

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom- Biologe GERHARD WINGENDER
aus: Scheßlitz

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2003

Thema:

Immunbiologie hepatischer
Natürlicher - Killer T- (NKT-) Zellen

Gutachter: Prof. Dr. Günter J. Hämmerling
Prof. Dr. Percy A. Knolle

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Percy A. Knolle und Herrn Prof. Dr. Günter J. Hämmerling für das Interesse und die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und die Gutachten zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Percy A. Knolle für die Vergabe des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe. Ihm und Herrn Dr. Andreas Limmer bin ich zu großem Dank verpflichtet, für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und Beratung, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe(n) danken, insbesondere Frau Silke Hegenbarth, Frau Beatrix Schumak, Herrn Dominik Djandji und Tobias Schürle für die gute Zusammenarbeit während des Laboralltags und die Bereitschaft stets ein 'offenes' Ohr für meine Fragen und Problemen zu haben.

**„Die Wirklichkeit -
ein Messer ohne Klinge, am dem der Griff fehlt?“
(Paul Watzlawik)**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Index der Abbildungen und Tabellen	V
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	VII
1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1. Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2. Das adaptive Immunsystem	1
1.1.3. T - Zellen und ihre Aktivierung	1
1.1.4. Die Gedächtnisfunktion des adaptiven Immunsystems	3
1.2. Toleranz	4
1.3. Die lokale Immunregulation in der Leber	5
1.3.1. Das Sinusoid	5
1.3.2. Sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC)	6
1.3.3. Kupfferzellen	8
1.3.4. Dendritische Zellen der Leber	8
1.3.5. Leber assoziierte Lymphozyten (LAL)	9
1.4. Natürliche - Killer T- (NKT-) Zellen	10
1.4.1. Der Phänotyp der NKT - Zellen	10
1.4.2. Subklassen muriner NKT - Zellen	11
1.4.3. Physiologische und pathophysiologische Aktivitäten von NKT - Zellen	14
1.4.3.1. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei der Immunabwehr gegen Pathogene	15
1.4.3.2. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei der Tumorabwehr	16
1.4.3.3. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei Autoimmunerkrankungen	16
1.4.3.4. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei der Immuntoleranz	17
1.5. Fragestellung	19
2. Materialien	20
2.1. Allgemeine Laborgeräte	20
2.2. Verbrauchsmaterialien	21
2.3. Chemikalien, Reagenzien und Reaktionskits	22
2.4. Allgemeine Lösungen	24
2.5. Verwendete Marker, Enzyme und Zytokine	24
2.5.1. DNA - Molekulargewichtsmarker	24
2.5.2. Protein - Molekulargewichtsmarker	24
2.5.3. Enzyme und Enzyminhibitoren	24
2.5.4. Zytokine	25

2.6. Verwendete Antikörper, Streptavidin- und Fluorochromkonjugate	25
2.6.1. Antikörper gegen Oberflächenmarker und intrazelluläre Epitope	25
2.6.2. ELISA - Zytokineantikörper, Sekundär- und Isotyp - Kontrollantikörper	26
2.6.3. Streptavidinkonjugate und sonstige Fluorochrome bzw. Fluorochromkonjugate	26
2.6.4. Magnetischen Kügelchen ('MicroBeads')	26
2.7. Verwendete Plasmide und Bakterienstämme	27
2.8. Verwendete Zelllinien	27
2.9. Verwendete Mäusestämme	27
3. Methoden	28
3.1. Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1. Agarosegelelektrophorese von DNA	28
3.1.2. Herstellen von kompetenten prokaryotischen Zellen	28
3.1.3. Transformation prokaryotischer Zellen	28
3.1.4. Kryokonservierung von prokaryontischen Zellen	29
3.1.5. Plasmidpräparation durch alkalische Lyse	29
3.1.6. Photometrische Bestimmung der DNA - Konzentration	29
3.2. <i>In vivo</i> Probengabe und Gewinnung primärer Zellensuspensionen	30
3.2.1. <i>In vivo</i> Probengabe	30
3.2.2. Aufreinigung von Leukozyten aus Milz und Thymus	30
3.2.3. Aufreinigung von Lymphozyten aus Lymphknoten	30
3.2.4. Aufreinigung von Lymphozyten aus dem Knochenmark	30
3.2.5. Aufreinigung von Serum und Lymphozyten aus dem peripheren Blut	31
3.2.6. Aufreinigung primärer Zellen aus der Leber	31
3.2.6.1. Leberperfusion	31
3.2.6.2. Aufreinigung von Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) via Percollgradienten	31
3.2.6.3. Aufreinigung nicht-parenchymaler Leberzellen via Metrizamidgradienten	32
3.2.6.4. Aufreinigung von sinusoidalen Endothel- und Kupfferzellen via Gegenstromzentrifugation (Elutriation)	32
3.3. Zellkulturmethoden	32
3.3.1. Zellkulturen und ihre Propagation	32
3.3.2. Kultivierung primärer Zellen <i>in vitro</i>	33
3.3.3. Ermittlung von Zellkonzentrationen	33
3.3.4. Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	33
3.3.5. Magnetische Zellsortierung (MACS)	34
3.4. Proteinchemische Methoden	34
3.4.1. Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüber- ständen durch Affinitätschromatographie	34
3.4.2. Herstellung von MHC I - Tetrameren	34

3.4.2.1. Induktion von bakteriellen Einschlusskörperchen	35
3.4.2.2. Aufreinigung von bakteriellen Einschlusskörperchen	35
3.4.2.3. Faltung von MHC I - Monomeren	35
3.4.2.4. Aufreinigung von MHC I - Monomeren über ‘Fast Protein Liquid Chromatography’ (FPLC)	36
3.4.2.5. Multimerisierung von MHC I - Monomeren	36
3.4.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (1972)	36
3.4.4. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	36
3.4.5. Coomassie - Färbung der Polyacrylamidgelelektrophorese	37
3.4.6. Biotinylierung von Proteinen	37
3.4.7. Hematoxylin/Eosin (HE) - Färbung	38
3.5. Immunfluorometrische Methoden	39
3.5.1. Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer	39
3.5.1.1. Färbung von Oberflächenantigenen und Fixation	39
3.5.1.2. Färbung von intrazellulären Antigenen	40
3.5.1.3. Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen	40
3.5.1.4. Messung am Durchflusszytometer	40
3.5.2. Sandwich - ELISA	41
3.6. Statistische Analysen	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Aktivierung und Regulation von NKT - Zellen infolge α -CD3 Antikörper- gabe <i>in vivo</i> im Vergleich zu anderen Lymphozyten	42
4.1.1. Mechanismen der Aktivierbarkeit von NKT- und T - Zellen <i>in vivo</i> durch α -CD3 Antikörpergabe	42
4.1.1.1. <i>In vivo</i> Aktivierung von NKT- und T - Zellen durch α -CD3 Antikörper	42
4.1.1.2. Bindung von α -CD3 Antikörpern an NKT- und T- Zellen <i>in vivo</i>	48
4.1.1.3. Einfluss der α -CD3 Antikörpermenge auf die Frühphase der Aktivierung	50
4.1.1.4. Phänotyp der durch α -CD3 Antikörperinjektion <i>in vivo</i> aktivierten TCR α^+ NK1.1 $^+$ T - Zellen	50
4.1.1.5. <i>In vivo</i> Restimulation von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen durch intravenöse α -CD3 Antikörpergabe	52
4.1.1.6. Korrelation des T - Zellrezeptor assoziierten Adaptorproteins TRIM mit CD11a und IFN γ Produktion nach α -CD3 Antikörperinjektion	54
4.1.2. <i>In vivo</i> Dynamik der NKT - Zellverteilung	56
4.1.2.1. Aktivierte NKT- und T - Zellen akkumulieren in der Leber	56
4.1.2.2. Einfluss einer repetitiven intravenösen α -CD3 Antikörpergabe auf die NKT - Zellrepopulation	59

4.2. Tumor- und antigen - spezifische Zytotoxizität von NKT - Zellen in T - Zell- rezeptor transgenen Mäusen	62
4.2.1. Phänotyp und Aktivierbarkeit der OT-I NKT - Zellen	62
4.2.2. Tumor- und antigen - spezifische Zytotoxizität der V α 2V β ⁵⁺ NKT - Zellen	65
4.3. Die Interaktion von LSEC und NKT - Zellen und deren Folgen	67
4.3.1. Die Rolle der LSEC in der <i>in vivo</i> Aktivierung von NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen durch α -CD3 β Antikörper	67
4.3.2. Molekulare Voraussetzungen und Folgen der LSEC/NKT Zell- interaktion	73
4.3.2.1. LSEC exprimieren funktionell aktives CD1d	73
4.3.2.2. Folgen einer LSEC/NKT - Zellinteraktion	75
4.3.3. Die Rolle der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Toleranz- induktion durch LSEC <i>in vitro</i>	79
5. Diskussion	81
5.1. Mechanismen und Effekte einer <i>in vivo</i> NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T- Zellaktivierung infolge intravenöser α -CD3 β Antikörpergabe	81
5.1.1. Aktivierung von NKT- und NK - Zellen infolge der α -CD3 β Antikörperinjektion	81
5.1.2. Aktivierung von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen infolge der α -CD3 β Antikörperinjektion	83
5.1.3. <i>In vivo</i> Verteilung des intravenös injizierten α -CD3 β Antikörpers und die Rolle von Fc γ - Rezeptoren	86
5.1.4. Dynamik der NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellverteilung infolge der α -CD3 β Antikörperinjektion	88
5.1.5. Funktionelle Aspekte der α -CD3 β Antikörperinjektion	90
5.2. Tumor- und antigenspezifische Zytotoxizität von NKT - Zellen in T - Zell- rezeptor transgenen Mäusen	92
5.3. Die Interaktion von LSEC und NKT - Zellen und deren Auswirkung auf die Immunreaktion von T - Zellen	96
6. Zusammenfassung	101
7. Literaturverzeichnis	103

Index der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1. Schematische Darstellung des Sinusoids und des Phänotyp der sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und der NKT - Zellen	7
Abbildung 2. Intravenös Applikation von α -CD3 Antikörpern führt zu einer verminderten Oberflächenexpression des TCR auf NKT- und T - Zellen	43
Abbildung 3. Internalisierung des T - Zellrezeptors nach Stimulation und verbesserte Detektion durch intrazelluläre Färbung	44
Abbildung 4. Intravenös Applikation von α -CD3 Antikörpern führt zu einem aktivierten Phänotyp von NKT- und T - Zellen	46
Abbildung 5. Die Expression an CD69 und IFN γ auf Leber- und Milzlymphozyten nach α -CD3 Antikörpergabe <i>in vivo</i>	47
Abbildung 6. Die Bindung fluorochrom - markierter α -CD3 Antikörper an TCR γ ⁺ Lymphozyten <i>in vivo</i>	49
Abbildung 7. α -CD3 reaktive T - Zellen besitzen einen Phänotyp charakteristisch für Effektor- und Gedächtniszellen	51
Abbildung 8. Die intravenöse α -CD3 Antikörpergabe zur Restimulation von Effektor- und Gedächtnis- T - Zellen	53
Abbildung 9. Korrelation des Adaptorproteins TRIM mit CD11a und IFN γ Produktion nach α -CD3 Antikörperinjektion	55
Abbildung 10. NKT- und T - Zellen des peripheren Blutes akkumulieren in der Leber	57
Abbildung 11. Die Expression an CD69 und IFN γ auf Leber- und Blutlymphozyten nach α -CD3 Antikörpergabe <i>in vivo</i>	58
Abbildung 12. Die mehrmalige <i>in vivo</i> Gabe von 1 μ g α -CD3 Antikörper verändert die NKT - Zellreaktivität nicht	60
Abbildung 13. Der Phänotyp der OT-I NKT - Zellen	63
Abbildung 14. Aktivierung von OT-I NKT - Zellen durch α -CD3 Antikörpern <i>in vivo</i>	64
Abbildung 15. Zytotoxizität der OT-I NKT - Zellen	66
Abbildung 16. Die Bindung fluorochrom - markierter α -CD3 Antikörper an TCR/CD3 - Komplex negative Zellen <i>in vivo</i>	68
Abbildung 17. Die α -CD3 Antikörper vermittelte <i>in vivo</i> Aktivierung von NKT- und T - Zellen ist verzögert durch α -CD16/32 Antikörper	70

Abbildung 18. An LSEC und CD11b ⁺ CD11c ⁺ Milzzellen gebundene α -CD3 β Antikörper aktivieren NKT - Zellhybridome <i>ex vivo</i> und <i>in vitro</i>	71
Abbildung 19. Die Rolle verschiedener Fc γ - Rezeptoren bei der α -CD3 β Antikörper vermittelten Aktivierung von NKT- und T - Zellen <i>in vivo</i>	72
Abbildung 20. LSEC exprimieren CD1d	74
Abbildung 21. Mit α -GalCer beladenen LSEC aktivieren NKT - Zellhybridome CD1d abhängig	75
Abbildung 22. Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD106 auf LSEC nach Ko-Kultur mit Lymphozyten	76
Abbildung 23. Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und ICOS-L auf LSEC nach Ko-Kultur mit Lymphozyten	77
Abbildung 24. Expression des kostimulatorischen Moleküls CD154 auf NKT-Zellen bzw. NKT - Zellhybridomen nach Ko-Kultur mit LSEC	78
Abbildung 25. Leber assoziierte NKT - Zellen exprimieren konstitutiv ICOS	79
Abbildung 26. Die ICOS/ICOS-L Interaktion ist essentiell für die Toleranz-induktion von CD8 ⁺ T - Zellen durch LSEC	80
Tabelle 1. Subklassen muriner NKT - Zellen	12
Tabelle 2. Zusammensetzung der Polyacrylamidgelösungen	37
Tabelle 3. Vergleich der Aktivierung nach 1 μ g bzw. 100 μ g intravenöser α -CD3 β Antikörpergabe	50
Tabelle 4. Die mehrmalige <i>in vivo</i> α -CD3 β Antikörpergabe erhöht die NKT - Zellausbeute	59

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A

□	anti-, alpha
aa	Aminosäure
AA/Bis	Acrylamid - Bisacrylamid Lösung
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonsäure
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin, Antigen präsentierende Zelle (<i>'antigen presenting cell'</i>),
APS	Ammoniumpersulfat

B

□	beta
b	Base (n)
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>'bovine serum albumine'</i>)
BZR	B - Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise

C

C	Celsius
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen (<i>'cluster of differentiation'</i>)
cDNA	zu mRNA komplementäre DNA (<i>'copy DNA'</i>)
CFSE / CFDA-SE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester
cm	Zentimeter

D

D	Dalton (1D = 1,6601 x 10 ⁻²⁷ kg)
DC	Dendritische Zellen (<i>'dendritic cell'</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DMEM	<i>'Dulbeccos Modified Eagle Medium'</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>'desoxyribonucleic acid'</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>'EnzymeLinked Immonosorbent Assay'</i>
et al.	und andere (<i>'et alteres'</i>)

F

FACS	Durchflusszytometer (<i>'fluorescence activated cell sorter'</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>'foatale calf serum'</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G

g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
□-GalCer	□-Galactosylceramid
GBSS	<i>'Gey's Balanced Salt Solution'</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>'green fluorescent protein'</i>)

H

h	Stunde (<i>'hora'</i>)
---	--------------------------

HBV	Hepatitis B Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HindIII	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i> Rd com-10
I	
IFN	Interferon
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Int	intermediär (bezogen auf die Expression von Oberflächenmarkern)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
L	
l bzw. L	Liter
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	sinusoidale Endothelzelle der Leber (<i>'liver sinusoidal endothelial cell'</i>)
M	
μ	Mikro- (10^{-6})
m	Meter, Milli- (10^{-3})
M	Molar
mA	Milli-Ampere
mF	Milli-Farad
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>'magnetic activated cell sorter'</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>'major histocompatibility complex'</i>)
min	Minute
mRNA	Boten - RNA (<i>'messenger RNA'</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>'molecular weight'</i>)
N	
n	Nano- (10^{-9})
nt	Nukleotid bzw. Nukleosid
NK	Natürlicher Killer-
O	
o/n	über Nacht (<i>'over night'</i>)
OD _x	optische Dichte bei x nm
ODN	Oligodesoxynukleotid
OVA	Ovalbumin
P	
p	Piko- (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>'phosphate buffered saline'</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	<i>'potentia hydrogenii'</i>
PMA	Phorbol 12 -myristat 13-acetat
R	
RAG	<i>'Recombination - Activating Gene'</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>'ribonucleic acid'</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>'rotations per minute'</i>)
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde

s.	siehe
s.a.	siehe auch
SD	Standardabweichung (<i>'standard deviation'</i>)
SDS	Natriumdodezylsulphat (<i>'sodium dodecyl sulphate'</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>'standard error of the mean'</i>)
SLE	<i>'Systemic Lupus Erythematosus'</i>
T	
Tab.	Tabelle
TAE	Tris / Essigsäure (<i>'acetic acid'</i>) / EDTA
TCR	T - Zellrezeptor (<i>'T cell receptor'</i>)
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamin
T _h	CD4 ⁺ T - Helferzelle
TGF \square	Transformierender Wachstumsfaktor \square
TNF \square	Tumor Nekrose Faktor \square
TRIM	<i>'T cell receptor interacting molecule'</i>
Tris	Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan
U	
U	<i>unit</i> ; internationale Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
V	
V	Volt
vs.	versus
v/v	Volumenprozent
W	
w/v	Gewichtsprozent
Z	
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor eindringenden Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Parasiten) und deren Toxinen. Hierbei werden die erkannten Fremdstoffe (allg. Antigene) sowohl mit humoralen, als auch mit zellulären Mechanismen bekämpft.

