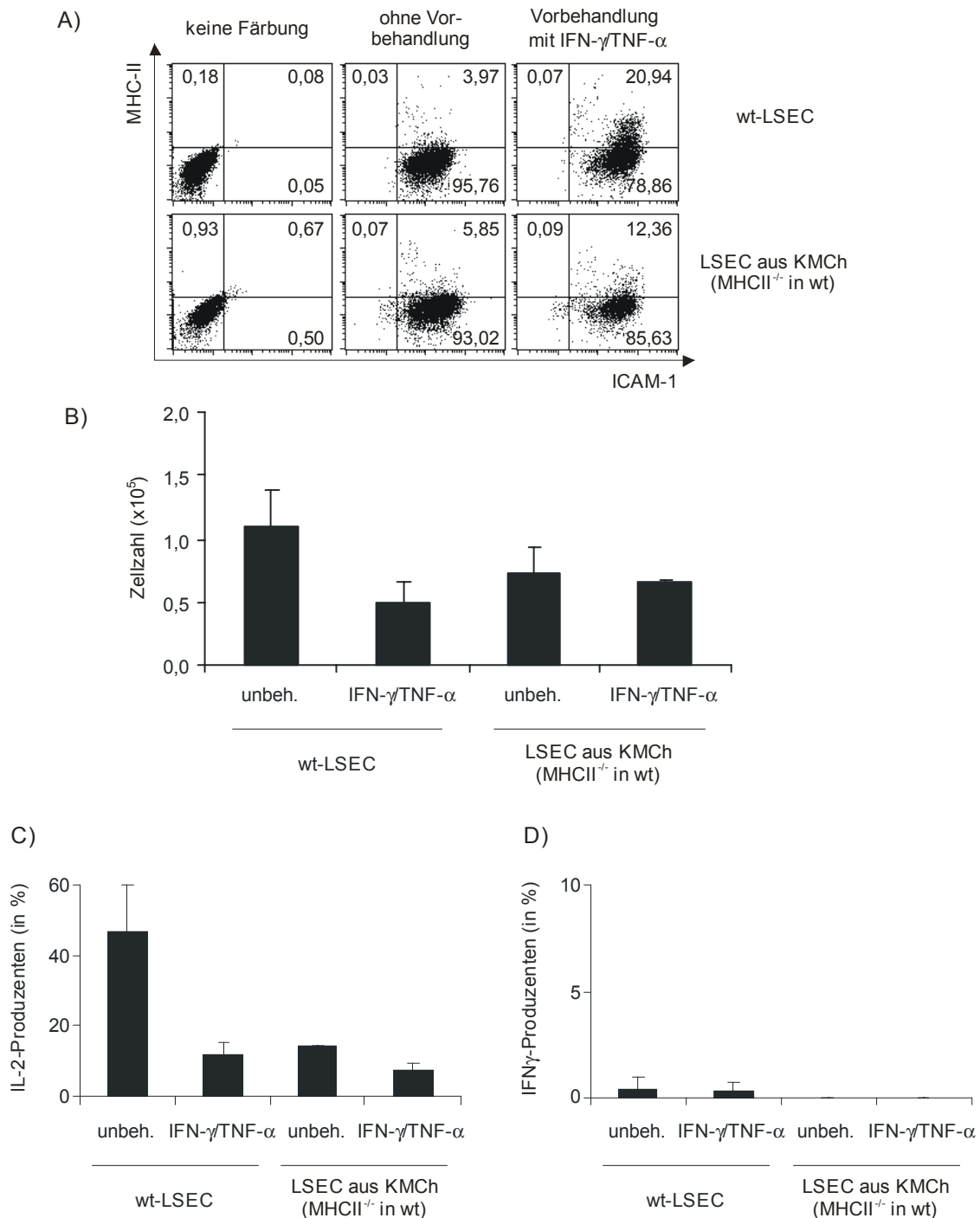


Abb. 21: Trotz Stimulation der LSEC unveränderter Phänotyp der naiven CD4⁺ T-Zellen nach Antigen-spezifischer Kokultur. LSEC wurden aus C57Bl/6-Mäusen oder KMCh isoliert und mit 10 ng/ml IFN- γ und 20 ng/ml TNF- α für 24 h inkubiert. Die Expression von MHC-II und ICAM-1 auf unbehandelten und stimulierten LSEC wurde im Durchflusszytometer analysiert (A). Nach Kokultur von CFSE-markierten OVA-spezifischen naiven CD4⁺ T-Zellen aus OT-II-Mäusen mit diesen LSEC und 5 μ g/ml OVA-Peptid wurde an Tag 6 der Kokultur die Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen (B) und deren Expression von IL-2 (C) und IFN- γ (D) nach PMA/IM-Restimulation ermittelt. Die Daten eines repräsentativen von 4 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

4.3.6 Induktion eines undifferenzierten, reversiblen Phänotyps nach Antigen-Präsentation durch LSEC

Neben Deletion von Effektorzellen oder Suppression durch regulatorische Zellen ist die Entwicklung anergischer T-Zellen, also T-Zellen mit fehlender Effektorfunktion, ein Mechanismus der peripheren Toleranz. Bisher konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die Aktivierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC zwar zur Proliferation der T-Zellen, nicht aber zu Generierung von Effektorzellen führt. Nun sollte geklärt werden, ob diese fehlende Effektorfunktion auf einen irreversibel anergischen Zustand der T-Zellen zurückzuführen ist.

Dazu wurden naive $CD4^+$ T-Zellen in der ersten Woche Antigen-spezifisch mit LSEC kultiviert und in der zweiten Woche entweder mit professionellen Milz-APZ oder erneut mit LSEC (LSEC/Milz bzw. LSEC/LSEC). Zum Vergleich wurden naive $CD4^+$ T-Zellen zuerst Antigen-spezifisch mit Milz-APZ kultiviert und in der zweiten Woche entweder mit LSEC oder erneut mit Milz-APZ (Milz/LSEC bzw. Milz/Milz). Nach PMA/IM-Restimulation wurde dann die IFN- γ -Produktion der T-Zellen intrazellulär überprüft (Abb. 22).

An Tag 6 konnten – wie erwartet – nach Kokultur mit den Milz-APZ $14,76 \pm 10,99$ % IFN- γ^+ $CD4^+$ T-Zellen detektiert werden; nach Aktivierung durch die LSEC nur ca. 2 %. Nach einer zweiten Antigen-spezifischen Stimulation der von den LSEC aktivierten Zellen durch professionelle APZ wurden an Tag 12 eine Steigerung der IFN- γ -Produktion auf $11,60 \pm 10,46$ % detektiert. Dagegen war nach einer zweiten Stimulation durch LSEC der Anteil IFN- γ -produzierender Zellen mit knapp 1 % weiterhin minimal. Die zuerst mit professionellen Milz-APZ kultivierten IFN- γ -produzierenden T-Zellen zeigten auch nach zweiter Stimulation mit Milz-APZ eine gleich bleibende IFN- γ -Expression von $16,19 \pm 12,60$ %. Eine zweite Kultivierungsrunde auf LSEC führte bei diesen Zellen zu einer reduzierten, aber nicht signifikant niedrigeren IFN- γ -Produktion von $10,58 \pm 3,72$ %.

Die Aktivierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC führte somit zwar zur Expansion von T-Zellen ohne Effektorzytokin-Expression, die Differenzierung in Effektorzellen konnte aber durch eine zweite Stimulierung mit professionellen APZ induziert werden. Die $CD4^+$ T-Zellen waren somit während der initialen Aktivierung durch LSEC nicht irreversibel anergisiert worden.

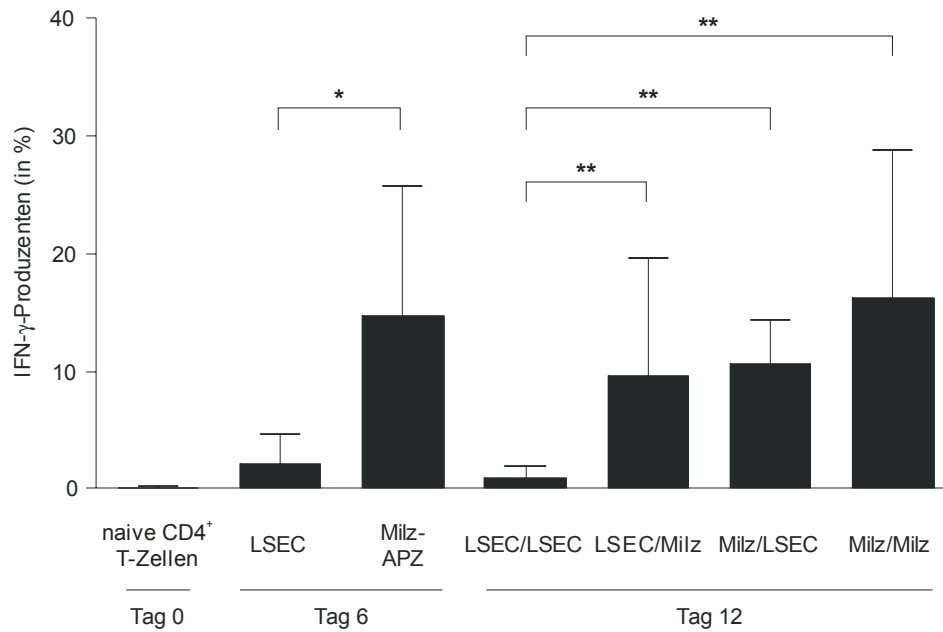


Abb. 22: Reversibler Phänotyp bei naiven CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung durch LSEC. CFSE-markierte OVA-TZR transgene naive CD4⁺ T-Zellen aus DO11.10-Mäusen wurden mit 5 μ g/ml OVA-Peptid und LSEC oder CD90⁺ Milz-APZ aus wt-Mäusen kultiviert. Nach 6 Tagen wurden die T-Zellen abgeerntet und mit 5 μ g/ml OVA-Peptid und frisch isolierten LSEC bzw. Milz-APZ erneut kultiviert: CD4⁺ T-Zellen, die zuvor von LSEC aktiviert worden waren, wurden für weitere 6 Tage mit Milz-APZ kultiviert und *vice versa*. An Tag 0, 6 und 12 wurde nach PMA/IM-Restimulation nach intrazellulärer Färbung der Anteil an IFN- γ -Produzenten bestimmt. Das Diagramm zeigt MW und SD von 12 unabhängigen Experimenten an Tag 6 und von 5 unabhängigen Experimenten an Tag 12 mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$.