1.1.1. Das angeborene Immunsystem:

Der phylogenetisch ältere Teil dieser Mechanismen, die sogenannte angeborene Immunität, wird im wesentlichen wahrgenommen durch Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen, dem Komplementsystem und bakteriziden Substanzen. Die Erkennung beruht hierbei auf einigen weitverbreiteten, konservierten Molekülen der Mikroorganismen (PAMPs)¹ mittels nichtpolymorpher Rezeptoren. Hierzu gehören z.B. die neun (Maus) bzw. zehn (Mensch) TLR - Rezeptoren², die insbesondere von Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert werden. Beispielsweise erkennt TLR3 virale dsRNA und TLR9 Oligonukleotidsequenzen, die in bakterieller DNA häufig sind (Medzhitov et al. 1997, 2000, 2002, Aderem et al. 2000, Hemmi et al. 2000, Akira et al. 2001, Alexopoulou et al. 2001). Die erkannten Pathogenmoleküle, die als Gefahrensignale (*'danger signals'*) für das Immunsystem angesehen werden können, aktivieren die Dendritischen Zellen bzw. Makrophagen (*'danger model'*, Matzinger 1994, Janeway 2001).

1.1.2. Das adaptive Immunsystem:

Vertebraten zeichnet darüber hinaus das elaborierte System der adaptiven Immunität aus, das von B- und T - Zellen gebildet wird. Die Antigenrezeptoren dieser Zellen gehen aus einem annähernd zufälligen Rekombinations- und Modifikationsprozess von genetischen Bausteinen hervor, wodurch die enorme Anzahl von 10^{11} - 10^{16} unterschiedlichen Rezeptorspezifitäten entstehen kann (Davies et al. 1988). Der B - Zellrezeptor (BZR) erkennt sein spezifisches Antigen in dessen natürlicher, dreidimensionaler Struktur, ohne vorausgehende Prozessierung. Dieser Rezeptor kann darüber hinaus in Form alternativer Spleißprodukte als lösliche Immunglobuline sezerniert werden.

1.1.3. T - Zellen und ihre Aktivierung:

Der $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor ($\alpha\beta$ TZR) hingegen erkennt Antigene nur im Kontext mit Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC)³. Diese MHC Moleküle binden Bruchstücke von prozessierten Proteinen, sogenannte Peptide, und 'präsentieren' diese an der Zelloberfläche den T - Zellen. Bei höheren Vertebraten gibt es zwei Klassen von MHC Molekülen, denen grob auch zwei Subtypen von T - Zellen zugeordnet werden können. MHC Klasse-I Moleküle

¹ engl.: *'pathogen associated molecular patterns'*

² engl.: *'toll like receptors'*, so bezeichnet aufgrund der Homologie mit dem Drosophila - Protein 'Toll' (Hoffmann et al. 1999)

³ engl.: *'major histocompatibility complex'*

finden sich auf der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen und präsentieren T - Zellen, die durch den Korezeptor CD8 ($CD8^+$) charakterisiert sind, Peptide zytosolischen Ursprungs. MHC Klasse-II Moleküle werden hingegen in der Regel nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie Dendritischen Zellen, Makrophagen und B - Zellen, konstitutiv exprimiert. Die präsentierten Peptide stammen hierbei von extrazellulären Proteinen, die über Endo- oder Phagozytose in die Zellen aufgenommen wurden und von den Korezeptor CD4 tragenden ($CD4^+$) T-Zellen erkannt werden. Diese Arbeitsteilung erlaubt somit einerseits dem MHC-I/CD8 Anteil das intrazelluläre Kompartiment und andererseits dem MHC-II/CD4 Anteil das extrazelluläre Kompartiment zu überwachen (Heath et al. 2001, Guermonprez et al. 2002).

Dendritische Zellen stellen den Prototyp der professionellen antigenpräsentierenden Zelle dar, da sie im besonderen Maße in der Lage sind Antigen zu präsentieren und T - Zellen zu aktivieren. So besitzen Dendritische Zellen die Fähigkeit exogen aufgenommene Antigene nicht nur auf MHC II, sondern auch auf MHC I Moleküle zu präsentieren (Bevan 1976, Staerz et al. 1987, Germain et al. 1994, Rock 1996, Rock et al. 1990, Carbone et al. 1998, Steinman et al. 2000, Heath et al. 2001). Dieser Mechanismus der sogenannten Kreuzpräsentation erlaubt somit die Induktion von $CD8^+$ T - Zellantworten gegen intrazelluläre Pathogene, wie z.B. Viren und Bakterien, ohne dass die antigenpräsentierende Zelle selbst infiziert werden müsste. Diese Kreuzpräsentation findet man hauptsächlich bei Dendritischen Zellen, aber vermutlich auch bei aktivierten Makrophagen (Reis e Sousa et al. 1995, Rock 1996, Heath et al. 2001), und bei B - Zellen für Antigene, die mittels des B - Zellrezeptors internalisiert wurden (Barnaba et al. 1990, Ke et al. 1996).

Die spezifische T - Zellrezeptor vermittelte Erkennung des MHC/Antigen - Komplexes reicht allerdings in der Regel nicht aus, um die T - Zelle zu aktivieren. Eine Zellstimulation zeigt sich an der Expression von Aktivierungsmarkern, wie z.B. CD69, und der Proliferation der Zelle. Eine aktivierte T - Zelle zeigt darüber hinaus Effektorfunktionen wie Zytokinproduktion ($CD4^+$ und $CD8^+$ T - Zellen) und Zytotoxizität ($CD8^+$ T - Zellen). Nach der 'Zwei Signal Theorie' benötigen naive T - Zellen zur vollständigen Aktivierung neben dem T - Zellrezeptor vermittelten Signal (Signal 1) noch ein weiteres Signal (Baxter et al. 2002). Dieses 'Signal 2' wird von kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen geliefert. Die einzelnen Elemente dieses 'Signal 2' setzen, weitgehend unabhängig voneinander (Gett et al. 2000), die Schwelle herab, die durch das erste Signal für eine Aktivierung gewährleistet werden muss (Viola et al. 1996, Lanzavecchia et al. 2000a, Germain 2001, Rosette et al. 2001).

Die kostimulatorischen Moleküle, wie z.B. CD28, CD40 und ICOS-Ligand, werden von den antigenpräsentierenden Zellen bereitgestellt. Hierbei handelt es sich meist um Dendritische Zellen, die die wichtigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen des Körpers sind. Als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem sind sie im gesamten Organismus verteilt, sammeln Antigene und liefern diese zur Präsentation für T - Zellen in die

lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten (Banchereau et al. 2000, Lanzavecchia et al. 2001, Guermonprez et al. 2002). Durch Gefahrensignale von Pathogenen aktiviert, exprimieren bzw. sezernieren Dendritische Zellen eine große Anzahl kostimulatorischer Signale. Hierdurch können sie effektiv naive T - Zellen aktivieren und die Art der Immunreaktion dirigieren (Lanzavecchia et al. 2001, Maldonado-Lopez et al. 2001)

Die aktivierten T - Zellen proliferieren und differenzieren zu Effektor - T - Zellen. Auch hierbei haben die kostimulatorischen Signale entscheidenden Einfluss darauf, wie schnell und zu welcher funktionellen Klasse die T - Zellen differenzieren. Die Summe der kostimulatorischen Signale bestimmt den Zeitraum bis zur ersten Zellteilung der T - Zelle, und darüber das Ausmaß der Proliferation (Gett et al. 1998, 2000). Die Art der Kostimulation hingegen entscheidet, welche Effektorfunktionen die aktivierten T - Zellen im Einzelnen ausbilden (Lanzavecchia et al. 2000a, 2000b, Pulendran et al. 2001, Murphy et al. 2002, Robinson et al. 2002). Vereinfacht dargestellt unterscheidet man T_{H1} - und T_{H2} -Immunantworten. Immunreaktionen gegen intrazelluläre und zelluläre Pathogene, sowie Tumoren zeichnen sich aus durch zytotoxische $CD8^+$ T - Zellen, und $CD4^+$ T - Zellen, die große Mengen an IFN γ und TNF α sezernieren. Wegen der Bezeichnung dieser $CD4^+$ T - Zellen als T_{H1} - Zellen spricht man auch von einer T_{H1} -Immunantwort. T_{H2} - Immunantworten hingegen richten sich vornehmlich gegen multizelluläre Pathogene, und sind gekennzeichnet durch $CD4^+$ T - Zellen, die große Mengen an IL-4 und IL-10 sezernieren.

Bedeutsam ist darüber hinaus, dass die Art der Kostimulation nicht allein die vollständige Aktivierung von T - Zellen gewährleistet, sondern auch entscheidend mitbestimmt, ob die stimulierten Zellen letztendlich funktionell inaktiv werden, oder auch ob sie regulatorische Funktionen ausführen. Neben kostimulatorischen Molekülen wurden in diesem Zusammenhang vornehmlich Zytokine, insbesondere TGF β und IL-10, beschrieben, die solche negativen bzw. regulatorischen Effekte fördern (Gorcynski et al. 1995, Groux et al. 1997, Steinbrink et al. 1997, Banchereau et al. 2000). Folglich dirigieren und modulieren die kostimulatorischen Signale die resultierende Immunantwort.

1.1.4. Die Gedächtnisfunktion des adaptiven Immunsystems:

Nach erfolgreicher Elimination des Pathogens ist die enorme Anzahl an Effektorzellen unnötig geworden und wird eliminiert (van Parijs et al. 1998, Homann et al. 2001, Sprent et al. 2001a, Badovinac et al. 2002, Barry et al. 2002, Fonteneau et al. 2002). Der dieser Elimination zugrunde liegende Mechanismus des programmierten Zelltodes (Apoptose⁴), ist der wichtigste Effektormechanismus zur Elimination autoreaktiver, seneszenten und irreparabel geschädigter Zellen im Organismus (Krammer 1999, 2000).

Bedeutsamerweise werden hierbei in der Regel nicht alle antigenspezifischen T - Zellen entfernt. Denn neben der angeführten Antigen-spezifität zeichnet sich das adaptive Immunsystem auch durch eine Gedächtnisfunktion aus. Um geben eine erneute Konfrontation mit

⁴ Von griechisch 'apo' (ab, weg, los) und 'ptosis' (Senkung), welches das Abfallen welcher Blätter bezeichnet (Kerr et al. 1972)

einem Pathogen besser gewappnet zu sein, bilden sich im Verlauf der primären Immunreaktion langlebige T - Zellen, die für die schnellere und stärkerer Immunreaktion im Verlauf der sekundären Immunantwort verantwortlich sind (Dutton et al. 1998, Sprent et al. 2001a, 2001b, 2002). Diese Gedächtnis- T - Zellen exprimieren Marker (CD11^{stark}, CD44^{stark}, CD62L^{schwach}), welche die vormalige Zellaktivierung anzeigen. Entscheidend ist, dass sie, aufgrund qualitativer Unterschiede zu naiven T - Zellen, bei einem erneuten Antigenkontakt keine oder nur geringe Kostimulation benötigen um in kurzer Zeit Effektorfunktionen, wie Zytokinproduktion und Zytotoxizität, zu übernehmen (Dutton et al. 1998, Cho et al. 1999, Sprent et al. 2001a, 2001b, 2002, Lanzavecchia et al. 2000b).

1.2. Toleranz

Die Zufälligkeit der T - Zellrezeptorentstehung und der Proteinprozessierung birgt die Gefahr der Bildung und Aktivierung von autoreaktiven Zellen, die Peptide körpereigener Proteine erkennen können. Um dies zu verhindern existieren komplexe Selektionsprozesse die solche Zellen eliminieren oder ruhigstellen. Man bezeichnet einen solchen Zustand, in dem das Immunsystem nicht gegen ein Antigen reagiert, allgemein als Toleranz (Arnold 2002).

Bei T - Zellen setzen diese Selektionsprozesse während der Reifung im Thymus ein.⁵ Nur solche reifen T - Zellen verlassen den Thymus, deren T - Zellrezeptor körpereigene MHC/Peptide Komplexe mit einer Affinität erkennt, die zu gering für eine Stimulation ist. Diese Toleranzinduktion während der Reifung bezeichnet man als zentrale Toleranz (Sprent et al. 2001c). Im Thymus können jedoch nicht alle autoreaktiven T - Zellen beseitigt werden, da einige gewebsspezifische oder erst später exprimierte Proteine, sogenannte Neoantigene, nicht oder nicht in ausreichender Anzahl im Thymus präsentiert werden können (Klein et al. 2000, Sprent et al. 2001, Kyewski et al. 2002). Demzufolge verlassen auch potentiell autoreaktive T - Zellen den Thymus und können in der Peripherie nachgewiesen werden (Lacour et al. 1990, Ota et al. 1990, Nossal et 1994). Somit müssen auch für reife T - Zellen periphere Selektionsmechanismen existieren, um eine Schädigung des Organismus durch solche autoreaktiven Zellen zu vermeiden. Diese Mechanismen werden unter dem Begriff der peripheren Toleranz zusammengefasst.

Darüber hinaus sind auch gegen eine Vielzahl von körperfremden Antigenen Immunreaktion 'unerwünscht'. Dies gilt ganz allgemein für Substanzen, die für den Körper nicht schädlich sind. Deshalb geht man inzwischen davon aus, dass das Immunsystem nicht primär nach den Kategorien "Körpereigen" und "Körperfremd" unterscheidet (Janeway 1992), sondern vielmehr nach potentiell "Schädlich" und "Unschädlich" ('*danger model*', Matzinger 1994, Janeway 2001). Zur letzteren Kategorie gehören in der Regel die mit der Nahrung aufgenommenen Nahrungsantigene. Damit in Einklang steht die Beobachtung, dass das Immunsystem gegenüber mit der Nahrung aufgenommenen Substanzen seine Reaktivität ver-

⁵ Die Reifung und Entwicklung im Thymus ist der historische Ursprung der Namensgebung der T- Zellen.

liert. Man spricht hierbei, als einer Sonderform der peripheren Toleranz, von der oralen Toleranz (Strobel et al. 1998, Smith et al. 2000).

1.3. Die lokale Immunregulation in der Leber

Seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts gibt es Hinweise, dass die Leber, neben ihren vielfältigen metabolischen Funktionen, auch an der peripheren Toleranz beteiligt ist. So werden allogene Lebertransplantate auch über MHC Barrieren hinweg im Allgemeinen gut akzeptiert (Cantor et al. 1967, Calne et al. 1969, Kamada et al. 1981). Gleiches gilt für andere Organe wie z.B. der Niere nicht, doch kann deren Akzeptanz verbessert werden, wenn das aus dem Transplantat abfließende Blut zunächst über die Pfortader durch die Leber geführt wird (Barker et al. 1967, May et al. 1969, Boeckx et al. 1975, Gorczynski et al. 1994, Gorczynski 1995). Im Einklang damit führt die intraportale Injektion, d.h. die Injektion in die Pfortader, von Antigenen zu einer systemischen, antigen - spezifischen Toleranz (May et al. 1969, Roland et al. 1993, Nakano et al. 1992, Gorczynski 1992, 1994, Gorczynski et al. 1994, 1995, 1996, 1998). Die Pfortader sammelt das venöse Blut des Magen - Darm Traktes und führt es in die Leber, in der die Hepatozyten die mitgeführten Nahrungsantigene metabolisieren. Die Präsenz von Nahrungsantigenen im portalvenösen Blut macht verständlich, warum die Induktion oraler Toleranz nicht allein auf das lokale Immunsystem des Gastrointestinaltraktes beschränkt bleiben kann. Verdeutlicht wird dies durch die Beobachtung, dass die direkte Einspeisung des portalen Blutes in den systemischen Kreislauf, zur Ausbildung einer systemischen Immunreaktion gegenüber oral applizierten Antigenen führen kann (Yang et al. 1994). Somit kann die Leber auch als zweite Linie in der Induktion oraler Toleranz angesehen werden (Knolle et al. 2003).

1.3. 1. Das Sinusoid:

An dieser Toleranzinduktion innerhalb der Leber, scheinen eine Reihe von hepatischen Zellen direkt oder indirekt, über die Schaffung eines tolerogenen Mikromilieus, beteiligt zu sein (Callery et al. 1989, Sriwatanawongsa et al. 1995, Bertolino et al. 1998, Thomson et al. 1999, Knolle et al. 2003). Die entscheidenden Prozesse scheinen hierbei in den Leberkapillaren, die als Sinusoide bezeichnet werden, abzulaufen.

In den Sinusoiden findet der Stoffwechselfaustausch zwischen Blut und den Hepatozyten statt. Die Hepatozyten machen mit 60% der Leberzellen und einem Durchmesser von ca. 30µm den Großteil des Lebergewebes aus (Knolle et al. 2003). Um deren metabolischen Funktionen zu gewährleisten, bedarf es einer umfangreichen und direkten Blutversorgung. Das in den Sinusoiden fließende Blut stellt hierbei eine Mischung aus dem venösen Pfortaderblut, mit einem Anteil von ca. 75%, und dem arteriellen Zustrom der Aorta hepatica (ca. 25%) dar. Rein rechnerisch durchfließt das komplette Blutvolumen des Körpers die Leber über 300mal pro Tag. Die Leber gleicht in ihrer Struktur einem Schwamm, in dem jeder Hepatozyt nur ein bis zwei Zellen von dem nächsten Blutgefäß entfernt liegt (Knolle et al. 2001). Die damit einher-

gehende enorme Auffächerung der Strombahn bedingt eine ungewöhnlich niedrige Stromgeschwindigkeit von 25-250 $\mu\text{m}/\text{sec}$ innerhalb des Sinusoids, im Vergleich zu anderen Kapillaren mit ca. 300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (MacPhee et al. 1992, 1995). Wegen dieser geringen Stromgeschwindigkeit und dem geringen Durchmesser des Sinusoids von 4-15 μm kann der Blutfluss durch eine Zellblockade kurzfristig sogar gänzlich zum Erliegen kommen (MacPhee et al. 1995). Diese physiologischen Eigenheiten des Sinusoids bedingen einen engen Kontakt zwischen den Zellen innerhalb des Sinusoids (s. Abb. 1). Neben Zellen des peripheren Blutes sind hierbei auch eine Reihe weitgehend residenter Zellpopulationen angesprochen.

1.3. 2. Sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC):

Die Sinusoide werden von den sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC)⁶ umschlossen (s. Abb. 1). Die LSEC stellen ca. 15% der Leberzellen (Braet et al. 2002, Knolle et al. 2003). Gleichwohl sie nur 2,8% zum Lebervolumen beitragen, repräsentieren sie über 20% der gesamten Zelloberfläche innerhalb der Leber. Im Gegensatz zu anderen Endothelien, mit Ausnahme des glomerulären Nierenendothels, verfügt das sinusoidale Leberendothel über keine Basalmembran und ist von Poren in der Zellmembran (Fenestrae) durchbrochen. Diese dynamischen Poren, mit einem Durchmesser von 100-175nm, nehmen 6-8% der Zelloberfläche ein (Wisse et al. 1985, Braet et al. 2002). Ein direkter Zell - Zellkontakt zwischen Zellen im Blutstrom und Hepatozyten besteht allerdings nicht (Limmer et al. 1998). Zwischen den LSEC und den Hepatozyten liegt ein 0,5-2 μm breiter Spaltraum, der Disse-Raum genannt wird.

Die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) tragen zu den metabolischen Aufgaben der Leber bei, indem sie mittels spezifischer Rezeptoren, wie z.B. L-SIGN und Mannose-Scavenger- und Fc -Rezeptoren, effektiv große Mengen an Antigenen aus dem Blut aufnehmen und via Transzytose an die Hepatozyten weiterreichen (Soda et al. 1984, Ukkonen et al. 1986, Tavassoli et al 1986, Kempka et al. 1988, Davidson et al. 1989, Magnusson et al. 1989, Smedsrod et al. 1990, Stang et al. 1990, Bogers et al. 1991, Rieder et al. 1992, Bashirova et al. 2001, Knolle et al. 2003). Die LSEC stellen den zahlenmäßig größten Anteil an den professionellen antigenpräsentierenden Zellen in der Leber dar (Knolle et al. 2003). Zur Erfüllung ihrer immunologischen Funktionen exprimieren die LSEC zum einen Zelladhensionsmoleküle, wie CD54 und CD106. Die Expression von Selektine, wie z.B. CD62E, ist im Sinusoid, im Gegensatz zu anderen Endothelien, aufgrund der langsamen Leukozytenpassage nicht vonnöten (Wong et al. 1997, Uhrig 1999). Zum anderen exprimieren die LSEC konstitutiv MHC I und II, sowie kostimulatorische Moleküle, wie CD80, CD86 und CD40 (Scoazec et al. 1991, 1994, Lohse et al. 1996, Knolle et al. 1999). Immunmodulatorisch bedeutend, produzieren LSEC eine Reihe von Zytokinen, z.B. TGF β , TGF α , IL-1, IL-6, IL-8, sowie NO und Prostaglandine (Rieder et al. 1990, Bissell et al. 1995, Knolle et al. 1995b, 2001, 2003, O'Farrelly et al. 1999).

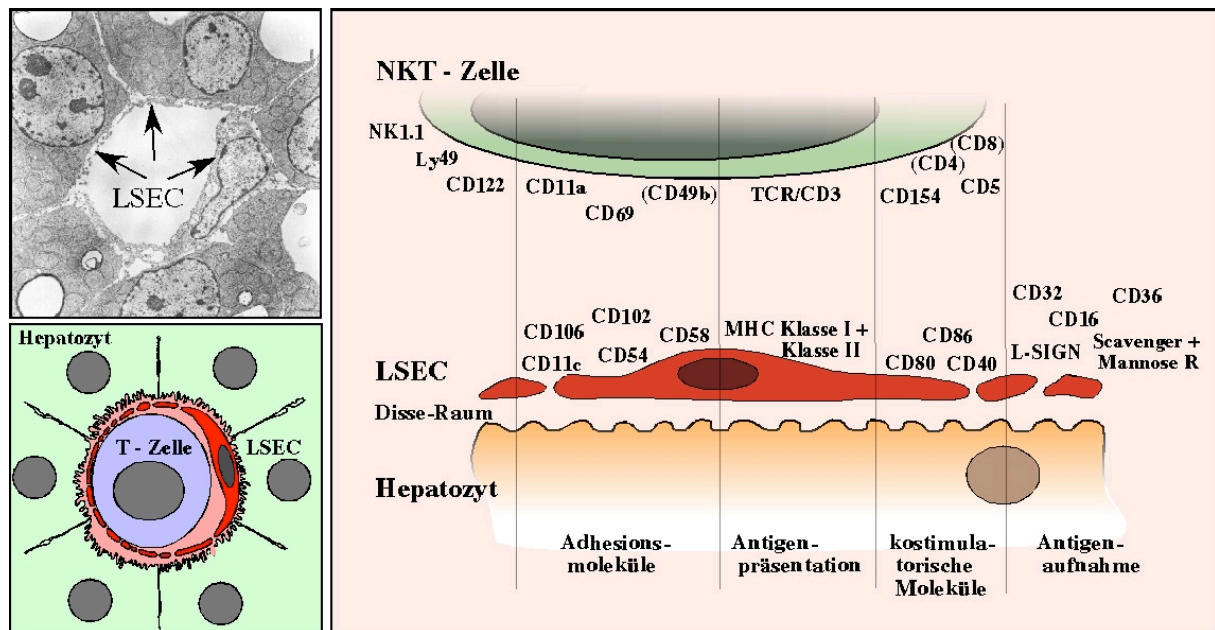


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Sinusoids und des Phänotyp der sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und der NKT - Zellen: (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Sinusoids, LSEC = sinusoidale Leberendothelzellen; (B) schematische Darstellung des Sinusoids, LSEC = sinusoidale Leberendothelzellen; (C) schematische Darstellung der sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) und der NKT - Zellen und der exprimierten Oberflächenmarker. Marker in Klammern () werden nur von einem Teil der NKT - Zellen exprimiert.

Wie eng immunologische und metabolische Funktionen der LSEC miteinander verwoben sind, wird deutlich, wenn man berücksichtigt, dass die endozytotisch aufgenommenen Proteinen von den sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) auch prozessiert, und Fragmente davon effizient auf MHC Molekülen T - Zellen präsentiert werden (Lohse et al. 1996, Knolle et al. 1999, Limmer et al. 2000). Dies geschieht hierbei nicht allein, dem konventionellen endozytotischen Weg folgend, auf MHC II Molekülen für $CD4^+$ T - Zellen, sondern darüber hinaus auch auf MHC I Molekülen (Kreuzpräsentation) für $CD8^+$ T- Zellen (Limmer et al. 2000). Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation wurde bislang nur für myeloide antigenpräsentierende Zellen, insbesondere Dendritische Zellen, beschrieben (z.B. Rock 1996, Kurts et al. 1997a, 1997b, Carbone et al. 1998, Sigal et al. 1999). Die Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation erfolgt durch LSEC konstitutiv und simultan (Knolle et al. 1999, Limmer et al. 2000). Dies steht im Gegensatz zu Dendritischen Zellen, die nach der Antigenaufnahme eine Reifungsphase durchlaufen, ehe sie das prozessierte Antigen präsentieren (Steinman et al. 1999, Mellman et al. 2001, Guermonprez et al. 2002).

Die Präsentation durch sinusoidale Endothelzellen (LSEC) kann naive T - Zellen, sowohl des $CD4^+$ als auch des $CD8^+$ Typs, antigen - spezifisch tolerisieren (Knolle et al. 1999, Limmer et al. 2000). Die tolerisierten T - Zellen proliferieren *in vitro* und *in vivo* (Lohse et al. 1996, Knolle et al. 1999, Limmer et al. 2000) und produzieren initial Zytokine, wie IFN γ und IL-2 (Knolle et al. 1999, Limmer et al. 2000). Nach einigen Tagen verlieren die T - Zellen aller-

⁶ engl.: 'liver sinusoidal endothelial cells'

dings diese Fähigkeit, im Gegensatz zu T - Zellen, die durch Dendritische Zellen aktiviert wurden (Limmer et al. 2000). Die resultierenden T - Zellen zeigen antigenspezifische Toleranz, gemessen an dem Verlust der Zytokinproduktion und Zytotoxizität (Limmer et al. 2000). Dem entsprechend kann *in vivo* ein antigenexprimierender Tumor nicht mehr abgestoßen werden (Limmer et al. 2000). Somit ist die Folge einer Antigenpräsentation durch sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) *in vitro* und *in vivo* die Induktion einer systemischen antigenspezifischen Immuntoleranz der T - Zellen.

1.3. 3. Kupfferzellen:

Kupfferzellen sind die gewebständigen Makrophagen der Leber. Sie repräsentieren 10-15% der Leberzellen, stellen aber rund 80% aller Gewebsmakrophagen des Körpers (Knolle et al. 2003). Sie exprimieren wie die LSEC eine Vielzahl an immunologisch relevanten Molekülen, unter anderem Scavenger- und Mannose - Rezeptoren, MHC-I und -II, CD2, CD80, CD54 und CD106 (Fleming et al. 1999). Kupfferzellen wandern aktiv (ca. 2µm/min) innerhalb des Sinusoids (MacPhee et al. 1992) und filtern dort Moleküle und partikuläre Substanzen aus dem Blut, wie z. B. LPS, LDL, und Immunkomplexe, sowie apoptotische, bakterielle und entartete Zellen (Moulder 1985, Roh et al. 1990, Gregory et al. 1992). Die Kupfferzellen stellen hierbei die einzige Leberpopulation dar, die zur Phagozytose (Partikel > 0,2µm) fähig ist (Steffan et al. 1986, Falasca et al. 1996).

Vermutlich sezernieren Kupfferzellen konstitutiv entzündungshemmenden Mediatoren wie TGFβ und IL-10 (Knolle et al. 1995a, 1998, 2000, Reiter et al. 1999). Dies mag erklären, dass die *in vivo* Depletion von Kupfferzellen die portal - venöse Toleranz beeinträchtigt (Callery et al. 1989, Kamei et al. 1990, Roland et al. 1993). Nach einer Aktivierung produzieren Kupfferzellen allerdings große Mengen an pro-inflammatorischen und antibakteriellen Substanzen, wie z.B. NO, Leukotriene, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IFNα, IFNγ, TNFα, TNFγ, H₂O₂, Prostaglandine und Thromboxane (McCuskey 1987, Winwood et al. 1993, Seki et al. 2000). Hierdurch und durch die antigenspezifische Aktivierung von T - Zellen (Rubinstein et al. 1987), beeinflussen Kupferzellen die Immunantwort in der Leber (Winwood et al. 1993, Perez et al. 1997).

1.3. 4. Dendritische Zellen der Leber:

Dendritische Zellen treten vermutlich kontinuierlich in Höhe des Sinusoid aus dem Blut in den Disse-Raum der Leber ein (Matsuno et al. 1996, Kudo et al. 1997). Diesen durchwandern sie entgegen der Stromrichtung des Blutes und gelangen schließlich, über sich anschließende lymphatische Gefäße, in die hepatischen und zöliakalen Lymphknoten (Matsuno et al. 1996, Kudo et al. 1997, Crispe et al. 2003). Die in der Leber konstitutiv vorhandenen endzündungshemmenden Zytokine, wie TGFβ und IL-10, induzieren toleriesierende Funktionen in Dendritischen Zellen (Groux et al. 1997, Steinbrink et al. 1997, Banchereau et al. 2000, Lanzavecchia et al. 2001).

1.3. 5. Leber assoziierte Lymphozyten (LAL):

Die Zusammensetzung der residenten Lymphozytenpopulation (LAL) in der Leber unterscheidet sich deutlich von Blut und anderen lymphoiden Organen, wie Milz oder Lymphknoten. Der Anteil der konventionellen NK - Zellen liegt mit ca. 20% höher als in lymphoiden Organen (Crispe et al. 1996, 2003, Norris et al. 1998, Mehal et al. 2001b). Innerhalb der konventionellen $\alpha\beta$ T - Zellen ist das Verhältnis von CD4 zu CD8 positiven Zellen in der Leber umgedreht zu demjenigen in lymphoiden Organen, demzufolge CD8⁺ T - Zellen überwiegen (CD4:CD8 in der Milz 1,8:1 und in der Leber 1:3,5) (Mehal et al. 2001b). Viele dieser Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp (d.h. CD25⁺ und CD69⁺) (Pruvot et al. 1995, Crispe et al. 2003).