5 Diskussion

Eine wichtige Aufgabe des sinusoidalen Endothels der Leber ist der rasche Austausch von Makromolekülen zwischen sinusoidalem Lumen und Leber-Parenchym. Neben den Nährstoffen, die die Leber v. a. mit dem Blut aus dem Darm erreichen, gelangen auch T-Zellen und andere Leukozyten in die Sinusoide. Aufgrund des langsamen Blutflusses in der Leber bewegen sich diese nicht sehr schnell durch die Leber und können aufgrund des geringen Durchmessers der Sinusoide direkt mit den sinusoidalen Endothelzellen in Kontakt treten [121].

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Aspekte der Interaktion der sinusoidalen Endothelzellen mit CD4⁺ T-Zellen *in vitro* untersucht: Zum einen die transendotheliale Migration von CD4⁺ T-Zellen, zum anderen die Fähigkeit der sinusoidalen Endothelzellen, CD4⁺ T-Zellen Antigen-abhängig zu stimulieren.

5.1 *Ex vivo* Isolation der LSEC mit Hilfe des Antikörpers ME-9F1

Um die Modulation von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC *in vitro* untersuchen zu können, ist es notwendig, eine Methode zur Isolation der Endothelzellen einzusetzen, die neben einer guten Reinheit auch eine ausreichende Ausbeute garantiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die LSEC *ex vivo* durch magnetische Sortierung mit dem Antikörper ME-9F1 isoliert. Das Hybridom wurde 1992 im Rahmen einer Doktorarbeit durch Fusion einer Myelomalinie mit Milzzellen aus Ratten, die mit der Endothelzelllinie TME-3H3 immunisiert worden waren, generiert. Der Antikörper färbt das Kapillarendothel in Peyer's Patches, peripheren Lymphknoten, Niere, Leber, Milz, Skelettmuskel, Haut und Gehirn. Ansonsten werden die glatte Muskulatur des Dünndarms und das Trabekelwerk der Milz angefärbt [122].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Antikörper nicht nur in der Immunhistologie und Durchflusszytometrie einsetzbar ist, bei der sich eine Kofärbung mit dem Panendothelzellmarker Meca32 zeigt, sondern auch in der magnetischen Separation der LSEC von den übrigen nicht-parenchymatischen Leberzellen (Abb. 6). Mit einer Ausbeute von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Leber war keine Expansion der *ex vivo* isolierten Zellen notwendig und nach über-Nacht-Kultur wurde eine Reinheit der LSEC von über 95 % erreicht. Mittlerweile ist der Antikörper ME-9F1 – direkt an magnetische Beads gekoppelt – zur LSEC-Isolation bei Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach kommerziell erhältlich.

Eine vergleichbare Isolationsmethode ist für mikrovaskuläre Endothelzellen aus den murinen peripheren Organen Lunge und Herz beschrieben [123], bei der zur magnetischen Sortierung

anti-CD31 (PECAM-1), anti-CD105 (Endoglin) und Isolectin B-4 verwendet werden. Diese Methode ist zwar ebenfalls schnell und ohne besondere Geräteausstattung durchführbar, bringt jedoch nur geringe Ausbeuten. Die Endothelzellen müssen *in vitro* über mehrerer Passagen expandiert werden, bevor sie für Experimente verwendet werden können.

Speziell für die sinusoidalen Endothelzellen der Leber gibt es eine Isolationsmethode, bei der neben den LSEC auch die Leber-residenten Makrophagen, die Kupffer Zellen, mittels zentrifugaler Elutriation von den übrigen hepatischen Zellen getrennt werden [124]. Aufgrund der guten Ausbeute können die so isolierten LSEC ohne Expansion über mehrere Passagen eingesetzt werden [96]. Die Methode erfordert jedoch eine spezielle Ausstattung wie Elutriationszentrifuge und -rotor.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Methode zur LSEC-Isolation vereinigt somit die Vorteile der beiden beschriebenen alternativen Prozeduren: eine weniger aufwändige magnetischen Anreicherung mit einem Endothel-spezifischen Antikörper und eine gute Ausbeute.

5.2 Einfluss der LSEC auf die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen

In der Leber finden sich Leber-residente Lymphozyten nicht nur während Infektion oder Inflammation, sondern auch unter physiologischen Bedingungen sowohl innerhalb der Sinusoide als auch im Parenchym. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit die LSEC an der Rekrutierung von zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen beteiligt sein könnten, indem sie das Migrationsverhalten der T-Zellen beeinflussen.

5.2.1 Erhöhte Transmigration durch LSEC im Vergleich zu anderen Endothelien

Es konnte gezeigt werden, dass LSEC im Vergleich zu anderen Endothelien die Fähigkeit haben, sowohl die spontane transendotheliale Migration von T-Zellen zu erhöhen als auch deren Migration zu bestimmten Chemokinen – zu CXCL9 und CXCL12 – zu steigern.

Transmigration von Lymphozyten durch endotheliale Barrieren ist sowohl für lymphoide als auch für nicht-lymphoide mikrovaskuläre Endothelien gezeigt worden. So wandern rezirkulierende Lymphozyten durch die Endothelzellen der HEV in die sekundären Organe ein [125]. *In vitro* Studien zur Diapedese von Leukozyten verwenden mikrovaskuläre primäre Endothelzellen oder Endothelioma aus verschiedenen Geweben, wie Nabelschnur, Lymphknoten, Haut, Thymus oder Gehirn [111, 116, 126-130]. Durch die aus primärem Hirnendothel generierte Linie bEND5 konnte die spontane Migration von Memory T-Zellen, aber auch von naiven T-Zellen gezeigt werden; im Vergleich zur Migration durch Endothel-freie Transwell[®]-Einsätze war die Migration allerdings vermindert [111]. Diese

Endothelzelllinie bEND5 kann als Modell für mikrovaskuläres Endothel peripherer Organe eingesetzt werden, da die Zellen nicht mehr die komplexen Tight Junctions der Blut-Gehirn-Schranke besitzen [111, 116]. Dazu scheinen sie im Vergleich zur *in vivo* Situation höhere Permeabilität und einen geringeren transendothelialen elektrischen Widerstand aufzuweisen [131, 132].

In der vorliegenden Arbeit ließ sich die reduzierte transendotheliale Migration nicht nur durch die Zelllinie bEND5, sondern auch durch die Zelllinie mlEND beobachten (Abb. 7). Die Linie mlEND wurde aus mesenterialen Lymphknoten generiert und repräsentiert somit lymphoides mikrovaskuläres Endothel [109]. Wie die bEND5-Zellen trägt diese Linie das Polyomavirus middle-T onkogene, das spezifisch Endothelzellen immortalisiert, dabei aber Charakteristika nicht-transformierter Zellen, wie Expression des von-Willebrand-Faktors oder *in vitro* Kontaktinhibition, bewahrt [133, 134]. Daher wurden beide Endothelioma trotz Immortalisierung als Vergleichsendothelien zu den LSEC herangezogen.

Beide Endothelien fungierten im Vergleich zum Endothel-freien System für die Transmigration der CD4⁺ T-Zellen eher als Barrieren. In Anwesenheit der bEND5 bzw. mlEND mussten die T-Zellen nicht nur durch die Transwell[®]-Membran, sondern auch durch einen endothelialen Monolayer wandern, der die Poren der Membran bedeckte. Im Gegensatz dazu war durch die LSEC trotz des endothelialen Monolayers auf der Transwell[®]-Membran im Vergleich zum Endothel-freien System eine ähnliche Migrationsrate zu beobachten. Dies weist auf einen aktiven Beitrag der LSEC an der transendothelialen Migration hin.

Die im Gegensatz zu den Kontrollendothelien gesteigerte Migration durch die LSEC könnte zusätzlich durch bestimmte Eigenschaften der LSEC unterstützt worden sein: Sie sind nicht nur aufgrund der Fenestrae und der fehlenden Basallamina als spezialisiertes Endothel zu bezeichnen, sondern auch aufgrund fehlender Tight Junctions [135] und bilden im Gegensatz zu anderen mikrovaskulären Endothelzellen eine diskontinuierliche Barriere zwischen sinusoidalem Lumen und Leber-Parenchym [59, 136]. Die erhöhte spontane Migration durch LSEC – im Vergleich zur Migration durch bEND5 und mlEND – könnte somit auch auf die geringer organisierten Zell-Zell-Kontakte zurückzuführen sein, die die interendotheliale Transmigration durch die LSEC erleichtern.

Unter physiologischen Bedingungen werden verschiedene Chemokine in der Leber exprimiert, die an der homeostatischen Rekrutierung von T-Zellen in die Leber beteiligt sein könnten [64]: Im humanen System wurde gezeigt, dass z. B. CXCL9 und CXCL10 von sinusoidalen Endothelzellen, CXCL12 und CXCL16 von Cholangiozyten exprimiert werden.

Des Weiteren werden DCs und Makrophagen in den Periportalfeldern mit der Expression von CCL20 assoziiert; erstere auch mit der Expression von CCL21 [73].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Chemotaxis von CD4⁺ T-Zellen zu verschiedenen Chemokinen in Anwesenheit der LSEC untersucht: Die Experimente zeigten im Vergleich zum Endothel-freien System einen signifikanten additiven Effekt der LSEC auf die gerichtete Migration zu bestimmten Chemokinen (Abb. 9). Die Anwesenheit der Kontrollendothelien hingegen führte zu einer signifikant geringeren Migration. Die LSEC wirkten dabei nicht als Filter für bestimmte T-Zell-Subsets, z. B. bestimmte Zytokin-Produzenten, sondern steigerten den chemotaktischen Effekt von CXCL9 und CXCL12 bei allen responsiven Populationen. Die Zusammensetzung der Leber-residenten Lymphozyten, die im Vergleich zu Zellen aus Blut oder lymphoiden Organen einen erhöhten Anteil an Effektor/Memory-Zellen aufweisen [55], scheint somit nicht durch einen Einfluss der LSEC auf die Transmigration bestimmter Subpopulationen, sondern vor allem durch die vorhandenen Chemokine reguliert zu werden.

5.2.2 Mechanismus für die erhöhte Transmigration von CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit der LSEC

Die Transmigration von Leukozyten wird zum einen durch die Kombination vorhandener Chemokine und der zugehörigen Chemokinrezeptoren auf den Leukozyten reguliert, zum anderen durch die Zusammensetzung der Adhäsionsmoleküle auf den Leukozyten und den Endothelzellen. Hierbei ist neben der Aktivierung der Leukozyten, Signaltransduktion zur Änderung der Integrin-Affinität, auch die der Endothelzellen erforderlich, z. B. zur Umorganisation des Zytoskeletts [137-140].