Ein Teil dieser T - Zellen exprimieren geringere Konzentrationen des T - Zellrezeptors an der Oberfläche und meist den Marker CD45R (B220) (Crispe et al. 2000, 2003). Derartige Zellen sind apoptotisch, und apoptotische Zellen akkumulieren in der Leber (Huang et al. 1994b, Renno et al. 1996, Crispe et al. 2000). Für überalterte und überzählige Zellen wurde eine vergleichbare Akkumulation beschrieben. Diese Zellen werden anschließend in der Leber apoptotisch (Huang et al. 1994a, Crispe et al. 2000, Park et al. 2002). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Leber für die Beseitigung von überalterten und überzähligen Zellen zuständig ist ('graveyard hypothesis', Crispe et al. 2000, 2003, Mehal et al. 1999, 2001a, 2001b, Park et al. 2002).

Darüber hinaus finden sich innerhalb der leberassoziierten Lymphozyten ein ungewöhnlich hoher Anteil (10%) an $\alpha\beta$ T - Zellen und sogenannten unkonventionellen T - Zellen (Crispe et al. 1996, Mehal et al. 2001b). Letztere sind vornehmlich Natürliche - Killer T- (NKT-) Zellen, die etwa 25-30% der leberassoziierten Lymphozyten und ca. 40-50% der $\alpha\beta$ T - Zellen in der Leber ausmachen, was die höchste Konzentration dieser Zellen im Körper darstellt (verglichen mit 0,5-5% in allen anderen bislang untersuchten Organen) (Crispe et al. 1996, Bendelac et al. 1997, Mehal et al. 2001b, Kronenberg et al. 2002). NKT - Zellen zeigen phänotypische und funktionelle Gemeinsamkeiten sowohl mit Natürlichen - Killer (NK-) als auch mit konventionellen T - Zellen und schlagen hierdurch eine Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem.

1.4. Natürliche - Killer T- (NKT-) Zellen

1.4.1. Der Phänotyp der NKT - Zellen:

Natürlichen - Killer T- (NKT-) Zellen wurden erstmals als eigenständige Population erkannt, als auf einer Population CD4 und CD8 negativer (DN) $\alpha\alpha$ T - Zellen (Fowlkes et al. 1987, Crispe et al. 1987, Budd et al. 1987), die Expression des NK - Markers NK1.1 nachgewiesen wurde (Ballas et al. 1990, Sykes 1990). Die Koexpression des TCR/CD3 - Komplexes und des NK1.1 Markers diente seitdem als Surrogatmarker zur Detektion von NKT - Zellen. Beide Marker sind auf den NKT - Zellen schwächer (30-40%) exprimiert als auf konventionellen T- bzw. NK - Zellen (Bendelac et al. 1997), daher auch die gelegentliche Bezeichnung als TZR^{intermediäre} T - Zellen. Zur Charakterisierung der NKT - Zellen im Humansystem wurden meist die NK - Marker CD56 oder CD161 herangezogen (Bendelac et al. 1997, Exley et al. 1997, Ogasawara et al. 1998, Doherty et al. 1999). Im Folgenden wurden auf Teilen der NKT - Zellpopulation weitere Marker detektiert (s.a. Abb. 1), die für gewöhnlich eher auf T - Zellen (CD4, CD5, CD8) bzw. auf NK - Zellen zu finden sind (CD16; murin: Ly49 - Rezeptoren, asialo-GM1, DX5 (CD49b); human: KIR - Rezeptoren, CD161) (Bendelac et al. 1997, Exley et al. 1997, Ogasawara et al. 1998, Carnaud et al. 1999, Doherty et al. 1999, Eberl et al. 1999, Hammond et al. 1999, Ishihara et al. 1999). Folglich stehen die NKT - Zellen sowohl hinsichtlich ihrer phänotypischen, als auch ihrer morphologischen (Ohteki et al. 1992, Watanabe et al. 1995) Erscheinung zwischen klassischen T- und NK - Zellen.

Des Weiteren zeigen die meisten NKT - Zellen einen Phänotyp (CD11^{stark}, CD44^{stark}, CD62L^{schwach}, CD69^{stark}, CD122^{stark}), der eine vormalige Zellaktivierung anzeigt, und in der Regel mit Effektor- und Gedächtnis- T - Zellen in Verbindung gebracht wird (z.B. Bendelac et al. 1994, 1997, Godfrey et al. 2000, Kronenberg et al. 2002). NKT - Zellen produzieren rasch, in weniger als einer Stunde, nach einer Stimulation über den TCR/CD3 - Komplex, entweder durch α -CD3 α Antikörper (Yoshimoto et al. 1994, 1995a, 1995b, Eberl et al. 1998) oder durch den Liganden α -Galactosylceramid (α -GalCer) (Kawano et al. 1997), große Mengen Zytokine und entwickeln Zellzytotoxizität. Da hierbei sowohl T_{h1} Zytokine, wie z.B. IFN γ und TNF α , als auch T_{h2} Zytokine, wie z.B. IL-4 und IL-10, freigesetzt werden (Yoshimoto et al. 1994, 1995a, 1995b), wurde bereits früh eine Beteiligung der NKT - Zellen sowohl bei T_{h1}, als auch bei T_{h2} vermittelten Immunreaktionen vermutet (s. Abschnitt 1.4.3.). Interessanterweise können NKT - Zellen auch, wie für NK - Zellen beschrieben, durch die Zytokine IL-12 und IL-18 alleine, ohne Beteiligung des TCR/CD3 - Komplexes, stimuliert werden (Ogasawara et al. 1998, Dao et al. 1998, Leite-de-Moraes et al. 1999, 2001).

Bei einer eingehenden Analyse des T - Zellrezeptors zeigte sich, dass der überwiegende Teil der murinen NKT - Zellen eine invariante V α 14 - Kette exprimiert, in der das V α 14 - Element ohne die sonst üblichen N-Region Additionen oder Deletionen mit der J α 281 - Kette verknüpft ist (V α 14i). Darüber hinaus ist auch das V α - Repertoire eingeschränkt, und setzt sich fast vollständig aus einem von fünf V α - Ketten zusammen (mit V α 8.2 mit einem Anteil

von 55%) (Bendelac et al. 1994, 1997, Lantz et al. 1994, Makino et al. 1995, Kronenberg et al. 2002). Beim Menschen setzt sich der invariante T - Zellrezeptor der NKT - Zellen aus den zur Maus homologen Elementen (V α 24J α Q und V α 11) zusammen, was eine hohe evolutionäre Konservierung der NKT - Zellpopulation anzeigt (Bendelac et al. 1994, 1997, Lantz et al. 1994, Davodeau et al. 1997).

Nach ersten Hinweisen (Bix et al. 1993, Bendelac et al. 1994, Coles et al. 1994, Lantz et al. 1994, Adachi et al. 1995) erwies sich, dass diese V α 14i NKT - Zellen weder auf MHC I oder II, sondern auf das nicht - polymorphe MHC I homologe Molekül CD1d selektiert werden (Bendelac 1995, Bendelac et al. 1995), und deshalb in CD1d defizienten Tieren nicht vorhanden sind (Chen et al. 1997a, Mendiratta et al. 1997, Kawano et al. 1997). Die Gensequenzen für CD1D sind zwischen Maus und Mensch hoch konserviert (> 60%) und das Genprodukt findet sich neben hämatopoetischen Zellen, wie B-, T-, Dendritischen Zellen und Macrophagen (Brossay et al. 1997, Porcelli et al. 1999), auf intestinalen Epithelzellen (Maher et al. 1997), Hepatozyten (Brossay et al. 1997) und auf Keratinozyten (Bonish et al. 2000).

Bei den an CD1d gebundenen Antigenen handelt es sich interessanterweise nicht, wie bei MHC I oder II, um Peptidfragmente, sondern um Glycolipide (Kawano et al. 1997, Porcelli et al. 1999, Kronenberg et al. 2002). Diese binden mit ihren hydrophoben Seitenketten an CD1d (Zeng et al. 1997). Das bekannteste Beispiel eines entsprechenden Glycolipids ist das, ursprünglich aus einem Schwamm (*Agelas Mauritanicus*) aufgereinigte, α -Galactosylceramid (α -GalCer) (Morita et al. 1995). α -GalCer bindet sowohl an murines, als auch an humanes CD1d und stimuliert offensichtlich alle NKT - Zellen mit dem invarianten T - Zellrezeptor (V α 14J α 281 oder V α 24J α Q) (Kawano et al. 1997, Brossay et al. 1998a, Couedel et al. 1998, Spada et al. 1998, Burdin et al. 1999). Diese hochspezialisierte Interaktion zwischen CD1d und V α 14/24i NKT - Zellen erlaubt es dem Immunsystem somit innerhalb einer weiteren Stoffklasse, den Lipiden, nach Anzeichen von Pathogenen zu suchen. Weitere Glyco- und Phospholipide wurden als aktivierende CD1d Liganden vorgeschlagen (z.B. Burdin et al. 1998, Apostolou et al. 1999, Schofield et al. 1999, Gumperz et al. 2000), doch konnte bislang keiner dieser Liganden einem einzelnen T - Zellrezeptor zugeordnet werden. Deshalb wird derzeit in den meisten Untersuchungen α -GalCer zur NKT - Zellaktivierung verwendet.

1.4.2. Subklassen muriner NKT - Zellen:

Weitere Studien und die Verwendung von CD1d/ α -GalCer - Tetrameren zeigten bald, dass die V α 14i Zellen mit dem CD4 oder keinem (DN) Korezeptor lediglich die dominanteste Form der NKT - Zellen darstellen. Aufgrund des erkannten antigenpräsentierenden Moleküls, des verwendeten T - Zellrezeptors, und der Expression weiterer Oberflächenmarker werden derzeit meist vier Subklassen an NKT - Zellen unterschieden (s. Tab. 1).

	Kategorie I (V α 14i - Zellen)		Kategorie II	Kategorie III	Kategorie IV
	Ia	Ib			
TZR - Repertoire	V α 14J α 281 V α 8.1-3, V α 7, V α 2	Ibid.	Semi - divers: V α 3.2J α 9 oder V α 8 V α 8	divers	divers
Restriktivität	CD1d	Ibid.	CD1d	MHC I und evtl. weiteres	MHC I und II
Reaktivität / Agonist	α -GalCer (nach endosomalem Durchlauf)	Ibid.	unklar (kein endosomaler Durchlauf notwendig)	unklar	unklar
Korezeptoren	CD4 (\sim ² / ₃) oder DN (\sim ¹ / ₃)	Ibid.	CD4 oder DN	CD8 oder DN, selten CD4	CD4 oder CD8
NK - Marker	NK1.1 ⁺ (meist DX5 ⁻)	kein NK1.1 (meist DX5 ⁻)	NK1.1 ^{+/-}	NK1.1 und DX5 ^{+/-}	DX5 und NK1.1 ^{+/-}
Phänotypische Charakteristika		CD49d ⁺			
in vivo Lokalisation (und Häufigkeit)^(a)	Thymus (0,5-1,0%) [>90%], Leber (25-30%) [>90%], Milz (1,0-1,5%) [>60%], Knochenmark (0,5-1,0%), Lymphknoten (<0,5%)	Thymus [ca. 20%], Leber [ca. 20%], Milz [ca. 35%] Lymphknoten [ca. 75%], intraepitheliale Lymphozyten [ca. 80%], Knochenmark [ca. 20%]	Leber, Milz, (Thymus)	Milz, Knochenmark, (Leber)	Leber, Milz, Knochenmark
Referenz	Bendelac et al. 1997, Eberl et al. 1999, Hammond et al. 1999, 2001, Benlagha et al. 2000, Matsuda et al. 2000	Chui et al. 1999, Eberl et al. 1999, Benlagha et al. 2000, Hameg et al. 2000, Matsuda et al. 2000	Cardell et al. 1995, Behar et al. 1999b, 2000, Chui et al. 1999, 2001, Skold et al. 2000, Exley et al. 2001a, Park et al. 2001	Eberl et al. 1999, Hammond et al. 1999, 2001, Zeng et al. 1999b, Emoto et al. 2000, Exley et al. 2001a	Curnow et al. 1995, Schulz et al. 1996, Iwabuchi et al. 1998, Eberl et al. 1999, Hammond et al. 1999, 2001, Legendre et al. 1999, Zeng et al. 1999b, Gonzalez et al. 2001,

Tabelle 1. Subklassen muriner NKT - Zellen: Tabelle in Anlehnung an Kronenberg et al. (2002). (a) Die Zahlen in runden Klammern () geben die relative Häufigkeit der TCR/CD3⁺ NK1.1⁺ Zellen im jeweiligen Organ wieder (in %). Die Zahlen in eckigen Klammern [] geben in der Spalte 'Ia' den prozentualen Anteil an, den die CD1d/ α -GalCer - Tetramer positiven Zellen an den TCR/CD3⁺ NK1.1⁺ Zellen im jeweiligen Organ besitzen. In der Spalte 'Ib' geben sie den prozentualen Anteil an, den die NK1.1⁻ Zellen an den CD1d/ α -GalCer - Tetramer positiven Zellen im jeweiligen Organ besitzen (nach Matsuda et al. 2000).

Kategorie I: Die V α 14J α 281⁺ NK1.1⁺ T - Zellen, manchmal auch als klassische NKT - Zellen bezeichnet (Kronenberg et al. 2002, Taniguchi et al. 2003), stellen den größten Anteil der NKT - Zellen im Organismus und machen in den meisten Organen den größten Anteil aus. Sie sind CD4⁺ oder CD4⁻CD8⁻ (z.B. Bendelac et al. 1997), und tragen niemals CD8. Eine erzwungene Expression des Korezeptors CD8 in einem transgenen Modell bedingte ein vollständiges Fehlen der V α 14J α 281⁺ NK1.1⁺ NKT - Zellen (Bendelac et al. 1994, Lantz et al. 1994).

Die Analyse von Zellklonen (Chiu et al. 1999), die Reaktivität gegenüber α -GalCer (Hameg et al. 2000) und die Verwendung von CD1/ α -GalCer - Tetrameren (Benlagha et al. 2000, Matsuda et al. 2000) zeigte darüber hinaus, dass auch NK1.1⁻ T - Zellen existieren, die den

invarianten V β 14J α 281 T - Zellrezeptor tragen. Aufgrund des gemeinsamen invarianten T - Zellrezeptors, der gleichen Reaktivität gegenüber β -Galactosylceramid (β -GalCer), und der gemeinsamen Endstehung im Thymus (Tilloy et al. 1999, Gapin et al. 2001, Benlagha et al. 2002, Pellicci et al. 2002) werden NK1.1⁺ und NK1.1⁻ V β 14J α 281⁺ T - Zellen meist als V β 14i T - Zellen zusammengefasst (Kategorie I).

Veröffentlichungen, die neben der Endstehung von NKT - Zellen im Thymus, auch auf eine extrathymische Entwicklung hinweisen, wie z.B. innerhalb der Leber, beziehen sich wahrscheinlich auf V β 14i⁻ NKT - Zellen (Kategorie II - IV) (Kikly et al. 1992, Hashimoto et al. 1995, Kenai et al. 1995, Makino et al. 1995, 1996, Sato et al. 1995, Ohteki et al. 1996, Shimamura et al. 1997, 1999, Legendre et al. 1999, Zeng et al. 1999b, Abo 2000).

Der Anteil an V β 14i T - Zellen nimmt mit dem Alter zu (Vicari et al. 1996, Hammond et al. 1999). In der Maus gehören etwa 90% der NKT - Zellen in der Leber und im Thymus und etwa 60% in der Milz dieser Kategorie I an (Benlagha et al. 2000, Matsuda et al. 2000).