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst die direkte Aktivierung der LSEC durch Chemokine untersucht, um die erhöhte Transmigration in Anwesenheit der LSEC zu erklären. Des Weiteren wurde der Einfluß endothelialer Adhäsionsmoleküle und die Fähigkeit der LSEC zur effizienten Chemokin-Präsentation überprüft.

Da die Expression von CXC-Chemokinrezeptoren für Endothelzellen bekannt ist [114], sollte geklärt werden, ob die LSEC direkt von den in den Experimenten verwendeten Chemokinen CXCL9 und CXCL12 aktiviert wurden und dadurch die erhöhte Transmigration zu erklären ist. Mit LSEC aus CXCR3^{-/-}-Mäusen ließ sich jedoch keine verminderte Transmigration der T-Zellen beobachten; somit ließ sich ein Aktivierung der LSEC über CXCL9/CXCR3-Interaktion ausschließen (Abb. 12). Da CXCR4^{-/-}-Mäuse perinatal sterben [69], konnte die mögliche Aktivierung der LSEC durch CXCL12 nicht mit LSEC aus CXCR4^{-/-}-Mäusen überprüft werden. Daher wurden LSEC mit Pertussis Toxin (PTX) inkubiert, welches die G_i-Protein gekoppelte Signaltransduktion, die nach Chemokin/Rezeptor-Interaktion stattfindet,

blockiert [11]. Auch hier ließ sich kein Unterschied in der Transmigration der CD4⁺ T-Zellen durch PTX-behandelte oder unbehandelte LSEC feststellen (Abb. 13). Dagegen ließ sich durch Vorbehandlung der T-Zellen mit PTX erwartungsgemäß deren Transmigration dosisabhängig blockieren. Wie schon für HEV aus Lymphknoten gezeigt, konnte bestätigt werden, dass zwar die Vorbehandlung der T-Zellen, nicht aber die der Endothelzellen zur Blockade der Transmigration führen kann [141]. Durch die generelle Blockade der Chemokinrezeptorfunktion mittels PTX ließ sich ausschließen, dass eine direkte Aktivierung der LSEC über Chemokinrezeptoren für die gesteigerte Transmigration der T-Zellen verantwortlich war.

Die Transmigration ist nicht nur abhängig von der Art der Chemokine, sondern auch von der Kombination der Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen [3]. Im humanen System wird dem Adhäsionsmolekül VAP-1 eine besondere Rolle bei der Leukozyten-Rekrutierung in die Leber zugeschrieben. Es ist – ebenso wie ICAM-1 – auf LSEC konstitutiv exprimiert und scheint an der Adhäsion und Transmigration durch LSEC beteiligt zu sein [142]. Da VAP-1 in der murinen Leber zwar stark auf dem Endothel der Zentralvene, auf den LSEC aber sehr schwach bis gar nicht exprimiert ist [143], scheint der Einfluss von VAP-1 auf die Transmigration von Lymphozyten im murinen System jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Für ICAM-1 dagegen konnte im murinen System ein Einfluss auf die Retention von CD8⁺ T-Zellen in der Leber gezeigt werden [144]. Darüber hinaus spielt ICAM-1 bei der *in vivo* Akkumulation von NKT-Zellen in der Leber eine Rolle [145-147]. *In vitro* ist ICAM-1, aber auch ICAM-2 für die Transmigration von T-Zellen durch Hirnendothel essentiell [129]. Es ist nicht nur an der festen Adhäsion von Leukozyten an das Endothel, sondern auch an der transendothelialen Migration beteiligt [116]. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass eine fehlende ICAM-1-Expression auf den LSEC weder bei der spontanen Migration durch diese LSEC noch bei der Chemotaxis zu CXCL12 zu einer signifikanten Verminderung führte (Abb. 14). Die hohe ICAM-1-Expression der LSEC scheint somit nicht für den additiven Effekt bei der transendothelialen Migration von CD4⁺ T-Zellen verantwortlich zu sein.

Für Endothelzellen ist durch Immobilisierung von Chemokinen auf der Oberfläche eine lokale Erhöhung der Chemokinkonzentration und damit der transendothelialen Migration beschrieben [19]. Chemokine können aufgrund ihrer basischen Eigenschaft über negativ geladene Glykosaminoglykane (GAGs) auf der Oberfläche von Endothelzellen präsentiert werden. Da sich die Bindungsstellen für die GAGs und die zugehörigen Chemokinrezeptoren unterscheiden, können immobilisierte Chemokine weiterhin von anderen Zellen über den

spezifischen Rezeptor erkannt werden [14, 15]. Die Immobilisierung von Chemokinen lässt sich durch eine Behandlung mit GAG-schneidenden Enzymen verhindern. So verliert subendotheliale Extrazelluläre Matrix (EZM) nach Behandlung mit Heparinase die Fähigkeit der Chemokin-Bindung und die Adhäsion von CD4⁺ T-Zellen an die EZM wird reduziert [148]. Des Weiteren wurde auf HeLa-Zellen eine Verringerung an gebundenen CXCL12 nach Behandlung mit Heparinase oder Heparitinase I, nicht jedoch mit Chondroitinase beschrieben [149]. In der vorliegenden Arbeit wurden die LSEC vor dem Chemotaxisassay mit Heparinase-I behandelt, dessen Aktivität – wie vom Hersteller empfohlen – über Heparin-Spaltung am Photometer nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Dies führte jedoch nicht zu einer verminderten Anzahl migrierender T-Zellen (Abb. 15). Die Bindung der Chemokine auf den LSEC scheint somit nicht von Heparinase-I sensitiven GAGs abhängig zu sein. Eine Immobilisierung der Chemokine über andere GAGs, wie Dermatansulfat oder Chondroitinsulfat, könnte mittels Behandlung der LSEC mit Chondroitinase oder Trypsin überprüft werden.

Ein weiterer Bindungspartner für Chemokine ist DARC (Duffy antigen/receptor for chemokines) [23]. Dieses Glykoprotein wurde zuerst auf roten Blutkörperchen beschrieben und dient als Rezeptor für den Malariaparasiten *Plasmodium vivax*. Für DARC ist bisher kein Mechanismus zur Signaltransduktion bekannt. Es besitzt zwar eine Sieben-Transmembrandomäne ähnlich den Chemokinrezeptoren, ist aber nicht G-Protein gekoppelt [150]. Trotzdem könnte DARC durch Immobilisierung und damit Präsentation von Chemokinen eine Rolle für die Chemotaxis von Leukozyten spielen. Da eine Expression von DARC zwar u. a. auf den sinusoidalen Endothelzellen der Milz und des Knochenmarks, nicht aber auf den LSEC beschrieben ist [151], scheint eine Rolle bei der Chemokin-Präsentation auf LSEC nicht sehr wahrscheinlich und wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Um die mögliche Chemokin-Bindung über GAGs auf den LSEC genauer zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit dem Chemokin CXCL12 vorinkubiert. Ein direkter Effekt des Chemokins auf die LSEC über Chemokin/Rezeptor-Interaktion konnte dabei ausgeschlossen werden, da – wie oben diskutiert – eine Behandlung der LSEC mit PTX ohne Effekt blieb. Die Chemokin-Vorinkubation bewirkte allerdings nur dann eine Steigerung der Transmigration, wenn das Chemokin von unten (abluminal) gegeben wurde. Die Inkubation von oben (luminal) führte weder bei den Zeitrafferaufnahmen am Phasenkontrastmikroskop noch im Transwell[®]-System zu erhöhten Migrationsraten der CD4⁺ T-Zellen (Abb. 8, 16). Somit scheint die Immobilisierung des Chemokins auf der LSEC-Oberfläche allein nicht

ausreichend, eine gesteigerte Transmigration von T-Zellen zu induzieren. Es scheint zusätzlich notwendig, dass sich das Chemokin während der Präinkubation an der Endothel-Unterseite befindet. Ohne diese zweite Bedingung hätte auch die Präinkubation von oben eine erhöhte Transmigration der T-Zellen hervorrufen müssen.

Für einige Chemokine (CXCL8, CCL2, CCL19 oder CCL21) konnte mittlerweile gezeigt werden, dass Endothelzellen diese Chemokine über Transzytose von der abluminalen zur luminalen Seite transportieren und dort präsentieren können [20, 24-26]. Dabei erscheint die Interaktion mit GAGs notwendig, wie Experimente mit mutiertem CXCL8 zeigen, das bei fehlender Bindungsfähigkeit zu Heparansulfat nicht mehr transportiert werden kann [20]. Hierbei kommt es nicht zu einer gleichmäßigen Verteilung entlang der Endotheloberfläche, sondern CXCL8 wird auf den Spitzen der Mikrovilli zusammen mit bestimmten Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 präsentiert. Diese Kolo-kalisation der an der transendothelialen Migration beteiligten Moleküle resultiert dann in erhöhter Transmigration. Die Transzytose dient somit der lokalen Präsentation der im Gewebe produzierten Chemokine, um Lymphozyten ins Gewebe zu rekrutieren [23]. Der Effekt der gesteigerten Chemotaxis nach abluminaler Präinkubation der LSEC mit CXCL12 passt in dieses Modell (Abb. 23). Die LSEC scheinen somit die Fähigkeit der effizienten Aufnahme und Transzytose bestimmter Chemokine zu besitzen; eine Fähigkeit, die die gesteigerte Chemotaxis der CD4⁺ T-Zellen erklärt.

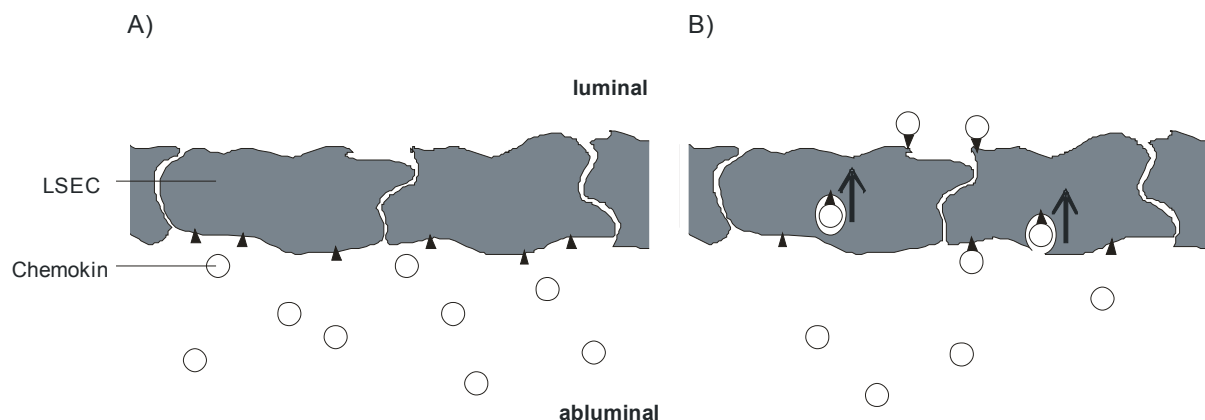


Abb. 23: Modell zur effizienten Chemokin-Präsentation durch die LSEC nach Middleton *et al.*, 2002. Chemokine, die sich abluminal der LSEC befinden (A), werden von den LSEC aufgenommen und in Caveolae transzytiert; ein Prozess, der die Bindung an Glykosaminoglykane (GAGs) beinhaltet. Auf der luminalen Seite werden die Chemokine dann auf den Spitzen endothelialer Mikrovilli effizient präsentiert (B). Nach Interaktion mit Chemokinrezeptoren auf der T-Zelloberfläche kommt es zur Integrin-Aktivierung und fester Adhäsion, was in effizienter Transmigration der T-Zellen durch die LSEC resultiert.

5.3 Antigen-abhängige Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC

Aufgrund der Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme und -Präsentation sowie der Expression kostimulatorischer Moleküle gehören die LSEC neben hepatischen DCs und Kupffer Zellen zu den Leber-spezifischen Antigen-präsentierenden Zellen [94, 99, 152, 153]. Neben dem Einfluss der LSEC auf das Migrationsverhalten von CD4⁺ T-Zellen sollte daher in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welcher Effekt auf naive CD4⁺ T-Zellen nach Antigen-Präsentation durch LSEC zu beobachten ist und inwieweit dies bei der Induktion von peripherer Toleranz eine Rolle spielen könnte.

Bisher konnte mit zwei unterschiedlichen experimentellen Systemen gezeigt werden, dass *in vivo* die Cross-Präsentation von exogenem Antigen durch LSEC bei CD8⁺ T-Zellen zu Immuntoleranz führt [90, 98]. Auch scheinen LSEC *in vitro* an der alloreaktiven Toleranzinduktion von CD4⁺ T-Zellen beteiligt zu sein [97, 153] und können – neben Kupffer Zellen und Hepatozyten – die Suppressoraktivität regulatorischer CD4⁺ T-Zellen *in vitro* stimulieren [100]. Um zunächst zu klären, ob LSEC als nicht-professionelle APZ generell in der Lage sind, naive CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren, wurden *in vitro* Antigen-spezifische Kokulturen durchgeführt und der Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen nach Kokultur mit den LSEC genauer untersucht.

5.3.1 Ausschluss kontaminierender professionelle APZ

Bei der Untersuchung der Aktivierung naiver T-Zellen durch nicht-professionelle APZ spielt die Reinheit der *ex vivo* isolierten Zell-Populationen eine große Rolle. Es muss eine Kontamination mit professionellen APZ ausgeschlossen werden, da diese – v. a. die dendritischen Zellen – sehr effiziente Antigen-Präsentation und Kostimulation aufweisen und so schon in sehr geringer Anzahl eine Aktivierung auslösen und damit die Ergebnisse beeinflussen können.

Nach der *ex vivo* Isolation der LSEC waren bei einer Reinheit von > 95 % geringe Mengen professioneller APZ in der Endothelzell-Fraktion vorhanden. Um eine LSEC-Fraktion ohne MHC-II⁺ professionelle APZ zu erhalten, wurden die Endothelzellen aus Knochenmarkschimären (KMCh) isoliert, bei denen die MHC-II-Expression auf professionellen myeloiden APZ fehlt, aber auf nicht-professionellen APZ, wie den Endothelzellen, noch vorhanden ist. Da professionelle APZ aus dem Knochenmark stammen und aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit schnell durch neue Zellen aus dem Knochenmark ersetzt werden, LSEC dagegen nicht-myeloiden Ursprungs sind [101, 154], wurde dies durch Rekonstitution von wt-Mäusen mit MHC-II^{-/-}-Knochenmark erreicht. Um einen kompletten Austausch des hämatopoietischen Systems der wt-Mäuse mit MHC-II^{-/-}-Knochenmark zu gewährleisten, ist

eine lethale Bestrahlungsdosis notwendig, die abhängig vom Mausstamm zwischen 8 und 12 Gy liegt [155-158]. Sowohl die phänotypische Analyse der KMCh als auch der funktionelle Test zeigten eine effiziente Depletion der myeloiden Zellen bei der eingesetzten Bestrahlungsdosis von 10,4 Gy (Abb. 18).

Die Aktivierung naiver $CD4^+$ T-Zellen nach Kokultur mit KMCh-LSEC war im Vergleich zur Kokultur mit LSEC aus wt-Mäusen geringer. Die geringere Zellzahl an Tag 6 könnte auf die niedrigere IL-2-Produktion zurückzuführen sein (Abb. 19), da IL-2 ein wichtiger Wachstumsfaktor während der Expansion ist. Der Grad der Expansion kann proportional zur verfügbaren Menge an IL-2 sein, ein Mangel an IL-2 dagegen zu Apoptose führen [159]. Die verminderte Aktivierung der T-Zellen nach Kokultur mit LSEC aus KMCh war – neben der Analyse der LSEC am Durchflusszytometer – ein weiterer Hinweis auf die Kontamination der LSEC-Präparation mit myeloiden APZ. Diese wenigen professionellen APZ könnten aufgrund der effizienten Aktivierung einiger naiver T-Zellen für die erhöhte IL-2-Produktion und Proliferation nach der Kokultur mit wt-LSEC verantwortlich sein.

Um das Vorhandensein professioneller APZ in der $CD4^+$ T-Zell-Fraktion auszuschließen, wurde vor der Isolation der naiven $CD4^+$ T-Zellen eine Depletion der MHC-II⁺ Zellen vorgenommen und das Fehlen von MHC-II⁺ Zellen nicht nur im Durchflusszytometer, sondern ebenfalls im Proliferationsexperiment überprüft (Abb. 19, nur T-Zellen plus Antigen). Die fehlende Proliferation der T-Zellen schließt zusätzlich die Expression von MHC-II-Molekülen auf $CD4^+$ T-Zellen aus. Eine *de novo* MHC-II-Synthese konnte bisher für $CD4^+$ T-Zellen aus Ratte und Mensch, nicht jedoch für murine Zellen gezeigt werden [160-163].

Damit konnte in den LSEC- und den $CD4^+$ T-Zell-Fractionen eine Kontamination mit myeloiden MHC-II⁺ APZ ausgeschlossen und die Fähigkeit der Antigen-Präsentation und Aktivierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen den LSEC zugeschrieben werden.

5.3.2 Antigen-Dosis abhängige Expansion naiver $CD4^+$ T-Zellen durch LSEC

Die Fähigkeit, naive $CD4^+$ T-Zellen optimal zu aktivieren und damit ihre Expansion und Differenzierung in Effektorzellen zu induzieren, wird generell nur einem Subset der professionellen APZ, den DCs, zugeschrieben [41, 164, 165], da diese die erforderlichen Signale über TZR-MHC-II/Peptid-Interaktion und kostimulatorische Moleküle auslösen können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben professionellen APZ auch LSEC in der Lage sind, die Proliferation von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu induzieren. Damit konnten die Ergebnisse von Knolle *et al.* bestätigt werden, die für $CD4^+$ T-Zellen eine

Aktivierung durch LSEC, nicht jedoch durch andere Endothelzellen wie Aorta-Endothel beschreiben [99]. Im Gegensatz dazu konnten Katz *et al.* nach Antigen-spezifischer Kokultur von CD4⁺ T-Zellen mit LSEC keine Stimulation beobachten [101]. Dies könnte zum einen auf die unterschiedliche Isolation und Kultivierung der LSEC zurückzuführen sein: In der vorliegenden Arbeit wurden die LSEC mit einem Endothel-spezifischen Antikörper über MACS angereichert und über Nacht in Flachboden-Platten kultiviert, so dass sie adhärieren konnten. Dagegen isolieren Katz *et al.* die LSEC über magnetische Depletion der CD45⁺ Zellen und setzen die frisch isolierten LSEC direkt im Proliferationsexperiment in Rundboden-Platten ein. Dabei verwenden sie 1 µg/ml OVA-Peptid und analysieren das Maß die T-Zell-Proliferation an Tag 3. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass an Tag 3 die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Kokultur mit LSEC nur bei 5fach höherer Antigen-Menge gut detektierbar war (Abb. 17). Erst an Tag 6 war auch bei 1 µg/ml OVA-Peptid deutliche Proliferation sichtbar. Daher wurden in den Kokultur-Experimenten der vorliegenden Arbeit 5 µg/ml OVA-Peptid eingesetzt und die Analyse nicht an Tag 3, sondern an Tag 6 durchgeführt.

Die Experimente zur Antigen-dosis-abhängigen Aktivierung wurden mit LSEC aus wt-Mäusen durchgeführt (Abb. 17). Die Aktivierung der T-Zellen konnte aber auch nach Kokultur mit LSEC aus MHC-II-KMCh gezeigt werden (Abb. 19).

Im Gegensatz zu den LSEC ist für die Stimulation naiver T-Zellen durch professionelle Milz-APZ eine 500fach niedrigere Antigen-Menge ausreichend (Abb. 17). Dies lässt auf eine ineffiziente T-Zell-Aktivierung durch die LSEC im Vergleich zu professionellen APZ schließen. Für das TZR-Signal spielen neben der Affinität vom TZR zum Antigen/MHC-II-Komplex auch Konzentration des exogenen Antigens und Dichte der spezifischen MHC-Moleküle eine Rolle [166]. Da die LSEC nur schwache Level an MHC-II exprimieren (Abb. 18, [153]), scheint die hohe Antigenmenge notwendig, da nur dann ausreichend viele OVA-Peptid/MHC-II-Komplexe auf der Endothel-Oberfläche vorhanden sind, um ein TZR-Signal auszulösen. Zusätzlich könnte die effiziente Antigen-Aufnahme durch die LSEC, die durch die hohe Expression von Mannose- und Scavenger-Rezeptor erreicht wird [94, 167], die Zahl der OVA-Peptid/MHC-II-Komplexe erhöhen und damit die schwache MHC-II-Expression kompensieren. Da in der vorliegenden Arbeit kein Protein, sondern Peptid als Antigen verwendet wurde, welches direkt an die Oberflächen-MHC-II-Moleküle bindet, bleibt dies noch zu prüfen.