Kategorie II: Neben den V β 14i T - Zellen gibt es noch eine weitere Kategorie an CD1d restringierten NKT - Zellen, die nicht den V β 14J α 281 T - Zellrezeptor tragen. Deren T - Zellrezeptorrepertoire ist oligoklonal restringiert, mit einer deutlichen Präferenz für V β 3.2 und V β 8 in der Maus. Die erkannten Antigene sind derzeit noch weitgehend unklar, doch legt der hohe Grad an spontaner Autoreaktivität die Stimulation durch endogene Glykolipide nahe (Cardell et al. 1995, Couedel et al. 1998, Behar et al. 1999b, Chiu et al. 1999, 2001, Sköld et al. 2000, Exley et al. 2001a, Park et al. 2001). Kategorie II NKT - Zellen unterscheiden sich von V β 14i T - Zellen hinsichtlich des intrazellulären Weges, den das präsentierende CD1d Molekül durchlaufen haben muss. Während V β 14i T - Zellen ihr Antigen nur zu erkennen scheinen, nachdem CD1d das Endosom durchlaufen hat (Kawano et al. 1997, Spada et al. 1998, Prigozy et al. 2001, s. jedoch auch Burdin et al. 1998), sind Kategorie II NKT - Zellen darauf nicht angewiesen (Chiu et al. 1999, Jayawardena-Wolf et al. 2001)

Kategorie III + IV: Hierunter fasst man die CD1d unabhängigen, V β 14⁻ NKT - Zellen zusammen, die vornehmlich durch MHC I restringiert sind (Eberl et al. 1999, Hammond et al. 1999, 2001, Zeng et al. 1999b, Kronenberg et al. 2002). Zellen der Kategorie IV unterscheidet sich hierbei durch die Expression von DX5 (= CD49b, Arase et al. 2001) von denjenigen der Kategorie III (Kronenberg et al. 2002).

Diese CD1d unabhängigen NKT - Zellen besitzen ein polyklonales T - Zellrezeptorrepertoire und exprimieren häufig den CD8 Korezeptor (Eberl et al. 1999, Hammond et al. 1999, 2001, Zeng et al. 1999b). Die Antigenpezifität des T - Zellrezeptors ist weitgehend noch unklar. Interessanterweise wird der CD8 Korezeptor von NKT - Zellen überwiegend als CD8 $\alpha\alpha$ Homodimer exprimiert (Eberl et al. 1999, Hammond et al. 1999, 2001, Gumperz et al. 2002), und nicht als CD8 $\alpha\beta$ Heterodimer, wie auf konventionellen T - Zellen.

Allerdings ist innerhalb dieser beiden Kategorien die Trennung der NKT - Zellen von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen nurmehr schwierig ziehen, da bekannt ist, dass konventionelle T - Zellen nach Stimulation NK - Marker exprimieren können, wie z.B. α -asGM1 (Stein et al. 1978, Schwarting et al. 1980, Doherty et al. 1987), sowie NK1.1 und DX5 (Assarsson et al. 2000, Kambayashi et al. 2000, Slifka et al. 2000, McMahon et al. 2001, 2002).

Trotz der inzwischen wahrgenommenen Heterogenität der NKT - Zellpopulation, erscheint die Charakterisierung über den TCR/CD3^{intermediär} NK1.1⁺ Phänotyp auch weiterhin zulässig, da hierdurch in Thymus, Leber und Knochenmark über 90% und in Milz ca. 70-80% der NKT - Zellen detektiert werden können (Benlagha et al. 2000, Matsuda et al. 2000). Lediglich in Lymphknoten und innerhalb der intraepithelialen Lymphozyten liegt der Anteil vermutlich bei unter 60%.

1.4.3. Physiologische und pathophysiologische Aktivitäten von NKT - Zellen

Angesichts der schnellen Kinetik der Aktivierung, und der großen Menge und Diversität der daraufhin freigesetzten Zytokinen, sowie der funktionellen Ähnlichkeit sowohl mit NK-, als auch mit T- Zellen ist es verständlich, dass eine Vielzahl von Veröffentlichungen eine wesentliche Rolle von NKT - Zellen in der Frühphase vieler und verschiedenster Immunreaktionen berichten.

Hierbei nehmen die NKT - Zellen sowohl über die sezernierten Zytokine, als auch über direkten Zell - Zellkontakt Einfluss auf weitere Immunzellen. Bereits ein bis drei Stunden nach einer NKT - Zellaktivierung *in vivo* (via Zytokine, α -CD3 α Antikörper, α -GalCer) ist ein Anstieg der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69, auf NK-, T-, B - Zellen und Makrophagen zu beobachten (Burdin et al. 1999, Carnaud et al. 1999, Singh et al. 1999, Eberl et al. 2000, Nishimura et al. 2000). Während diese, vermutlich durch Zytokine vermittelte, Stimulation bei den T-, B - Zellen und Makrophagen beim Ausbleiben weiterer Signale nur transient ist, werden NK - Zellen funktionell aktiviert. Vornehmlich durch das von NKT - Zellen freigesetzte IFN γ (murin, Carnaud et al. 1999, Eberl et al. 2000, Kakimi et al. JEM2000, Hayakawa et al. 2001b, Smyth et al. 2002a) bzw. IL-2 (human, Metelitsa et al. 2001) aktiviert, sezernieren die NK - Zellen Zytokine, insbesondere IFN γ entwickeln Zytotoxizität und proliferieren. Hierdurch wirken die NK - Zellen nicht allein als induzierter Effektorarm der NKT - Zellaktivierung, sondern auch als massiver Verstärker des Signals.

Die Literatur zum Einfluss der von NKT - Zellen stammenden Zytokine auf die Differenzierung einer T - zellvermittelten Immunreaktion nach T_{h1} bzw. T_{h2} ist widersprüchlich. Klar ist, dass NKT - Zellen im Verlauf einer T_{h2} - Immunreaktion nicht erforderlich für einen effektiven Klassenwechsel der B - Zellen sind (Burdin et al. JI1998, Cui et al. 1999, Brown et al. 1996, Chen et al. 1997a, Guery et al. 1996, Mendiratta et al. 1997, Smiley et al. 1997, von der Weid et al. 1996, Zhang et al. 1996, s. jedoch Yoshimoto et al. 1995a, 1995b), ihre Stimulation allerdings die B - Zellproliferation und die Immunglobulinsekretion verstärkt (Singh et

al. 1999, Eberl et al. 2000). Für T - Zellen gibt es sowohl Beschreibungen, dass eine gleichzeitige NKT - Zellaktivierung zu einer T_{h1} - Immunreaktion führt (Denkers et al. 1996, Cui et al. 1999, Kitamura et al. 1999, Gonzalez-Aseguinolaza et al. 2002), als auch umgekehrt eine T_{h2} - Immunreaktion (Yoshimoto et al. 1995a, 1995b, Bendelac et al. 1996, Burdin et al. 1999, Singh et al. 1999, Hong et al. 2001, Sharif et al. 2001). Derzeit ist noch weitgehend unklar, welche Faktoren und Bedingungen, diese Unterschiede erklären. Tendenziell scheint eine einmalige Gabe von α -GalCer eine T_{h1}-, eine mehrmalige Gabe eine T_{h2} - Immunreaktion zu begünstigen.

Im Falle einer einmaligen Aktivierung mit α -GalCer zeigte sich, dass die antigenpräsentierende Zelle über IFN γ und/oder CD40/CD154 Interaktion mit den NKT - Zellen zur Produktion von IL-12 angeregt wird, welches wiederum die Aktivierung der NKT - Zellen verstärkt (Kitamura et al. 1999, Tomura et al. 1999, Nishimura et al. 2000, Pal et al. 2001, Smyth et al. 2002b). Auch eine Beteiligung der kostimulatorischen Moleküle CD28, CD80 und CD86 wurde bereits berichtet (Hayakawa et al. 2001a, Pal et al. 2001).

NKT - Zellen fungieren aufgrund ihrer schnellen Aktivierbarkeit, gekennzeichnet durch rasche Effektoraktivitäten in Form von Zytotoxizität und der Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen, als erste Verteidigungslinie des Immunsystems (*'first line of defence'*). Diese Wirkung erzielen sie meist nicht direkt, sondern über die Aktivierung weiterer Immunzellen, insbesondere NK - Zellen. Generell amplifizieren NK - Zellen das NKT - Zellsignal, und NKT - Zellen sind hierbei umso wichtiger, je schwächer das Ausgangssignal (z.B. IL-12) ist (Smyth et al. 2000c, 2002b, Brutkiewicz et al. 2002).

1.4.3.1. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei der Immunabwehr gegen Pathogene:

Viral infizierte Zellen sezernieren IFN α und IFN β als endogene Gefahrensignale, die NK- und NKT - Zellen aktivieren können (Biron et al. 2001, Hafner et al. 2001). Bereits deren freigesetzte Effektorzytokine IFN α und TNF α können die Replikation nicht - zytopathischer Viren, wie z.B. Hepatitis B, limitieren (Schofield et al. 1987, Ferreira et al. 1986, Guidotti et al. 1996a, 1996b, 1999a, 1999b, Chisari et al. 1997). Hinzu kommt eine gesteigerte Zytotoxizität beider Zellpopulationen, und die Unterstützung einer T_{h1} - Immunreaktion. Da NK - Zellen durch NKT - Zellen aktiviert werden können, lassen sich vergleichbare Ergebnisse mit einer NKT - Zellaktivierung erzielen. Folglich hat die intravenöse Gabe geringer Mengen α -GalCer, IL-18 oder von α -CD3 α Antikörper hat einen protektiven Effekt bei zeitlich nahe liegenden Virusinfektionen (Kast et al. 1990, Guidotti et al. 1995, Kakimi et al. 2000, Biron et al. 2001, Exley et al. 2001b, Kimura et al. 2002, van Dommelen et al. 2003). Auch ohne eine derartige Stimulation konnte die Beteiligung von NKT - Zellen an antiviralen Immunreaktionen nachgewiesen werden (z.B. Exley et al. 2001b, Baron et al. 2002, Grubor-Bauk et al. 2003).

Bei bakteriellen Infektionen wurden Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl und der Zytokinproduktion von NKT - Zellen beschrieben, und darüber hinaus ihr Einfluss auf die Induk-

tion sowohl einer T_{H1} (*Listeria monocytogenes*: Emoto et al. 1995, Flesch et al. 1997; *Mycobacterium bovis*: Emoto et al. 1997, 1999), als auch einer T_{H2} - Immunreaktion (*Salmonella spec.*: Enomoto et al. 1997, Naiki et al. 1999). So werden NKT - Zellen z.B. durch Membranlipide von Mycobakterien aktiviert und sind für die Granulombildung in Tuberkulose verantwortlich (Apostolou et al. 1999), auch wenn sie offensichtlich nicht für eine effektive Immunreaktion essentiell sind (Behar et al. 1999a).

Auch für Protozoeninfektionen gibt es Berichte, die zeigen, dass NKT - Zellen in der Frühphase einer protektiven Immunantwort entscheidend sind, und die T - Zell vermittelte Immunreaktion ausrichten und verstärken (*Leishmania major*: Ishikawa et al. 2000; *Toxoplasma gondii*: Denkers et al. 1996; *Plasmodium spec.*: Gonzalez-Aseguinolaza et al. 2000, 2002, Pied et al. 2000, Mannoor et al. 2001, Weerasinghe et al. 2001). Die Präsentation von GPI - verankerten Proteinen auf CD1d wurde hierbei zwar beschrieben (Schofield et al. 1999), konnte aber nicht reproduziert werden (Molano et al. 2000, Romero et al. 2001).

1.4.3.2. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei der Tumorabwehr:

NKT - Zellen sind zytotoxisch aktiv und ihre Beteiligung in der Tumorabwehr in unterschiedlichsten Modellsystemen ist vielfach belegt. In den meisten Studien wurden die NKT - Zellen stimuliert, um die Immunabwehr zu verbessern. Am häufigsten wurde hierfür α -Galactosylceramids (α -GalCer) (z.B. Natori et al. 1993, 1994, Morita et al. 1995, Nakagawa et al. 1998b, 1998a, 2001, Kawano et al. 1998, 1999, Kitamura et al. 1999, Toura et al. 1999, Ishihara et al. 2000, Metelitsa et al. 2001, Smyth et al. 2001a, Hayakawa et al. 2002) und IL-12 (z.B. Hashimoto et al. 1995, Anzai et al. 1996, Takahashi et al. 1996, Takeda et al. 1996, 2000, Cui et al. 1997, Kawamura et al. 1998, Smyth et al. 2000c) verwendet, aber auch α -CD3 α Antikörper (Ellenhorn et al. 1988, 1990) und immunstimulatorische Oligonukleotide (Hafner et al. 2001) kamen zum Einsatz. Offensichtlich bedarf es hierbei zur vollständigen Aktivierung der NKT - Zellen eines Zell - Zell - Kontaktes mit antigenpräsentierenden Zellen und deren induziertes IL-12 (Kitamura et al. 1999, Smyth et al. 2002a). Auch in diesem Falle folgt der frühen NKT - Zellaktivierung, nebst IFN γ - Freisetzung, eine Aktivierung der NK - Zellen, die nach ca. 24 Stunden für den Großteil der beobachteten Zytokinproduktion und Zytotoxizität verantwortlich sind (Nakagawa et al. 1998a, Smyth et al. 2002a, 2002b). Bedeutsam ist, dass auch eine wichtige Rolle von NKT - Zellen in der normalen Tumorabwehr ('*tumour surveillance*') belegt werden konnte (Nakamura et al. 1997, Smyth et al. 2000b, 2001b).

1.4.3.3. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei Autoimmunerkrankungen:

Bei eine Reihe von Autoimmunerkrankungen wurden Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl und der Zytokinproduktion von NKT - Zellen beobachtet, beispielsweise bei der rheumatischen Arthritis (Maeda et al. 1999, Kojo et al. 2001), Colitis (Saubermann et al. 2000),

EAE⁷ (Yoshimoto et al. 1995b, Illes et al. 2000, Gausling et al. 2001, Jahng et al. 2001, Singh et al. 2001), IDDM⁸ (Gombert et al. 1996a, 1996b, Baxter et al. 1997, Hammond et al. 1998, Wilson et al. 1998, Falcone et al. 1999, Naumov et al. 2001, Shi et al. 2001, Wang et al. 2001, Kukreja et al. 2002), Myasthenia Gravis (Nagane et al. 2001), Psoriasis (Bonish et al. 2000), Sclerosis (Sumida et al. 1995, 1998, Illes et al. 2000, Kojo et al. 2001) und SLE⁹ (Chen et al. 1997c, Zeng et al. 1998, 2000, Funauchi et al. 1999, Kojo et al. 2001). Meist ist jedoch unklar, ob diese Veränderungen Ursache oder Folge der Erkrankung sind.

Am klarsten ist die funktionelle Bedeutung der NKT - Zellen bei EAE und IDDM belegt. In beiden Fällen ließen sich die Krankheitssymptome verzögern und/oder lindern, wenn NKT - Zellen repetitiv mit α -GalCer stimuliert wurden (EAE: Singh et al. 2001; IDDM: Naumov et al. 2001, Sharif et al. 2001) oder, wenn man die NKT - Zellzahl in anfällige Tiere durch Transfer oder genetisch erhöhte (EAE: Lehuen et al. 1998, Mars et al. 2002; IDDM: Baxter et al. 1997, Hammond et al. 1998). Wesentlich hierfür scheint die Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-10 durch die NKT - Zellen zu sein (EAE: Miyamoto et al. 2001, Singh et al. 2001; IDDM: Baxter et al. 1997, Hammond et al. 1998, Hong et al. 2001, Naumov et al. 2001, Sharif et al. 2001).

1.4.3.4. Die Beteiligung von NKT - Zellen bei der Immuntoleranz:

Das Auge ist ein immunprivilegiertes Gewebe. Das Einbringen von Antigenen in die vordere Augenkammer führt zu einer systemischen Toleranz gegenüber dem Antigen. NKT - Zellen in der Milz sind für diese Toleranzinduktion (ACAID)¹⁰ essentiell (Streilein et al. 1993, Sonoda et al. 1999, 2002a, Faunce et al. 2001). CD1d defiziente Tiere sind ebenfalls defizient in ACAID und können durch Transfer von NKT - Zellen und CD1d⁺ antigenpräsentierenden Zellen 'geheilt' werden (Sonoda et al. 1999, 2002b). Vermutlich tragen die NKT - Zellen durch das sezernierte IL-10 und CCL5 (RANTES), sowie durch direkte Signale an die antigenpräsentierende Zelle zur Induktion von regulatorischen T - Zellen bei (Stein-Streilein et al. 2000, Faunce et al. 2001, 2002, Sonoda et al. 2001).