5.3.3 Nach Aktivierung durch LSEC keine Differenzierung in IFN- γ -, IL-4- oder IL-10-Produzenten

Trotz der Induktion von Proliferation waren nach Antigen-spezifischer Kokultur von naiven CD4⁺ T-Zellen mit LSEC kaum IFN- γ - und keine IL-4- oder IL-10-Produzenten detektierbar (Abb. 20). Die niedrige Sekretion von IFN- γ wird durch die Arbeit von Knolle *et al.*, 1999 bestätigt, obwohl dort auch die Produktion von IL-4 und IL-10 beschrieben wird [99]. Diese schwache Induktion von Zytokin-Expression war also mittels ELISA im Kulturüberstand, nicht jedoch – wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt – intrazellulär auf Einzelzellebene detektierbar. Die Aktivierung auf LSEC könnte somit zwar die Generierung von Th0-Zellen, also von IFN- γ ⁺ IL-4⁺ IL-10⁺ T-Zellen, nicht jedoch von Th1-Effektorzellen induzieren. Stimulationsexperimente mit HUVEC zeigen ebenfalls, dass Endothelzellen zwar kostimulatorische Kapazität besitzen, jedoch keine Th1-polarisierten Zellen induzieren [168]. Im Gegensatz zu den Endothelzellen wurde auf professionellen Milz-APZ und aus APZ aus Knochenmark oder Blut, die in den anderen Studien verwendet wurden, eine Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Th1-polarisierte Zellen beobachtet. Dies resultiert wahrscheinlich aus einem starken TZR-Stimulus – aufgrund der hohen MHC-II-Expression und ausreichender Antigen-Konzentration – sowie einer optimalen Kostimulation. Auf Milz-APZ wurden auch bei niedrigen Antigen-Konzentrationen, also einem schwachen TZR-Signal, mehr IFN- γ -Produzenten als auf LSEC generiert (Daten nicht gezeigt). Wie für humane Endothelzellen gezeigt, könnte neben der schwachen Stimulation auch das Fehlen polarisierender Zytokine, z. B. IL-12, für die unvollständige Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen auf den LSEC verantwortlich sein [168].

LSEC und andere Endothelzellen scheinen somit zwar die Proliferation, bei naiven T-Zellen eine notwendige Voraussetzung für die Synthese von Effektorzytokinen [169], nicht jedoch die Reifung zu Effektorzellen induzieren zu können (Abb. 24).

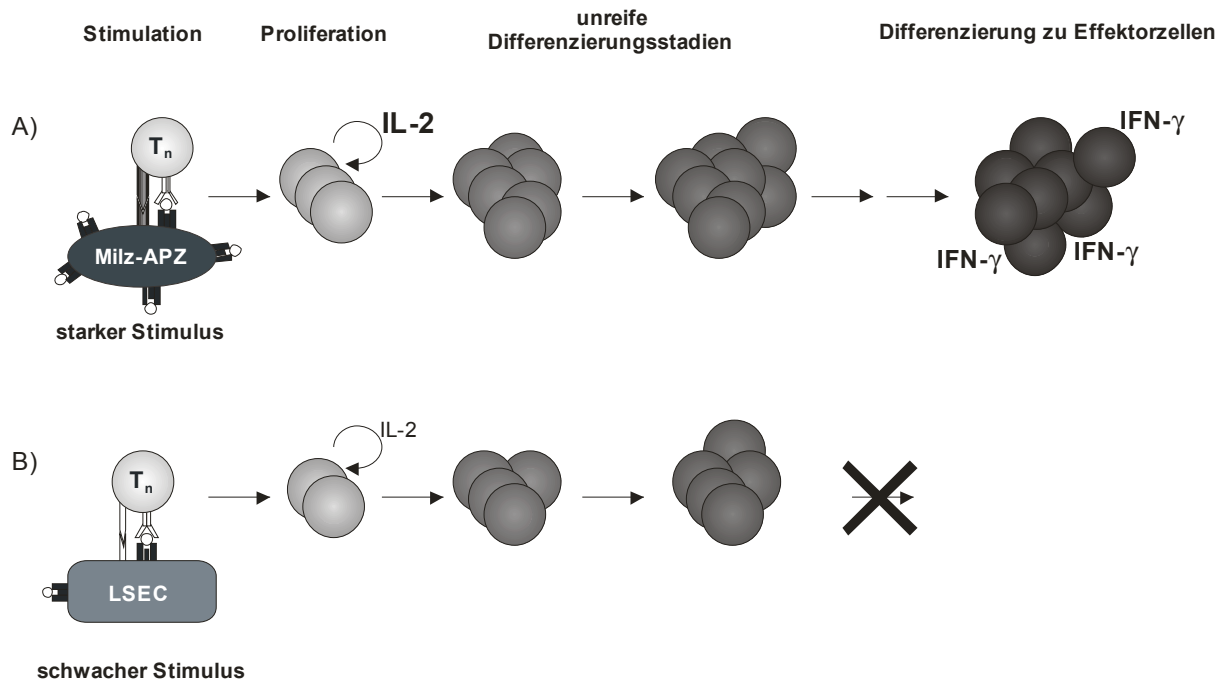


Abb. 24: Unvollständige Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung durch LSEC. Starke stimulatorische Signale induzieren Milz-APZ die Proliferation naiver CD4⁺ T-Zellen (T_n) sowie ihre Differenzierung zu IFN- γ produzierende Effektorzellen (A). Dagegen proliferieren durch LSEC aktivierte naive CD4⁺ T-Zellen aufgrund der schwachen Stimulation geringer und weisen einen unreifen Differenzierungsstatus auf (B).

Um die Induktion einer T-Zell-Aktivierung durch Endothelzellen zu untersuchen, werden die Endothelzellen in der Regel stimuliert [50, 117-120]. Dies geschieht durch proinflammatorische Zytokine oder mikrobielle Substanzen, die auf den Endothelzellen eine *de novo* oder gesteigerte Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen induzieren. Erwartungsgemäß ließ sich auf LSEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ eine erhöhte MHC-II- und ICAM-1-Expression detektieren. Dennoch hatte die Stimulation der LSEC auf die Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen keinen Einfluss: Weder war die Proliferation der T-Zellen erhöht noch wurde die Expression von IFN- γ induziert (Abb. 21). Für die Stimulation der LSEC mit LPS ist ebenfalls kein Effekt auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen beschrieben [100]. Die LSEC scheinen somit eine funktionelle Resistenz gegenüber bestimmten proinflammatorischen Signalen zu besitzen.

In der Literatur ist eine Antigen-spezifische Modulation durch LSEC bereits für CD8⁺ T-Zellen sowie für Antigen-erfahrende CD4⁺ T-Zellen gezeigt worden: Für CD8⁺ T-Zellen ist *in vitro* ebenfalls eine fehlende Differenzierung in Effektorzellen beschrieben (keine Zytotoxizität, keine IFN- γ -Produktion), *in vivo* konnte die Induktion peripherer Toleranz beobachtet werden [90]. Für *in vitro* polarisierte Th1-Effektorzellen konnte nach Antigen-Präsentation durch LSEC eine verminderte Expansion sowie eine geringere Menge an IFN- γ -produzierenden Zellen detektiert werden [170]. Letzteres ließ sich in der vorliegenden Arbeit

für die zuerst auf professionellen Milz-APZ differenzierten T-Zellen nur tendenziell zeigen; es war kein signifikanter Unterschied zwischen Restimulation durch LSEC und durch Milz-APZ messbar. Möglicherweise war hier die initiale Menge IFN- γ -produzierender Zellen von Bedeutung: Bei *in vitro* generierten Th1-Kulturen werden Th1-polarisierende Zytokine und Antikörper zugesetzt, so dass an Tag 6 der Kultur mindest. 60 % der Zellen IFN- γ produzieren. Die auf Milz-APZ aktivierten CD4⁺ T-Zellen wurden ohne zusätzliche Zytokine kultiviert und der Anteil IFN- γ -produzierender Zellen lag bei nur 15 %.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung durch LSEC nicht dauerhaft anerg sind. Die Zellen sind in der Lage, nach einer zweiten Antigen-spezifischer Stimulierung durch professionelle APZ IFN- γ zu produzieren (Abb. 22); sie scheinen dann von „unreifen“ zu „reifen“ Effektorzellen zu differenzieren. Die funktionelle Bedeutung der LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen wurde hier jedoch nicht weiter untersucht. Es bleibt noch zu klären, inwieweit die MHC-II restringierte Antigen-Präsentation durch LSEC *in vivo* Einfluss auf das Immunsystem nimmt.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Untersuchungen zur Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch die LSEC *in vitro* haben gezeigt, dass die Endothelzellen der hepatischen Sinusoide im Vergleich zu anderen Endothelien in der Lage sind, eine rasche Wanderung der T-Zellen zu veranlassen. Hierbei scheint die Transzytose und effiziente Präsentation von Chemokinen Grund für die erhöhte Chemotaxis zu sein. Ein direkter Nachweis von LSEC-gebundenem bzw. in Caveolae transzytiertem Chemokin fehlt allerdings bisher und sollte in nachfolgenden Experimenten ergänzt werden. Auch konnte bisher eine erhöhte Migration durch die LSEC *in vivo* noch nicht direkt gezeigt werden.

In den Versuchen am Phasenkontrastmikroskop konnte beobachtet werden, dass die T-Zellen nicht nur von der luminalen auf die abluminale Seite transmigrierten, sondern z. T. auch zurück auf die Oberseite der LSEC wanderten. *In vivo* würde dies nicht nur einen schnellen Wechsel der T-Zellen vom Lumen der Sinusoide ins Parenchym bedeuten, sondern auch zurück in die Zirkulation. Damit würden die T-Zellen nicht nur in die Leber rekrutiert werden, sondern auch transient in das Organ einwandern können.

Dieser Mechanismus könnte für eine immunologische Überwachung der Leber relevant sein, aber auch für die immunmodulatorische Funktion der Leber: Durch die Immigration ins Parenchym und evtl. auch die Emigration zurück zum sinusoidalen Lumen würde sich die Aufenthaltsdauer der T-Zellen in der Leber verlängern. Neben dem Kontakt zur den LSEC wäre so die Interaktion der T-Zellen mit anderen hepatischen Populationen, wie Hepatozyten oder Ito Zellen, möglich.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die immunmodulatorischen Fähigkeiten der LSEC genauer untersucht. Ob Endothelzellen eine T-Zell-Antwort durch Antigen-Präsentation initiieren können, ist umstritten. Dabei sind die dafür notwendigen Voraussetzungen, wie Expression der MHC-Moleküle und die Fähigkeit der Antigen-Aufnahme und -Präsentation, für LSEC und auch für andere Endothelien beschrieben [50, 121]. Verschiedene Studien konnten jedoch keine Stimulation von T-Zellen nach endothelialer Antigen-Präsentation feststellen [101, 171, 172], wohingegen andere Arbeiten eine Aktivierung, Proliferation und/oder Zytokin-Expression zeigen [32, 99, 168, 173, 174]. Allerdings scheinen Endothelzellen aufgrund fehlender optimaler Aktivierung der T-Zellen keine Immunantwort sondern Toleranz zu induzieren [90, 98, 175].