Auch bei der Akzeptanz und Toleranzinduktion gegenüber Transplantaten wurde eine Rolle für NKT - Zellen beschrieben (Ikehara et al. 2000, Chargui et al. 2001, Seino et al. 2001, Sharif et al. 2001). NKT - zelldefiziente Tiere zeigen keine bzw. eine deutlich schwächere Transplantatakzeptanz, die durch den Transfer von NKT - Zellen verbessert werden kann (Ikehara et al. 2000, Seino et al. 2001). Des Weiteren konnte die Überlebenszeit von Pankreastransplantaten durch die repetitive Gabe von α -GalCer verlängert werden (Sharif et al. 2001).

Die Daten hinsichtlich einer Beteiligung von NKT - Zellen an der oralen Toleranz sind widersprüchlich (Pro: Trop et al. 1999, Gotsman et al. 2000, Margenthaler et al. 2002; Contra: Ishimitsu et al. 2003). Vermutlich hängt es vom jeweiligen Antigen und seiner Zugänglichkeit

⁷ engl.: '*experimental allergic encephalomyelitis*'

⁸ engl.: '*insulin-dependent diabetes mellitus*'

⁹ engl.: '*systemic lupus erythematosus*'

¹⁰ engl.: '*anterior chamber - associated immune deviation*'

zum systemischen Blutkreislauf ab, inwiefern die, NKT - zellunabhängige, Toleranzinduktion innerhalb der darmassoziierten lymphoiden Geweben hinreichend ist.

Schließlich wurden auch in einigen weiteren Situationen Suppressoraktivitäten von NKT - Zellen nachgewiesen (Sykes et al. 1990, Tamada et al. 1997, Zeng et al. 1999a, Moodcliffe et al. 2000, Smyth et al. 2000a, Terabe et al. 2000, Lan et al. 2001).

Somit sind NKT - Zellen an Immunreaktionen beteiligt, die sowohl zu Immunität, als auch zur Toleranz führen. Somit scheinen NKT - Zellen mit darüber zu entscheiden, welche Immunreaktion unter gegebenen Bedingungen angemessen ist. Die Vielfalt der Aussagen über NKT - Zellen, und die Diversität der Immunreaktionen bei denen sie beteiligt sind, mag hierbei zum Teil auf gewebs- und organspezifische Unterschiede zurückzuführen sein, über die allerdings noch wenig bekannt ist.

1.5. Fragestellung

Das Mikromilieu der Leber induziert unter physiologischen Bedingungen systemische Immuntoleranz in CD4⁺ und CD8⁺ T - Zellen. Hierfür sind die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) maßgeblich mitverantwortlich. Trotz dieser tolerogenen Funktion finden effektive Immunreaktionen gegenüber Pathogenen und Tumoren innerhalb der Leber statt, die sowohl über lösliche Mediatoren, als auch über zytotoxische T- und NK - Zellen vermittelt werden.

Ungeklärt ist bislang, wie die Balance zwischen Toleranz und Immunität im lokalen Mikromilieu der Leber reguliert wird, und wie Immunreaktionen initiiert werden können. Insbesondere ist hierbei unbekannt, wie und durch welche Zellen im lokalen Immunsystem der Leber potentiell gefährliche Substanzen erkannt werden, wie die Entscheidung zwischen Toleranzinduktion und Immunreaktion getroffen wird, und welches die ersten Schritte sind, die zu einer Immunreaktion führen.

Natürlichen Killer T- (NKT-) Zellen scheint hierbei eine entscheidende Rolle zuzukommen. Für diese Annahme sprach einerseits die ungewöhnlich starke Präsenz der NKT - Zellen in der Leber, die dort 40-50% aller T - Zellen ausmachen. Andererseits zeigten eine Reihe von Veröffentlichungen, dass NKT - Zellen eine Vermittlerrolle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem zukommt, und sie folglich in der Frühphase einer Vielzahl von Immunreaktionen bedeutsam sind.

Ziel dieser Arbeit war deshalb, zum Verständnis der Rolle beizutragen, die NKT - Zellen innerhalb des immunologischen Mikromilieus der Leber spielen. Drei Schwerpunkte wurden hierzu im Einzelnen bearbeitet.

- (1) Wie verhalten sich NKT - Zellen während der frühen Phase einer Aktivierung durch den TCR/CD3 - Komplex oder durch Immunstimulantien? Die Reaktivität der NKT - Zellen und deren Auswirkung auf weitere Zelltypen wurde hierbei auf Einzelzellebene und Populationsebene *in vitro* und *in vivo* verfolgt.
- (2) Lassen sich NKT - zellvermittelt Immunreaktionen gegenüber Viren bzw. Tumoren in der Leber initiieren? Hierbei wurde unter anderem durch die Verwendung einer T - Zellrezeptor transgenen Maus versucht, Hinweise auf die Antigenpezifität von NKT - Zellen zu finden.
- (3) Welche Interaktionen, zellulärer oder humoraler Art, bestehen zwischen NKT - Zellen und weiteren sinusoidalen Zellen in der Leber? Insbesondere wurde hierbei die Interaktion zwischen sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und NKT - Zellen untersucht, und der Frage nachgegangen, ob NKT - Zellen einen Einfluss auf die Toleranzinduktion durch LSEC besitzen.

2. Material

2.1. Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaagen	‘U4100 – OD2.2’ und ‘MC BA 100’ (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Selectomat S2000 (von MMM, München)
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Bechergläser, Glas-	5ml, 10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 150ml, 250ml, 500ml, 1L, 2L (Schott, Mainz)
Bechergläser, Plastik-	Rotilabo 5ml, 10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 150ml, 250ml, 500ml, 1L, 2L 3L, 5L (neoLab, Heidelberg)
Brutschränke	Typ ‘B 5060 EC-CO2’ und ‘T 6030’ (Heraeus Instruments, Hanau) ‘CO2 Incubator MCO - 17AI’ (Sanyo, Japan)
Bunsenbrenner	Fireboy plus (Integra Bioscience, Fernwald)
Drucker	C720, Opra T 614, Phaser 750 und 4400DT (Lexmark, Dietzenbach)
Durchflusszytometer	FACScan und FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
Dynal MPC-L	(Dynal Biotech, Hamburg)
Einfriergerät, Kryo-	Qualifreeze (Nunc, Wiesbaden)
Eismaschinen	Scotsman® ‘MF-40’ und ‘B-550’ (Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien)
Elektrophoresekammern	Mini-Protean [®] II Cell (BioRad, München) ZMBH, Abt. Feinmechanik
Elektrophoresekammer, Flachgel-	ZMBH, Abt. Feinmechanik
ELISA - Lesegerät	Spectra MAX 250 (Molecular Devices, MWG BIOTECH, Ebersberg)
Erlenmeyerkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml (Schott, Mainz)
Gelfiltrationsapparatur	ÄktaExplorer (Amersham Pharmacia, Freiburg)
Gelfiltrationssäule	Superdex 75 Säule 20/60 (Amersham Pharmacia, Freiburg)
Geltrockner	Dual Temperature SLAB Gel Dryer, Model 1125B (Bio-Rad, München)
Gewindeflaschen	25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1L, 2L (Schott, Mainz)
Heizblöcke	Ori-Block DB-1 und DB-3 (Techne, Cambridge, UK)
Kamera	SC35/12 (Olympus, Hamburg)
Kühlaggregat	RT 100 Refrigerated Condensation Trap (Savant, Farmingdale, UK)
Kühlschränke (+4°C)	vario - cooler (Bosch, Stuttgart) 2021 Maxicoldlab (LKB Bromma, Cambridge, UK)
Kühlschränke (-20°C)	economic, economic - froster, Froster - 720 und GS 52 A (Bosch, Stuttgart)
Kühlschränke (-70°C)	Modell Nr. TC 213-1 (Tritec, Hannover) Advantage (Nunc, Wiesbaden) ULT Freezers Model 917 (Forma Scientific via ThermoLife Science, Egelsbach)
MACS - Gerät	vario MACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	IKAMAG RET-GS und RCT (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.)
Messkolben	10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1L (Schott, Mainz)
Messzylinder	Rotilabo 50ml, 100ml, 500ml, 1L (Roth, Karlsruhe)
Mikroskope	DM RD + DM RXE (Leica Instruments, Nussloch)
Küvette, Quarzglas-	10mm Suprasil (Hellma, Müllheim)
Kyrostat	2800 Frigocut N (Reichert-Jung, Nussloch)
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Nunc-Immuno [™] Wash12; Nunc Brand Products (Nalge Nunc International, via neoLab, Heidelberg)
Mikrowellenofen	HMT 8620 (Bosch, Stuttgart)
Netzgeräte	Model 200/2.0, Model 1000/500 und Power Pack 200 (Bio-Rad, München) 2297 Macrodrive 5 (LKB Biotechnology AB, Bromma, Sweden) ST 504 (Gibco BRL, Karlsruhe)
pH – Meter	pH 523 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim)
Pipetten	0,2-2 μ l, 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-100 μ l, 30-200 μ l, 200-1000 μ l (Gilson via neoLab, Heidelberg) Multipette [®] plus (Eppendorf, Hamburg) 12-Kanal-Pipetten: 25-200 μ l (Abimed, München) und 10-200 μ l (Dunn Labortechnik)
Pipettierhilfen	pipetboy acu (Integra Bioscience, Fernwald) pipetus - akku (Hirschmann Labortechnik, Eberstadt)
Pumpen	Type MZ 2C (vacuubrand, Wertheim) Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company via Novodirect, Kehl/Rhein)

Reinstwasseranlage	MS-4 Reglo (Ismatec, Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld) 'Milli - Q', Reagent Grade Water System (Millipore via membraPure, Membrantechnik, Reinstwasser, Bodenheim)
Rollenmischer	'M 5' und 'ST5 CAT' (neoLab, Heidelberg)
Rotoren	Sorvall GSA, HB-4 und HB-6 (Du Pont Instruments, Bad Homburg v.d.H.) 'JE-6B' (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof)
Schüttelinkubator	'RC-2-U Pilot Shaker' (Adolf Kühner AG, Apparatebau, Basel, Schweiz über Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)
Schüttler, horizontal	'Rollordrum', Modell TC-7 (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, New Jersey, USA)
Schüttler, Roll-Siebe, Metall-Sonifikator	ZMBH, Abt. Feinmechanik
Sonifikator, Stab-Spektralphotometer	ZMBH, Abt. Feinmechanik Transsonic T300 (Elma, Singen, Htw.) Ultrasonic Homogenizer, Model 300 (BioLogics, Gainesville, VI, USA) Ultraspec 3000 UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia, Freiburg)
Stickstofftank	Ultraspec II Model 4050 (LKB Biochrom, Cambridge, UK)
Tischschüttelgerät	MVE XLC 810HE und EN1251 (Chart Industries, Canton, Georgia, USA) MS-1 Minishaker und VF2 (IKA - Labortechnik, Staufen i.Br.) Reax2000 (Heidolph, Kehlheim)
UV-Beleuchtungstisch	Spectroline, Model TL-312A, Transilluminator, 312nm (Fisher Scientific, Nidderau)
Wasserbäder	minitherm 1 (Dinkelberg - Labortechnik, Neu-Ulm) Type 1012 (Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel) ZMBH, Abt. Feinmechanik
Wasserbad, Schüttel-Werkbank, steril	1092 (Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel) Steril Gard Hood (the Baker Company, Inc., Sanford, Maine, USA via Labotec, Labor - Technik, Göttingen)
Zählkammer	Lamin-Air (Heraeus, Hanau)
Zentrifugen	Neubauer 'improved' (la fontaine über Labotec, Labor - Technik, Göttingen) Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments, Bad Homburg v.d.H.) Elutriator Avanti J-25 I (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof) Cryofuge 6-4, Variofuge 3.0R, Biofuge A Typ 1230 und Omnifuge 2.0 RS (Heraeus Instruments, Hanau)

Alle weiteren Labormaterialien wurden über die Firmen neoLab (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21x26mm (Menzel - Gläser über neoLab, Heidelberg)
Dialyseschlauch	'spectrapor', Ausschlussgröße 500D (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA via MembraPure, Bodenheim)
Dispensertips	1,25ml, 2,5ml und 5ml (Labotec, Labor - Technik, Göttingen)
Einmalröhrchen, Polypropylen-	12/75mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen) Falcon 2053 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Einmalröhrchen, Polystyren-	6,0/38mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen, #101101)
Einmalröhrchen, Polystyrol-	18/95mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Filterpapier	Whatmann, 3 MM (Labotec, Labor - Technik, Göttingen) 597 1/2 folded filters Ø240mm (Schleicher & Schuell, Dassel)
Fotofilme	667 B&W Instant Pack Film (Polaroid, Offenbach)
Gewebskulturschalen	94/16mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Glaskanülen, heparinisiert	Mikro-HK- Kapillaren (Heiland, Hamburg)
Handschuhe, Einmal-Kanülen	S, M, L (SafeMed, Willishalten und Hakle-Kimberly, Koblenz) 0,3x13mm, 30G, 0,4x19mm, 27Gx ³ / ₄ " , 0,45x25mm, 26Gx1" , 0,9x40mm, 20Gx1 ¹ / ₂ " , 0,9x70mm, 20Gx2 ³ / ₄ " (B.Braun, Melsungen)
Konzentrationssäulen	'centriplus YM30', Ausschlussgröße 30kD (Amicon über Millipore, Eschborn)
Kryoröhrchen	1ml (Nunc, Wiesbaden)
Kyrostat- Kleber	'Eukitt' Mounting Medium (Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA, USA)
MACS - Säulen	MS ⁺ und VS ⁺ (Miltenyi, Bergisch Gladbach)

MACS - Auffanggefäße	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Meßpipetten	2ml, 5ml, 10ml, 25ml, (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch (Nunc, Wiesbaden und Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Objektträger	76 x 26mm (IDL, Nidderau) 'SuperFrost Plus' (Menzel-Gläser via NeoLab)
Parafilm	Parafilm „M“® (American National Can TM, Greenwich, CT, USA via neoLab, Heidelberg)
Pasteurpipetten	150mm, 230mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischale	10 cm Ø (Sahrsted, Nümbrecht)
pH - Indikatorstäbchen	pH 6,5-10,0 und pH 0-6 (Merck, Darmstadt)
Pipettenspitzen	Standartips 10µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Hamburg und Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
Präparierbesteck	Labotec, Labor - Technik, Göttingen
Protein A Säule	Econo-Pac Protein A Columns (BioRad, München)
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2,0ml (Eppendorf, Hamburg) 1,5ml mit Schraubverschluss (Sarstedt, Nümbrecht, # 72.692)
Siebe, Nylon-	'Cell Strainer', 30µm, 70µm und 100µm (Becton Dickonson, Heidelberg)
Skalpelle	Präzisa (Dahlhausen Medizin - Technik, Köln)
Sterilfilter	0.2µm (Schleicher & Schuell, Einbeck)
Sterilfilter, Flaschen-	'Tissue Culture Filter Units' 150ml, 500ml, 1000ml (Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturflaschen	25cm ² , 80cm ² , 175cm ² , 500cm ² (Nunc, Wiesbaden)
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen) 200ml (Nunc, Wiesbaden), 250ml (Corning, Bodenheim)

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien wurden über die Firmen Roth (Karlsruhe), neoLab (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2.3. Chemikalien, Reagenzien und Reaktionskits