In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die LSEC generell in der Lage sind, bei naiven CD4⁺ T-Zellen Antigen-spezifische Proliferation, jedoch keine

Zytokinproduktion zu induzieren. Dabei konnte ein Effekt kontaminierender professioneller APZ durch die Verwendung von LSEC aus MHC-II^{-/-}-Knochenmarkschimären (Transfer von MHC-II^{-/-}-Knochenmark in wt-Rezipienten) ausgeschlossen werden. Es bleibt zu prüfen, in welchem Maße die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC *in vivo* stattfindet und ob diese durch LSEC aktivierten CD4⁺ T-Zellen funktionelle Bedeutung für das Immunsystem besitzen. Das Auslösen einer Immunantwort durch Generierung von Effektorzellen scheint aufgrund der fehlenden Zytokinproduktion *in vitro* nicht sehr wahrscheinlich, möglicherweise besitzen die Zellen dagegen regulatorische Kapazität. Neben der Expression regulatorischer Marker wie FoxP3, CD25 oder CD103 könnte dies in weiteren Experimenten, z. B. im Suppressionsassay, überprüft werden.

Um die Modulation naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC *in vivo* zu überprüfen, ist die Etablierung eines Tiermodells notwendig, das die MHC-II restringierte Antigen-Präsentation auf LSEC beschränkt. Die MHC-II^{-/-}-Knochenmarkschimären scheinen hierfür geeignet, da die MHC-II-Expression ausschließlich auf parenchymatischen Zellen, also auch auf den LSEC, und nicht auf professionellen myeloiden APZ erfolgt. Durch orale Antigen-Gabe kann dabei die Antigen-Präsentation vor allem auf die Leber begrenzt werden, da Nahrungsantigene mit dem Blut vom Darm über die *Vena portae* zuerst in die Leber gelangen. Ließe sich nach adoptivem Transfer Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in MHC-II^{-/-}-Knochenmarkschimären die Induktion von Toleranz zeigen, sei es durch Deletion, Anergisierung oder Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen zu Suppressorzellen, könnten die LSEC nicht nur für CD8⁺ T-Zellen, sondern generell als Toleranz-induzierende APZ bezeichnet werden, die z. B. für den Erhalt der oralen Toleranz von Bedeutung sein könnten.

6 Referenzen

1. Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration:
2. Schaerli P, Moser B: Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res* 2005, 31(1):57-74.
3. Salmi M, Jalkanen S: How do lymphocytes know where to go: current concepts and enigmas of lymphocyte homing. *Adv Immunol* 1997, 64:139-218.
4. Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M: Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 1999, 72:209-253.
5. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S: Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002, 14(2):73-81.
6. van der Flier A, Sonnenberg A: Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001, 305(3):285-298.
7. Johnston B, Butcher EC: Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* 2002, 14(2):83-92.
8. Chensue SW: Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14(4):821-835, table of contents.
9. Kim CH: Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2004, 4(4):343-361.
10. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P: Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004, 25(2):75-84.
11. Thelen M: Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001, 2(2):129-134.
12. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M: Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 2000, 74:127-180.
13. Rot A: Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today* 1992, 13(8):291-294.
14. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD: Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 1995, 57(5):703-711.
15. Lortat-Jacob H, Grosdidier A, Imberty A: Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(3):1229-1234.
16. Tumova S, Woods A, Couchman JR: Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2000, 32(3):269-288.

17. Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM: Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: A new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005.
18. Witt DP, Lander AD: Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol* 1994, 4(5):394-400.
19. Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, Wells TN: Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 1999, 38(39):12959-12968.
20. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A: Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997, 91(3):385-395.
21. Patel DD, Koopmann W, Imai T, Whichard LP, Yoshie O, Krangel MS: Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clin Immunol* 2001, 99(1):43-52.
22. Webb LM, Ehrengruber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A: Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90(15):7158-7162.
23. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA: Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002, 100(12):3853-3860.
24. Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinholt FP, von Andrian UH, Brandtzaeg P, Haraldsen G: The CCR7 ligand e1c (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 2001, 193(9):1105-1112.
25. Stein JV, Rot A, Luo Y, Narasimhaswamy M, Nakano H, Gunn MD, Matsuzawa A, Quackenbush EJ, Dorf ME, von Andrian UH: The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med* 2000, 191(1):61-76.
26. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A *et al*: Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 2001, 194(9):1361-1373.

27. Friedl P, Storim J: Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol* 2004, 14(10):557-567.
28. Chambers CA, Allison JP: Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11(2):203-210.
29. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA: ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999, 397(6716):263-266.
30. Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC: B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 1999, 11(4):423-432.
31. Yamazaki T, Akiba H, Koyanagi A, Azuma M, Yagita H, Okumura K: Blockade of B7-H1 on Macrophages Suppresses CD4+ T Cell Proliferation by Augmenting IFN- γ -Induced Nitric Oxide Production. *J Immunol* 2005, 175(3):1586-1592.
32. Sancho D, Yanez-Mo M, Tejedor R, Sanchez-Madrid F: Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. *Blood* 1999, 93(3):886-896.
33. Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S: The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 1990, 144(12):4579-4586.
34. Damle NK, Klussman K, Aruffo A: Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T cells. *J Immunol* 1992, 148(3):665-671.
35. Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL: CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1994, 152(4):1523-1531.
36. Damle NK, Aruffo A: Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(15):6403-6407.
37. Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway CA, Jr.: Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 1992, 175(2):437-445.
38. Hintzen RQ, Lens SM, Lammers K, Kuiper H, Beckmann MP, van Lier RA: Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol* 1995, 154(6):2612-2623.

39. Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M: Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 1998, 161(12):6510-6517.
40. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K: Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 1995, 182(5):1591-1596.
41. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392(6673):245-252.
42. Campbell DJ, Debes GF, Johnston B, Wilson E, Butcher EC: Targeting T cell responses by selective chemokine receptor expression. *Semin Immunol* 2003, 15(5):277-286.
43. Grossman Z, Min B, Meier-Schellersheim M, Paul WE: Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2004, 4(5):387-395.
44. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999, 401(6754):708-712.
45. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R: Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002, 2(4):251-262.
46. Kuwana M: Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 2002, 63(12):1156-1163.
47. Wallet MA, Sen P, Tisch R: Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 2005, 3(3):166-175.
48. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM: Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(14):6586-6590.
49. Schwartz RH: Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 1996, 184(1):1-8.
50. Marelli-Berg FM, Jarmin SJ: Antigen presentation by the endothelium: a green light for antigen-specific T cell trafficking? *Immunol Lett* 2004, 93(2-3):109-113.
51. Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* 1969, 42(1):68-91.

52. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER: Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 1977, 72(2):441-455.
53. Lau AH, Thomson AW: Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003, 52(2):307-314.
54. Doherty DG, O'Farrelly C: Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000, 174:5-20.
55. Klugewitz K, Adams DH, Emoto M, Eulenburg K, Hamann A: The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends Immunol* 2004, 25(11):590-594.
56. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Loviseti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A: Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 1994, 35(11):1509-1516.
57. Wisse E: An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* 1970, 31(1):125-150.
58. Seternes T, Sorensen K, Smedsrod B: Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(11):7594-7597.
59. Lalor T, Adams D: The liver: a model of organ-specific lymphocyte recruitment. *Expert Rev Mol Med* 2002, 2002:1-15.
60. Yamamoto S, Sato Y, Shimizu T, Halder RC, Oya H, Bannai M, Suzuki K, Ishikawa H, Hatakeyama K, Abo T: Consistent infiltration of thymus-derived T cells into the parenchymal space of the liver in normal mice. *Hepatology* 1999, 30(3):705-713.
61. Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Eulenburg K, Emoto M, Hamann A: The spectrum of lymphoid subsets preferentially recruited into the liver reflects that of resident populations. *Immunol Lett* 2004, 93(2-3):159-162.
62. Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL, Kubes P: A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* 1997, 99(11):2782-2790.
63. Scoazec JY, Feldmann G: The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 1994, 20(2):296-300.
64. Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH: Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 2002, 80(1):52-64.

65. Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM: Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995, 182(5):1301-1314.
66. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH: Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999, 163(11):6236-6243.
67. Khan IA, MacLean JA, Lee FS, Casciotti L, DeHaan E, Schwartzman JD, Luster AD: IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity* 2000, 12(5):483-494.
68. Jiang W, Zhou P, Kahn SM, Tomita N, Johnson MD, Weinstein IB: Molecular cloning of TPAR1, a gene whose expression is repressed by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA). *Exp Cell Res* 1994, 215(2):284-293.
69. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A: The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000, 18:593-620.
70. Wald O, Pappo O, Safadi R, Dagan-Berger M, Beider K, Wald H, Frantza S, Weiss I, Avniel S, Boaz P *et al*: Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. *Eur J Immunol* 2004, 34(4):1164-1174.
71. Hedrick JA, Zlotnik A: Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol* 1997, 159(4):1589-1593.
72. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H, Matsushima K: Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 2001, 193(1):35-49.
73. Grant AJ, Goddard S, Ahmed-Choudhury J, Reynolds G, Jackson DG, Briskin M, Wu L, Hubscher SG, Adams DH: Hepatic expression of secondary lymphoid chemokine (CCL21) promotes the development of portal-associated lymphoid tissue in chronic inflammatory liver disease. *Am J Pathol* 2002, 160(4):1445-1455.
74. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG: A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 2000, 1(4):298-304.
75. Heydtmann M, Lalor PF, Eksteen JA, Hubscher SG, Briskin M, Adams DH: CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating

- lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver. *J Immunol* 2005, 174(2):1055-1062.
76. Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiya H, Yoshie O: Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* 1999, 29(2):633-642.
 77. Schutysse E, Struyf S, Van Damme J: The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, 14(5):409-426.
 78. Dellacasagrande J, Schreurs OJ, Hofgaard PO, Omholt H, Steinsvoll S, Schenck K, Bogen B, Dembic Z: Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6. *Scand J Immunol* 2003, 57(6):534-544.
 79. Afford SC, Fisher NC, Neil DA, Fear J, Brun P, Hubscher SG, Adams DH: Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 1998, 186(1):82-89.
 80. Pardigol A, Forssmann U, Zucht HD, Loetscher P, Schulz-Knappe P, Baggiolini M, Forssmann WG, Magert HJ: HCC-2, a human chemokine: gene structure, expression pattern, and biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(11):6308-6313.
 81. Lalor PF, Adams DH: Adhesion of lymphocytes to hepatic endothelium. *Mol Pathol* 1999, 52(4):214-219.
 82. Parker GA, Picut CA: Liver immunobiology. *Toxicol Pathol* 2005, 33(1):52-62.
 83. Calne RY: Immunological tolerance--the liver effect. *Immunol Rev* 2000, 174:280-282.
 84. Callery MP, Kamei T, Flye MW: The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding. *J Surg Res* 1989, 46(4):391-394.
 85. Huang L, Soldevila G, Leeker M, Flavell R, Crispe IN: The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1994, 1(9):741-749.
 86. Schlitt HJ, Kanehiro H, Raddatz G, Steinhoff G, Richter N, Nashan B, Ringe B, Wonigeit K, Pichlmayr R: Persistence of donor lymphocytes in liver allograft recipients. *Transplantation* 1993, 56(4):1001-1007.
 87. Dahmen U, Qian S, Rao AS, Demetris AJ, Fu F, Sun H, Gao L, Fung JJ, Starzl TE: Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice. *Transplantation* 1994, 58(1):1-8.
 88. Ferber I, Schonrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hammerling GJ, Arnold B: Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 1994, 263(5147):674-676.

89. Bertolino P, Heath WR, Hardy CL, Morahan G, Miller JF: Peripheral deletion of autoreactive CD8⁺ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *Eur J Immunol* 1995, 25(7):1932-1942.
90. Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA: Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000, 6(12):1348-1354.
91. Pape KA, Jenkins MK: A role for inflammatory cytokines in the productive activation of antigen-specific CD4⁺ T-cells. *Agents Actions Suppl* 1998, 49:23-31.
92. Watanabe T, Yoshida M, Shirai Y, Yamori M, Yagita H, Itoh T, Chiba T, Kita T, Wakatsuki Y: 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* 2002, 168(5):2188-2199.
93. Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW: Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000, 164(3):1346-1354.
94. Smedsrod B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC: Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J* 1990, 266(2):313-327.
95. Rubinstein D, Roska AK, Lipsky PE: Liver sinusoidal lining cells express class II major histocompatibility antigens but are poor stimulators of fresh allogeneic T lymphocytes. *J Immunol* 1986, 137(6):1803-1810.
96. Lohse AW, Knolle PA, Bilo K, Uhrig A, Waldmann C, Ibe M, Schmitt E, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde KH: Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 1996, 110(4):1175-1181.
97. Tokita D, Ohdan H, Onoe T, Hara H, Tanaka Y, Asahara T: Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 2005, 18(2):237-245.
98. Limmer A, Ohl J, Wingender G, Berg M, Jungerkes F, Schumak B, Djandji D, Scholz K, Klevenz A, Hegenbarth S *et al*: Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2005, 35:2970-2981.
99. Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW: Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-

- presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 1999, 116(6):1428-1440.
100. Wiegard C, Frenzel C, Herkel J, Kallen KJ, Schmitt E, Lohse AW: Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology* 2005, 42(1):193-199.
 101. Katz SC, Pillarisetty VG, Bleier JI, Shah AB, DeMatteo RP: Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J Immunol* 2004, 173(1):230-235.
 102. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY: Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo. *Science* 1990, 250(4988):1720-1723.
 103. Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR: Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 1998, 76(1):34-40.
 104. Robertson JM, Jensen PE, Evavold BD: DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* 2000, 164(9):4706-4712.
 105. Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia K, King JA, Smiley ST, Ling M, Gerard NP, Gerard C: Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 2000, 192(10):1515-1520.
 106. Sligh JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL: Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(18):8529-8533.
 107. Grusby MJ, Johnson RS, Papaioannou VE, Glimcher LH: Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 1991, 253(5026):1417-1420.
 108. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR: Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 1984, 99(6):2034-2040.
 109. Sorokin L, Girg W, Gopfert T, Hallmann R, Deutzmann R: Expression of novel 400-kDa laminin chains by mouse and bovine endothelial cells. *Eur J Biochem* 1994, 223(2):603-610.
 110. Wagner EF, Risau W: Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. *Semin Cancer Biol* 1994, 5(2):137-145.
 111. Rohnelt RK, Hoch G, Reiss Y, Engelhardt B: Immunosurveillance modelled in vitro: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium. *Int Immunol* 1997, 9(3):435-450.

112. Lyons AB, Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994, 171(1):131-137.
113. Klugewitz K, Topp SA, Dahmen U, Kaiser T, Sommer S, Kury E, Hamann A: Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into murine liver. *Hepatology* 2002, 35(3):568-578.
114. Feil C, Augustin HG: Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247(1):38-45.
115. Stryer L: Biochemie, 3 edn. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1994.
116. Lyck R, Reiss Y, Gerwin N, Greenwood J, Adamson P, Engelhardt B: T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells. *Blood* 2003, 102(10):3675-3683.
117. Male DK, Pryce G, Hughes CC: Antigen presentation in brain: MHC induction on brain endothelium and astrocytes compared. *Immunology* 1987, 60(3):453-459.
118. Vachiere N, Trap I, Totte P, Martinez D, Bensaid A: Inhibitory effect of *Cowdria ruminantium* on the expression of MHC class I and class II molecules on bovine endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1998, 849:181-187.
119. Inaba M, Toninelli E, Vanmeter G, Bender JR, Conte MS: Retroviral gene transfer: effects on endothelial cell phenotype. *J Surg Res* 1998, 78(1):31-36.
120. Penfold PL, Wen L, Madigan MC, King NJ, Provis JM: Modulation of permeability and adhesion molecule expression by human choroidal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, 43(9):3125-3130.
121. Knolle PA, Gerken G: Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000, 174:21-34.
122. Schütt B: Herstellung und histologische Charakterisierung endothelspezifischer monoklonaler Antikörper im Maussystem. *Medizinische Doktorarbeit*. Hamburg, 1992.
123. Marelli-Berg FM, Peek E, Lidington EA, Stauss HJ, Lechler RI: Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J Immunol Methods* 2000, 244(1-2):205-215.
124. Knook DL, Sleyster EC: Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Exp Cell Res* 1976, 99(2):444-449.
125. Beilhack A, Rockson SG: Immune traffic: a functional overview. *Lymphat Res Biol* 2003, 1(3):219-234.

126. Roth SJ, Carr MW, Rose SS, Springer TA: Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J Immunol Methods* 1995, 188(1):97-116.
127. Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM: Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol* 2000, 164(12):6550-6559.
128. Wetzell A, Chavakis T, Preissner KT, Sticherling M, Hausteiner UF, Anderegk U, Saalbach A: Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol* 2004, 172(6):3850-3859.
129. Reiss Y, Hoch G, Deutsch U, Engelhardt B: T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells. *Eur J Immunol* 1998, 28(10):3086-3099.
130. Johnson-Leger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA: Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood* 2002, 100(7):2479-2486.
131. Alenius E: Evaluation of human endothelial-like ECV304 cells and immortalized mouse brain endothelial bEnd5 cells in co-cultures with rat glioma C6 cells as in vitro models of the blood-brain barrier. *Examensarbeit*. Umeå, Schweden: Umeå Universitet; 2001.
132. Granholm S: Investigation of the expression of tight junctions and functional P-glycoproteins in two different in vitro models of the blood-brain barrier. *Examensarbeit*. Umeå, Schweden: Umeå Universitet; 2001.
133. Williams RL, Courtneidge SA, Wagner EF: Embryonic lethality and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell* 1988, 52(1):121-131.
134. Williams RL, Risau W, Zerwes HG, Drexler H, Aguzzi A, Wagner EF: Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell* 1989, 57(6):1053-1063.
135. Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hulténby K, Christensson B, Ericzon BG, Holgersson J *et al*: Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol* 2003, 163(4):1275-1289.
136. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM: Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005, 85(3):979-1000.

137. Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Cazaubon S, Strosberg AD, Couraud PO: Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem* 1994, 269(17):12536-12540.
138. Etienne S, Adamson P, Greenwood J, Strosberg AD, Cazaubon S, Couraud PO: ICAM-1 signaling pathways associated with Rho activation in microvascular brain endothelial cells. *J Immunol* 1998, 161(10):5755-5761.
139. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J: Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol* 1999, 162(5):2964-2973.
140. Ilan N, Mahooti S, Rimm DL, Madri JA: PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *J Cell Sci* 1999, 112 Pt 18:3005-3014.
141. Phillips R, Ager A: Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. *Eur J Immunol* 2002, 32(3):837-847.
142. Lalor PF, Edwards S, McNab G, Salmi M, Jalkanen S, Adams DH: Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* 2002, 169(2):983-992.
143. Bono P, Jalkanen S, Salmi M: Mouse vascular adhesion protein 1 is a sialoglycoprotein with enzymatic activity and is induced in diabetic insulinitis. *Am J Pathol* 1999, 155(5):1613-1624.
144. Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN: Selective retention of activated CD8⁺ T cells by the normal liver. *J Immunol* 1999, 163(6):3202-3210.
145. Emoto M, Mittrucker HW, Schmits R, Mak TW, Kaufmann SH: Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4⁺NKT cells. *J Immunol* 1999, 162(9):5094-5098.
146. Miyamoto M, Emoto M, Brinkmann V, van Rooijen N, Schmits R, Kita E, Kaufmann SH: Cutting edge: contribution of NK cells to the homing of thymic CD4⁺NKT cells to the liver. *J Immunol* 2000, 165(4):1729-1732.
147. Emoto M, Miyamoto M, Namba K, Schmits R, Van Rooijen N, Kita E, Kaufmann SH: Participation of leukocyte function-associated antigen-1 and NK cells in the homing of thymic CD8⁺NKT cells to the liver. *Eur J Immunol* 2000, 30(10):3049-3056.