AA/Bis (Acrylamid - Bisacrylamid - Fertiglösung, 30%)	(Roth, Karlsruhe)
ABTS	(Sigma, Deisenhofen)
Accutase	(PAA, Cölbe)
Actinomycin D (C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆ , MW = 1255)	(Sigma, Deisenhofen)
Agarose	(Gibco BRL, Karlsruhe)
L-Alanin (C ₃ H ₇ NO ₂ , MW = 89,09)	(Sigma, Deisenhofen)
Albumin, Rinderserum- (BSA)	(Serva, Heidelberg)
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl, MW = 53,49)	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , MW = 228,2)	(BioRad, München)
Ampicillin (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ SNa, MW = 371,4)	(Sigma, Deisenhofen)
L-Asparagin (C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ , MW = 132,1)	(Merck, Darmstadt)
BM Blue Soluble	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Bradford - Reagenz	(BioRad, München)
BrdU (C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₅ , MW = 307,1)	(Sigma, Deisenhofen)
Brefeldin A (C ₁₆ H ₂₄ O ₄ , MW = 280,4)	(Sigma, Deisenhofen)
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S, MW = 670,0)	(Sigma, Deisenhofen)
Calciumchlorid (CaCl ₂ • 2H ₂ O, MW = 147)	(Merck, Darmstadt)
Carbenicillin (C ₁₇ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₆ S, MW = 422,4)	(Sigma, Deisenhofen)
Chloramphenicol (C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅ , MW = 323,1)	(Sigma, Deisenhofen)
CFSE / CFDA-SE (5- und 6- Gemisch, C ₂₉ H ₁₉ NO ₁₁ , MW = 557,47)	(Molecular Probes, Leiden, Niederlanden)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (MW = 826,0)	(BioRad, München)
Diethylpyrocarbonate (DEPC) (C ₆ H ₁₀ O ₅ , MW = 162,1)	(Sigma, Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO) ((CH ₃) ₂ OS, MW = 78,13)	(Merck, Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ , MW = 142,0)	(Merck, Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ , MW = 154,2)	(Sigma, Deisenhofen)
DMEM - Medium	(Seromed, Berlin)
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂ , MW=60,05)	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol, absolut (C ₂ H ₅ OH, MW = 46,07)	(Riedel-de Haën, Seelze)

Ethidiumbromidlösung, 1% (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br, MW = 394,3)	(Fluka über Sigma, Deisenhofen)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ • 2H ₂ O, MW = 372,2)	(Gerbu, Gaiberg)
Fötale Kälberserum (FCS)	(PAA, Cölbe)
Fötale Kälberserum (low LPS, low IgG) (FCS ^{-LPS})	(PAN Biotech, Aidenbach)
Formalin; Formaldehyd (HCHO, MW = 30,03)	(Merck, Darmstadt)
D ⁽⁺⁾ -Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ , MW = 180,2)	(Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin (200mM) (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ , MW = 146,1)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂ , MW = 75,07)	(Sigma, Deisenhofen)
Glyzerin (C ₃ H ₈ O ₃ , MW = 92,09)	(Merck, Darmstadt)
Hefeextrakt	(Difco Laboratories, Augsburg)
Heparin	(Amersham Pharmacia, Freiburg)
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S, MW = 238,3)	(Gerbu, Gaiberg und Sigma, Deisenhofen)
N-Hydroxysuccinimidobiotin (C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₅ S, MW = 341,4)	(Sigma, Deisenhofen)
IPTG (C ₉ H ₁₈ SO ₅ , MW = 238,3)	(Sigma, Deisenhofen)
Isopropanol ((CH ₃) ₂ CHOH, MW = 60,1)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumacetat (KC ₂ H ₃ O ₂ , MW = 98,14)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl, MW = 74,55)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃ , MW = 100,12)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄ , MW = 174,2)	(Sigma, Deisenhofen)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ , MW = 136,09)	(Gerbu, Gaiberg)
Kalziumchlorid (CaCl ₂ , MW = 147,0)	(Sigma, Deisenhofen)
Kanamycin A (C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ • H ₂ SO ₄ , MW = 582,6)	(Sigma, Deisenhofen)
Kollagen R	(Serva, Heidelberg)
Luria Agar	(Sigma, Deisenhofen)
Luria Broth Base	(Sigma, Deisenhofen)
Lymphoprep	(Nycomed Pharma, Unterschleissheim)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ • 6H ₂ O, MW = 203,3)	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumsulphat (MgSO ₄ , MW = 120,4)	(Sigma, Deisenhofen)
2-Mercaptoethanol (HS(CH ₂) ₂ OH, MW = 78,13)	(Sigma, Deisenhofen)
Methanol (CH ₃ OH, MW = 32,04)	(Riedel de Haen, Seelze)
Metrizamid	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumacetat (C ₂ H ₃ O ₂ Na, MW = 82,03)	(Merck, Darmstadt)
Natriumazid (NaN ₃ , MW = 65,01)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃ , MW = 84,01)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid (NaCl, MW = 58,44)	(Merck, Darmstadt)
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ • 2H ₂ O, MW = 294,1)	(Roth, Karlsruhe)
Natrium - deoxycholate (C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na • H ₂ O, MW = 432,6)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ , MW = 120,0)	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ , MW = 142)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumdodecylsulphat (SDS) (CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ SO ₃ Na, MW = 288,38)	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH, MW = 40,0)	(Merck, Darmstadt)
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ O ₃ Na, MW = 110,0)	(Sigma, Deisenhofen)
Nicht - essentielle Aminosäuren (100x)	(Seromed, Berlin)
ODN 1668 (5' - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3')	(TIB MOLBIOL, Berlin)
Ovalbumin, Grad V, VI, VII	(Sigma, Deisenhofen)
Paraformaldehyd (PFA) (H(-OCH ₂) _n -OH)	(Serva, Heidelberg)
PBS	(Biochrom, Berlin)
Penicillin (10.000U/ml) /Streptomycin (10.000µg/ml)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Percoll	(Amersham Pharmacia, Freiburg)
Phorbol 12 -myristat 13-acetat (PMA) (C ₃₆ H ₅₆ O ₈ , MW = 616,8)	(Sigma, Deisenhofen)
Plasmidpräparationskit	'Nucleobond AX500' (Machery-Nagel, Düren)
Polyoxysorbitanmonolaurat	siehe Tween 20
Protein G (Hi Trap™) Affinitätsäulen (1ml)	(Amersham Pharmacia, Freiburg)

RPMI 1640 - Medium	(Seromed, Berlin)
Salzsäure (HCl, MW = 36,46)	(Sigma, Deisenhofen)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , MW = 98,08)	(Universität Heidelberg, Theoretikum, Abtl. Chemikalienlager)
SDS	s. Natriumdodecylsulphat
SIINFEKL	(ZMBH, Abteilung Biosynthese)
Streptomycin (10.000 µg/ml)/Penicillin (10.000U/ml)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Stickstoff, flüssig	(Linde, Wiesbaden)
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , MW = 342,3)	(Sigma, Deisenhofen)
TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂ , MW = 116,2)	(BioRad, München)
Tris (Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan)	(Riedel de Haen, Seelze)
Tris - Base ((CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ , MW = 121,1)	(Roth, Karlsruhe)
Triton X-100	(Sigma, Deisenhofen)
Trypanblau, 0,4% (C ₃₄ H ₂₄ N ₆ O ₁₄ S ₄ Na ₄ , MW = 960,8)	(Biochrom, Berlin)
Trypsin/EDTA	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Trypton	(Difco Laboratories, Augsburg)
Türkslösung	(Merck, Darmstadt)
Tween 20	(Merck, Darmstadt)
Urea (NH ₂ CONH ₂ , MW = 60,06)	(Sigma, Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid (30%) (H ₂ O ₂ , MW = 34)	(Merck, Darmstadt)

2.4. Allgemeine Lösungen

GBSS (Gey's balanced salt solution): ddH₂O, 137mM NaCl, 5mM KCl, 1,6mM CaCl₂, 0,9mM MgCl₂, 0,3mM MgSO₄, 0,2mM KH₂PO₄, 1,7mM Na₂HPO₄ pH 7,4, 2,7mM NaHCO₃, 5,5mM D(+)-Glucose, 50mM HEPES, pH 7,4 eingestellt mit NaOH und sterilfiltriert (0,2 µm), 4°C

2.5. Verwendete Marker, Enzyme und Zytokine

2.5.1. DNA - Molekulargewichtsmarker:

- 100bp - Leiter (dsDNA Fragmente: 100bp bis 1500bp in 100bp Schritten, 2072bp) (Gibco BRL, Karlsruhe und Amersham Pharmacia, Freiburg)
- 1kb - Leiter (dsDNA Fragmente: 0,5kb bis 2,5kb in 0,5kb Schritten, 3,0 bis 10,0kb in 1,0kb Schritten) (Amersham Pharmacia, Freiburg)
- Quantitativer DNA - Marker: 100ng/µl eines 500bp Fragments (GenSura über Roth, Karlsruhe)

2.5.2. Protein - Molekulargewichtsmarker:

- Rainbow Molekulargewichtsmarker RPN 756 / enthält je ca. 1mg/ml der folgenden Proteine (durch kovalente Modifikation mit Farbstoffen eingefärbt): Myosin (MW= 220kD, Blau), Phosphorylase b (MW= 97.4kD, Braun / evtl. in zwei Banden), BSA (MW= 66kD, Rot), Ovalbumin (MW= 46kD, Gelb), Carbonanhydrase (MW= 30kD, Orange), Trypsininhibitor (MW= 21.5kD, Blau) und Lysozym (MW= 14.3kD, Magenta) (Amersham Pharmacia, Freiburg)

2.5.3. Enzyme und Enzyminhibitoren:

- Biotin Protein Ligase BirA (Bestandteil des 'Bulk Biotin Protein Ligase' Kit, Avitivity, Denver, CO, USA)
- DNase Grade I oder II (Boehringer, Mannheim und Roche Diagnostics, Mannheim)
- Kollagenase A (Clostridium histolyticum) (Boehringer, Mannheim)
- Proteinaseinhibitor: '25x Complete proteinase inhibitor cocktail tablets, EDTA free' (Roche Diagnostics, Mannheim)
- RNase A aus Rinderpankreas (Boehringer, Mannheim)

2.5.4. Zytokine:

Alle verwendeten Zytokine (IFN γ , IL-4, IL-12, TNF α) waren rekombinante Mausproteine, die von PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) bezogen wurden.

2.6. Verwendete Antikörper, Streptavidin- und Fluorochromkonjugate

2.6.1. Antikörper gegen Oberflächenmarker und intrazelluläre Epitope:

Sofern nicht anders angegeben wurden monoklonale Antikörper gegen murine Epitope verwendet, die mit Biotin oder einem Fluorochrom (FITC, PE, PerCP-Cy5.5 oder APC) konjugiert waren.

Antigen	Isotyp	Klon	Bemerkung	Quelle
BrdU	IgG1 μ , Maus	3D4	mitgelieferten Isotyp (MOPC-21) verwendet	BD
CD1d	IgG2b μ , Ratte	1B1	Auch unkonjugiert eingesetzt	BD
CD3 α	IgG, Hamster	145-2C11	Auch unkonjugiert eingesetzt	BD + Hb
CD3 β	IgG2b μ , Ratte	17A2	Auch unkonjugiert eingesetzt	BD
CD3 ϵ	IgG1, Maus	6B10.2		Santa Cruz
CD4	IgG2b μ , Ratte	GK1.5		BD
CD5	IgG2a μ , Ratte	53-7.3	= Ly-1	BD
CD8 α	IgG2a μ , Ratte	53-6.7	= Ly-2	BD
CD8b.2	IgG1 μ , Ratte	53-5.8	= Ly-3.2	BD
CD11a	IgG2a μ , Ratte	2D7	= Integrin α L, LFA-1 β -Kette	BD
CD11b	IgG2b μ , Ratte	M1/70	= Integrin α M, Mac-1 Kette	BD
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	= Integrin α X Kette	BD
CD16/32	IgG2b μ , Ratte	2.4G2	= Anti-FC γ R III + II / unkonjugiert eingesetzt	BD
CD19	IgG2a μ , Ratte	1D3	= Teil des BZR - Korezeptors	BD
CD25	IgG2b μ , Ratte	3C7	= IL-2-Rezeptor-alpha Kette	BD
CD31	IgG2a μ , Ratte	MEC 13.3	= α -PECAM-1	BD
CD40	IgG2a μ , Ratte	3/23		BD
CD44	IgG2b μ , Ratte	IM7	= Pgp-1, Ly-24	BD
CD45R	IgG2a μ , Ratte	RA3-6B2	= B220	BD
CD49b	IgM μ , Ratte	DX5	= Pan-NK-Marker DX5 = Integrin α 2	BD
CD54	IgG1 μ , Hamster	3E2	= ICAM-1	BD
CD62L	IgG2a μ , Ratte	MEL-14	= L-selectin, LECAM-1, Ly-22	BD
CD69	IgG1, Hamster	H1.2F3		BD
CD80	IgG2, Hamster	16-10A1	= B7.1	BD
CD86	IgG2a μ , Ratte	GL1	= B7.2	BD
CD106	IgG2a μ , Ratte	429	= VCAM-1	BD
CD122	IgG2b μ , Ratte	TM- α 1	= IL-2 and IL-15 Rezeptor α -Kette	BD
CD137	IgG1 μ , Ratte	1AH2	= 4-1BB, Ly-63	BD
CD152	IgG1 μ , Hamster	UC10-4F10-11	= CTLA-4	BD
CD154	IgG3 μ , Hamster	MR1	= CD40 Ligand	BD
Desire	IgG, Ratte	Desire		GH
F4/80	IgG2b, Ratte	F4/80		Hb
ICOS-Ig	IgG, Ratte	-/-	= ICOS - Ligand - Ig Konstrukt	RK
ICOS	IgG2a, Ratte	MIC-280		RK
Ig μ , Ratte	IgG2a μ , Maus	MAR 18.5	Gegen RI-1 und RI-1b Allotyp / unkonjugiert eingesetzt	Hb
IL-2	IgG2b, Ratte	JES6-5H4	neutralisierender Antikörper	BD
IL-4	IgG2b, Ratte	BVD4-1D11		BD
IL-10	IgG2b, Ratte	JES5-16E3		BD
IL-12	IgG1, Ratte	C15.6	(p40/p70)	BD
MHC I	IgG2a μ , Ratte	34-2-12	α -H-2Dd	BD
MHC I	IgG2a μ , Ratte	AF6-88.5	α -H-2Kb	BD
MHC II	IgG2a μ , Ratte	2G9	I-Ad / I-Ed / bindet auch H-2b	BD
MHC II	IgG2a μ , Maus	KH74	I-Ab / bindet auch I-Af, r, s, + v	BD
ME9F1	IgG2a, Ratte	ME9F1		Hb
NK1.1	IgG2a μ , Maus	PK136	Auch unkonjugiert eingesetzt	BD + Hb

□□TCR	IgG, Hamster	GL3		BD
TCR□	IgG, Hamster	H57-597		BD
TNF-□	IgG1, Ratte	MP6-XT22		BD
TRIM	IgG2a, Maus	TRIM-4		BS
V□2 TCR	IgG2a □, Ratte	B20.1		BD
V□14	IgG2a	CMS-1	Unkonjugiert eingesetzt	MT
V□5 TCR	IgG1 □, Maus	MR9-4		BD
V□8 TCR	IgG2a, Maus	F23.1	□-V□8.1 + 8.2 + 8.3 des K ^b Haplotyps	BD
V□12 TCR	IgG1 □, Maus	MR11-1		BD

Quellenabkürzungen: BD = PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg); BS = Burkhard Schraven, Magdeburg; GH = Günter Hämmerling, DKFZ, Heidelberg; Hb = eigene Aufreinigung aus Hybridomkulturen; MT = Masaru Tanaguchi, Chiba, Japan; RK = Richard Kroczek, Robert Koch-Institut Berlin; Santa Cruz = Santa Cruz (La Jolla, CA, USA).

2.6.2. ELISA - Zytokineantikörper, Sekundär- und Isotyp - Kontrollantikörper:

Sofern nicht anderes angegeben, wurden alle verwendeten ELISA - Zytokin-, Sekundär- und Isotyp - Kontrollantikörper von PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) bezogen. Bei den für ELISA verwendeten Antikörperpaaren, war der erste Antikörper unkonjugiert, der zweite Biotin-konjugiert.