148. Gilat D, Hershkovich R, Mekori YA, Vlodavsky I, Lider O: Regulation of adhesion of CD4⁺ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J Immunol* 1994, 153(11):4899-4906.
149. Amara A, Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, Virelizier JL, Delepiepierre M, Baleux F, Lortat-Jacob H *et al*: Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem* 1999, 274(34):23916-23925.
150. Rot A: In situ binding assay for studying chemokine interactions with endothelial cells. *J Immunol Methods* 2003, 273(1-2):63-71.
151. Hadley TJ, Peiper SC: From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 1997, 89(9):3077-3091.
152. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T: PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 2003, 198(1):39-50.
153. Onoe T, Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Hara H, Zhou W, Ishiyama K, Mitsuta H, Ide K *et al*: Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 2005, 175(1):139-146.
154. O'Farrelly C: Immunoregulation in the liver and its extrahepatic relevance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004, 39 Suppl 3:S727-728.
155. Datta T, Dormer P: Establishment of permanent chimerism in a lactate dehydrogenase-deficient mouse mutant with hemolytic anemia. *Exp Hematol* 1987, 15(11):1158-1162.
156. Tiberghien P, Longo DL, Wine JW, Alvord WG, Reynolds CW: Anti-asialo GM1 antiserum treatment of lethally irradiated recipients before bone marrow transplantation: evidence that recipient natural killer depletion enhances survival, engraftment, and hematopoietic recovery. *Blood* 1990, 76(7):1419-1430.
157. Jung U, Ley K: Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol* 1999, 162(11):6755-6762.
158. Fillatreau S, Gray D: T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation. *J Exp Med* 2003, 197(2):195-206.
159. Zhang X, Giangreco L, Broome HE, Dargan CM, Swain SL: Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *J Exp Med* 1995, 182(3):699-709.

160. Broeren CP, Wauben MH, Lucassen MA, Van Meurs M, Van Kooten PJ, Boog CJ, Claassen E, Van Eden W: Activated rat T cells synthesize and express functional major histocompatibility class II antigens. *Immunology* 1995, 84(2):193-201.
161. Mannie MD, Dawkins JG, Walker MR, Clayson BA, Patel DM: MHC class II biosynthesis by activated rat CD4+ T cells: development of repression in vitro and modulation by APC-derived signals. *Cell Immunol* 2004, 230(1):33-43.
162. Pichler WJ, Wyss-Coray T: T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1994, 15(7):312-315.
163. Chang CH, Hong SC, Hughes CC, Janeway CA, Jr., Flavell RA: CIITA activates the expression of MHC class II genes in mouse T cells. *Int Immunol* 1995, 7(9):1515-1518.
164. Marland G, Bakker AB, Adema GJ, Figdor CG: Dendritic cells in immune response induction. *Stem Cells* 1996, 14(5):501-507.
165. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA: Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004, 199:9-26.
166. Reichstetter S, Kwok WW, Kochik S, Koelle DM, Beaty JS, Nepom GT: MHC-peptide ligand interactions establish a functional threshold for antigen-specific T cell recognition. *Hum Immunol* 1999, 60(7):608-618.
167. Magnusson S, Berg T: Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells. *Biochem J* 1989, 257(3):651-656.
168. Ma W, Pober JS: Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1998, 161(5):2158-2167.
169. Richter A, Lohning M, Radbruch A: Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J Exp Med* 1999, 190(10):1439-1450.
170. Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN: Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol* 2002, 169(5):2407-2413.
171. Marelli-Berg FM, Hargreaves RE, Carmichael P, Dorling A, Lombardi G, Lechler RI: Major histocompatibility complex class II-expressing endothelial cells induce allospecific nonresponsiveness in naive T cells. *J Exp Med* 1996, 183(4):1603-1612.

-
172. Lodge PA, Haisch CE: T cell subset responses to allogeneic endothelium. Proliferation of CD8+ but not CD4+ lymphocytes. *Transplantation* 1993, 56(3):656-661.
 173. St Louis JD, Lederer JA, Lichtman AH: Costimulator deficient antigen presentation by an endothelial cell line induces a nonproliferative T cell activation response without anergy. *J Exp Med* 1993, 178(5):1597-1605.
 174. Page CS, Holloway N, Smith H, Yacoub M, Rose ML: Alloproliferative responses of purified CD4+ and CD8+ T cells to endothelial cells in the absence of contaminating accessory cells. *Transplantation* 1994, 57(11):1628-1637.
 175. Marelli-Berg FM, Scott D, Bartok I, Peek E, Dyson J, Lechler RI: Activated murine endothelial cells have reduced immunogenicity for CD8+ T cells: a mechanism of immunoregulation? *J Immunol* 2000, 165(8):4182-4189.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AcLDL	acetylated low density lipoprotein
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ArmH α M	Armenischer Hamster-anti-Maus
BD	Becton Dickinson
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2 (MCP-1)	monocyte chemoattractant protein-1
CCL3 (MIP-1 α)	macrophage inflammatory protein-1 α
CCL5 (RANTES)	regulated on activation, normally T-cell-expressed and -secreted
CCL15 (HCC-2, MIP-5)	human chemokine CC-2
CCL17 (TARC)	thymus and activation-regulated chemokine
CCL19 (ELC/MIP-3 β)	EBL-1-ligand chemokine
CCL20 (LARC/MIP-3 α)	liver and activation-regulated chemokine
CCL21 (SLC/6CKine)	secondary lymphoid tissue chemokine
CCL22 (MDC)	macrophage-derived chemokine
CD	cluster of differentiation
cDMEM	Komplett-DMEM
CFSE	5-, 6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
cRPMI	Komplett-RPMI
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen
CXCL8 (IL-8)	Interleukin-8
CXCL9 (Mig)	monokine induced by IFN- γ
CXCL10 (IP-10)	interferon-inducible protein 10
CXCL11 (ITAC)	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
CXCL12 (SDF-1 α)	stromal-cell-derived factor-1 α
CXCL16	Bonzo-Ligand/SexCKine
Cy5	Indodicarbocyanin
DAPI	Diaminophenylindol
DARC	Duffy antigen/receptor for chemokines
DCs	dendritische Zellen
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz-Detektionskanal eines best. Wellenlängenbereichs

FN	Fibronektin
FSC	Vorwärtsstreulicht
GAGs	Glykosaminoglykane
G _i	inhibitorisches G-Protein
GlyCAM	glycosylation-dependent cell adhesion molecule
G-Protein	GTD-bindendes Protein
HEV	high endothelial venules
i. v.	intravenös
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Ionomycin
IP3	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
KMCh	Knochenmarkschimären
LFA	leukocyte function-associated molecule
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	Leber-sinusoidale Endothelzellen
MACS	magnetische Zellsortierung
MadCAM	mucosal addressin adhesion molecule
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase
MEM NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
MHC	major histocompatibility complex
MHC-I	MHC-Klasse-I-Moleküle
MHC-II	MHC-Klasse-II-Moleküle
mLN	mesenteriale Lymphknoten
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
NK	natürliche Killerzelle
NPZ	nicht-parenchymatische Zellen
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweißalbumin)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K γ	Phosphatidylinositol-3-kinase γ
PLC	Phospholipase C
pLN	periphere Lymphknoten
PMA	Phorbol-Myristat Azetat
PSGL	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand
PTX	Pertussis Toxin

RαM	Ratte-anti-Maus
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SPF	spezifisch Pathogen-frei
SSC	Seitwärtsstreulicht
TNF	Tumor Necrosis Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
VAP	vascular adhesion protein
VCAM	vascular cell adhesion molecule

Danksagung

Ich danke Alf Hamann, der mir die Möglichkeit gab, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine stets offene Tür und Diskussionsbereitschaft schufen eine sehr angenehme, motivierende Arbeitsatmosphäre.

Besonders danke ich der „liver fraction“ der AG Hamann: Katja, die das Leber-Projekt leitet und meine Arbeit mit großem Engagement betreut hat, sowie Friderike und Katharina, die mir, wann immer es nötig war, praktische Unterstützung und seelischen Beistand geleistet haben.

Mein Dank gilt auch auch den übrigen Hamännern und -frauen, vor allem Uta H., Gudrun (a.D.) und Jochen H., die durch praktische Tipps und Denkanstöße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem danke ich den Labmanagern des DRFZ Tuula und den beiden Heidis, den FACS-Spezialisten Katharina und Toralf, den Admins Falk und Hilmar sowie Dörte, der Expertin für statistische Angelegenheiten.

Zum Abschluss Dank an Mathias, meine Familie und Freunde, die mich immer unterstützt haben.

Publikationsliste

Publikationen

Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN: Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol* 2002, 169(5):2407-2413.

Bertolino P, Schrage A, Bowen DG, Klugewitz K, Ghani S, Eulenburg K, Holz L, Hogg N, McCaughan GW, Hamann A: Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8⁺ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice. *Hepatology* 2005, 42(5):1063-1071.

Publikationen in Vorbereitung

Schrage A, Engelhardt B, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K: Liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) promote the transendothelial migration of T cells in response to chemokines by efficient surface presentation.

Schrage A, Eulenburg K, Kruse N, Blumenthal-Barby F, Knolle PA, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K: Non-professional antigen-presenting cells such as liver sinusoidal endothelial cells can prime naïve CD4⁺ T cells but fail to induce cytokine-producing effector cells.

Kongressbeiträge zum Thema „LSEC promote the transmigration of T cells“:

33. Jahrestagung der DGfI (Deutsche Gesellschaft für Immunologie) in Marburg (25.-28.09.2002): Posterpräsentation.

15th European Immunology Congress, EFIS2003 (European Federation of Immunological Societies), auf Rhodos (08.-12.06.2003), Griechenland: Posterpräsentation.

34. Jahrestagung der DGfI in Berlin (24.-27.09.2003): Posterpräsentation.

CIIS (Cellular Interactions in the Immune System) in Genf, Schweiz (17./18.04.2004): Posterpräsentation

GCC15th (Germinal Center Conference) in Potsdam (20.-24.04.2005): Posterpräsentation.

Satelliten-Symposium der DGfI-Studiengruppe Adhäsionsmoleküle in Kiel (20./21.09.2005): Vortragspräsentation.

Lebenslauf*Persönliche Angaben:*

Name: Schrage
Vorname: Arnhild
Geburtsdatum: 26.01.1976
Geburtsort: Lippstadt

Schulausbildung:

1982 – 1986 Niels-Stensen-Grundschule, Bad Waldliesborn
1986 – 1995 Marienschule (staatlich anerkanntes, privates Gymnasium), Lippstadt

Studium:

Okt. 1995 – März 1996 Lehramtsstudiengang Biologie und Mathematik für Sekundarstufe I/II an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
April 1996 – Feb. 2001 Diplomstudiengang Biologie (Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer: Botanik und Biochemie). Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchungen zum Einfluss des Caldesmons auf das endotheliale Aktomyosin-System“ (Betreuer: Prof. Dr. Volker Gerke), angefertigt am Institut für Medizinische Biochemie im Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung in Münster

Beginn der Promotion:

Sept. 2001 Beginn der Promotion mit dem Thema „Interaktion von T-Zellen mit sinusoidalen Endothelzellen der Leber“ bei Prof. Dr. Alf Hamann in der Experimentellen Rheumatologie, Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.