- IFN□ Klon AN-18 (IgG1 □, Ratte) und Klon R4-6A2 (IgG1, Ratte)
- IL-2: Klon JES6-1A12 (IgG2a, Ratte) und Klon JES6-5H4 (IgG2b, Ratte)
- IL-4: Klon 11B11 (IgG1, Ratte) und Klon BVD6-24G2 (IgG1, Ratte)
- IL-10: Klon JES5-2A5 (IgG1, Ratte) und Klon SXC-1 (IgM, Ratte)
- TNF□: Klon G281-2626 (IgG1, Ratte) und Klon MP6-XT3 (IgG1, Ratte)

- □- Ratte Ig □ (Klon MAR 18.5) (aus Hybridomüberstand aufgereinigt)
- □- murine IgG2a/2b (Klon R2-40)

- Hamster IgG1 (Klon G235-2356)
- Hamster IgG2 (Klon Ha4/8)
- Maus IgG1 □ (Klon MOPC-21)
- Maus IgG2a □ (Klon G155-178)
- Maus IgG2b □ (Klon MPC-11)
- Ratte IgG1 □ (Klon R3-34)
- Ratte IgG2a □ (Klon R35-95)
- Ratte IgG2b □ (Klon A95-1)

2.6.3. Streptavidinkonjugate und sonstige Fluorochrome bzw. Fluorochromkonjugate:

Streptavidin, konjugiert mit:

- FITC PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg);
- PE PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) und Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
- PE-Cy5 CyChrome: PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg)
R670: Gibco BRL (Karlsruhe)
- APC PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) und Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
- POD Boehringer (Mannheim)

- 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (C₆₂H₈₇N₁₃O₁₆, MW = 1270,45) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- Annexin V - PE (PharMingen, Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg)

2.6.4. Magnetischen Kügelchen ('MicroBeads'):

- □-murin CD4-, CD8-, CD11c-, CD11b-, sowie □-Biotin- und □- Phycoerythrin- (PE-) MicroBeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach)
- □-murin CD19 - Dynabeads (DynaL Biotech, Hamburg)

2.7. Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Die im Rahmen der MHC I Tetramerherstellung verwendeten Plasmide zur Produktion der schweren und leichten Kette, wurden freundlicherweise von Ton N.M. Schumacher, Amsterdam, Niederlanden zur Verfügung gestellt.

- BL21(DE3)pLysS (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- DH5 α

2.8. Verwendete Zelllinien

Sofern nicht anders angegeben, lagen alle verwendeten Zelllinien bereits im Labor vor und konnten von mir verwendet werden.

- 145-2C11: B - Zellhybridom, welches einen monoklonalen Hamster - Antikörper (IgG) produziert, der den CD3 α Ko-Rezeptor auf der Zelloberfläche von murinen T - Zellen erkennt (Leo et al. 1987).
- B3Z: CD8⁺ T - Zellhybridom, welches spezifisch das aus dem Ovalbumin stammende SIINFEKL - Peptid im Kontext des MHC I Moleküls H2-K^b erkennt. B3Z verfügt auch über ein lacZ(bGal)-Konstrukt, das vom NF-AT-Element des IL-2-Promotors gesteuert wird (van Bleek et al. 1990).
- DN3A4-1.2 (1.2): V α 14V β 8.1 oder 8.2 positives NKT - Zellhybridom, welches durch β -Galactosylceramid (β -GalCer) im Kontext von CD1d zur IL-2 Produktion aktiviert werden kann (Burdin et al. 1998, Brossay et al. 1998b) (freundlicherweise von M. Kronenberg, La Jolla, CA, USA zur Verfügung gestellt).
- F4/80: B - Zellhybridom, welches einen monoklonalen Ratte - Antikörper (IgG2b) produziert, der ein 160kD großes Glykoprotein unbekannter Funktion auf der Zelloberfläche muriner Makrophagen erkennt (Austyn et al. 1981).
- MAR 18.5: B - Zellhybridom, welches einen monoklonalen Maus - Antikörper (IgG2a α) produziert, der die leichte Ratten Immunglobulin α -Kette (Allotypen RI-1 und RI-1b) erkennt.
- ME9F1: B - Zellhybridom, welches einen monoklonalen Ratte - Antikörper (IgG2a) produziert, der ein Protein unbekannter Funktion auf der Zelloberfläche muriner Endothel- und Muskelzellen erkennt (Harder et al. 1991).
- PK136: B - Zellhybridom, welches einen monoklonalen Maus - Antikörper (IgG2a α) produziert, der den membranständigen NK - Rezeptor NK1.1 in einigen Mausstämmen (z.B. C57BL/6, FVB/N, NZB) erkennt (Koo et al. 1986).
- RMA: Rauscher-Leukämie-Virus induzierte murine Thymom-Zelllinie (H2-K^b).
- RMA-Ova: RMA mit einem Ovalbumin-tragenden Plasmid transfiziert.

2.9. Verwendete Mäusestämme

- bm1 Mäuse: Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund, die eine Mutation im MHC I Molekül H2-K^b tragen. Dieses H2-K^{bm1} Molekül kann das aus dem Ovalbumin stammende SIINFEKL - Peptid nicht funktionell präsentieren. (Versuchstierhaltung des ZMBH, Heidelberg)
- C57BL/6: Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotyp H-2K^b. (Versuchstierhaltung des ZMBH, Heidelberg)
- Desire Mäuse: T - Zellrezeptor transgene Mäuse, deren transgener T - Zellrezeptor spezifisch drei endogene Peptide (Guimezanes et al. 2001) im Kontext des MHC I Moleküls H2-K^b erkennt (Schönrich et al. 1991) (freundlicherweise von B. Arnold und G. Hämmerling, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt). Für diesen T - Zellrezeptor steht zusätzlich ein Klonotyp - spezifischer Antikörper (Desire) zur Verfügung (Hua et al. 1986).
- OT-I Mäuse: V α 2V β 5 T - Zellrezeptor transgene Mäuse, deren transgener T - Zellrezeptor spezifisch das aus dem Ovalbumin stammende SIINFEKL - Peptid im Kontext des MHC I Moleküls H2-K^b erkennt (Hogquist et al. 1994). (Versuchstierhaltung des ZMBH, Heidelberg)
- RAG2^{-/-}: RAG2 defiziente Tiere, die aufgrund der fehlenden Rekombination alle TZR und BZR tragenden Zellen fehlen (freundlicherweise von B. Arnold und G. Hämmerling, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt).

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Agarosegelelektrophore von DNA:

Agarose ist ein polymeres Kohlenhydrat, bestehend aus einer Kette von alternierenden D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose Molekülen, welches aus dem Agar-Agar von Rotalgen gewonnen wird. In der Hitze gelöste Agarose erhärtet bei Temperaturen unter ca. 45°C und bildet dabei eine netzförmige Matrix aus, deren Porengröße indirekt proportional zur eingesetzten Agarosekonzentration ist. Diese Matrix kann zur Trennung eines DNA Gemisches eingesetzt werden, da die Laufgeschwindigkeit weitgehend von der Molekülgröße abhängt. Wird ein Spannungsfeld längs des Gels angelegt, so wandert die DNA, welche bei neutralem pH aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen ist, zur Anode.

Material: Elektrophoresekammer, Flachgel-

UV-Beleuchtungstisch Spectroline, Model TL-312A, Transilluminator, 312nm

Lösungen:

10x Ladepuffer: ddH₂O, 50% (v/v) Glycerin, ein Körnchen Bromphenolblau

1x TAE Elektrophoresepuffer: 40mM Tris - Base, 1,022% (v/v) Essigsäure, 2mM EDTA

Methode:

Mit Hilfe von 1% (w/v) horizontalen Agarosegelen mit 1x TAE als Puffersystem wurden die DNA Fragmente bei 100-120V Spannung aufgetrennt. Zum Nachweis der Banden wurden der auf 50-60°C abkühlten Agaroselösung 2µl/100ml Ethidiumbromidlösung (ca. 0,2µg/ml) zugesetzt. Ethidiumbromid ermöglicht nach Interkalation in die Nukleinsäure den Nachweis der DNA unter UV-Licht (312nm). Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgebracht. Das Bromphenolblau im Ladepuffer diente zur Kennzeichnung der Laufmittelfront. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine 100bp- oder 1kb-Leiter mitgeführt. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

3.1.2. Herstellen von kompetenten prokaryotischen Zellen:

Die chemische Behandlung von prokaryotischen Zellen mit CaCl₂ erhöht deren Bereitschaft DNA aus der umgebenden Lösung aufzunehmen (Cosley et al. 1973, Hanahan 1983). Derartig behandelte Zellen werden als kompetente Zellen bezeichnet.

Material:

Schüttelinkubator 'RC-2-U Pilot Shaker'
Drehschüttler 'Rollordrum', Modell TC-7
Einmalröhrchen, Polystyrol 18/95mm
Gewebskulturschalen 94/16mm

Lösungen:

LB-Medium: ddH₂O, 1g (w/v) Trypton, 0,5g (w/v) Hefeextrakt, 0,5g (w/v) NaCl,
0,1% (v/v) 1N NaOH
100mM CaCl₂ Lösung
CaCl₂/Glycerin - Lösung: 100mM CaCl₂, 10% (v/v) Glycerin, 4°C

Methode:

5ml LB-Medium wurden mit DH5α - Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220rpm inkubiert. Mittels dieser Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen 50ml LB-Medium zu einem OD₆₀₀ - Wert von 0,2 angeimpft und bis zum Erreichen eines OD₆₀₀ - Wertes von 0,7 - 0,8 weiter kultiviert (37°C, 220rpm). Die Zellen wurden anschließend 15min auf Eis gekühlt, pelletiert (15min, 3.000g 4°C) und in 25ml CaCl₂ Lösung resuspendiert. Nach 30min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (15min, 3.000g, 4°C) und das Pellet in 2,5ml CaCl₂/Glycerin - Lösung aufgenommen. 200µl Aliquots dieser Lösung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren (s. 3.1.4.) und bei -70° C gelagert.

Zum Test der Kompetenz der Zellen wurden diese mit 0,1ng und 1ng des gewählten Plasmids transformiert und über Nacht auf LB-Agarplatten, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, kultiviert (s. 3.1.3.). Am darauf folgenden Tag wurden die Kolonien auf beiden Agarplatten gezählt und die Transformationseffizienz nach folgender Formel berechnet: Transformationseffizienz = Kolonien/µg eingesetztes Plasmid. Die Transformationseffizienz lag üblicherweise bei 10⁶ Kolonien/µg Plasmid.

3.1.3. Transformation prokaryotischer Zellen:

Material:

Schüttelinkubator 'RC-2-U Pilot Shaker'
Drehschüttler 'Rollordrum', Modell TC-7
Einmalröhrchen, Polystyrol 18/95mm
Gewebskulturschalen 94/16mm

Lösungen:

LB-Agar: 2,75% (w/v) Luria Agar mit
- für DH5α: 50µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin oder
- für BL21(DE3)pLysS: 50µg/ml Carbenicillin und 34µg/ml Chloramphenicol
LB-Medium: ddH₂O, 1g (w/v) Trypton, 0,5g (w/v) Hefeextrakt, 0,5g (w/v) NaCl,
0,1% (v/v) 1N NaOH

Method: 50 μ l kompetente DH5 α bzw. BL21(DE3)pLysS - Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in vorgekühlte Polystyrolröhrchen pipettiert und mit 2 μ l 0,5M 2-Mercaptoethanol und ca. 500ng der entsprechenden Vektor - DNA versetzt. Nach 30min Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock von 42°C für 45 bis 60 Sekunden im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde umgehend auf Eis abgekühlt und nach 2min mit 250 μ l LB - Medium (37°C) für eine Stunde im Schüttelinkubator (37°C, 225rpm) zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz bebrütet. Zur Selektion auf rekombinante Klone wurden 50 μ l bzw. 150 μ l Aliquots auf antibiotikahaltigen LB - Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.4. Kryokonservierung von prokaryontischen Zellen:

Zellen können sich bei längerer Kulturhaltung klonal verändern. Um diesem Vorgang vorzubeugen und um für länger auseinanderliegende Versuchsreihen auf identisches Zellmaterial zurückgreifen zu können, wurden Zellaliquots zu Beginn der Kultivierung eingefroren.

Material: 1ml Kryoröhrchen

Method: 850 μ l Zellsuspension einer frischen Übernachtskultur wurden mit 150 μ l Glycerin gemischt und umgehend in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung der Zellen erfolgte bei -70°C. Um daraus eine frische Bakterienkultur anzusetzen wurde von dem noch gefrorenen Material mittels einer sterilen Metallöse eine kleine Menge abgekratzt, in das entsprechende Kulturmedium überführt und bei 37°C unter schütteln aufgezogen. Eventuell nötige Selektionsmarker wurden dem Medium frühestens nach 6h zugesetzt.

3.1.5. Plasmidpräparation durch alkalische Lyse:

Die Isolierung der in Bakterien vermehrten Plasmid - DNA erfolgte mit Hilfe von kommerziellen Säulen von Machery-Nagel (Düren). Das vorgefertigte Säulenmaterial besteht aus einer Silikagelmatrix, die zur Verminderung von unspezifischen Bindungen mit einer hydrophilen Substanz beschichtet sind. Das Prinzip dieser Plasmidisolierung folgt der Anionenaustauschromatographie. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll stellt eine Modifikation nach Birnboim et al. (1979) dar.

Material: 'Nucleobond AX500'

Schüttelinkubator 'RC-2-U Pilot Shaker'

Drehschüttler 'Rollordrum', Modell TC-7

Lösungen: Medium: 2,5% (w/v) Luria Broth Base mit 50 μ g/ml Ampicilin bzw. Kanamycin
Resuspensionspuffer S1: 50mM Tris - Base, 10mM EDTA pH 8,0, 100 μ g/ml RNase A
Lysepuffer S2: 200mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Neutralisierungspuffer S3: 2,8M Kaliumacetat, pH 5,1 (4°C)
Equilibrierungspuffer N2: 100mM Tris/H₃PO₄, 15% (v/v) Ethanol, 900mM Kaliumchlorid, 0,15% (v/v) Triton X-100, pH 6,3
Waschpuffer N3: 100mM Tris/H₃PO₄, 15% (v/v) Ethanol, 1,15M Kaliumchlorid, pH 6,3
Elutionspuffer N5: 100mM Tris/H₃PO₄, 15% (v/v) Ethanol, 1M Kaliumchlorid, pH 8,5
TE - Puffer: 10mM Tris - Base, 0,1mM EDTA, pH 8,0

Method: Mit einer transformierten Kolonie wurden 10ml Medium angeimpft und ca. acht Stunden im Schüttelinkubator (37°C, 225rpm) inkubiert. Mittels dieser Starterkultur wurden 400ml Medium zu einem OD₆₀₀ - Wert von 0,2 angeimpft und über Nacht kultiviert. Die resultierende Suspension wurde zentrifugiert (15min, 6.000g, 4°C) und das Pellet in 12ml Resuspensionspuffer S1 aufgenommen. Zur alkalischen Zellyse wurde vorsichtig 12ml Lysepuffer S2 untermischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Der resultierende Zelldebris und die denaturierte chromosomale DNA wurden durch Zugabe des 4°C kalten Neutralisationspuffers S3 für 15min auf Eis präzipitiert und anschließend abzentrifugiert (30min, 20.000g, 4°C). Der plasmidhaltige Überstand wurde umgehend auf die AX500 Säule aufgetragen, die zuvor mit 6ml Puffer N2 equilibriert worden war. Nach zweimaligen Waschen der Säule mit 16ml Puffer N3 wurde das Plasmid mit 15ml des Puffers N5 eluiert, mit 11ml Isopropanol (RT) gefällt und pelletiert (30min, 15.000g, 4°C). Das Pellet wurde erneut mit 10ml -20°C kaltem 70% Ethanol gewaschen (10min, 15.000g, 4°C) und bei Raumtemperatur getrocknet, ehe es in 0,1-0,5ml TE - Puffer aufgenommen wurde.

3.1.6. Photometrische Bestimmung der DNA - Konzentration:

Das Absorptionsspektrum gibt Auskunft über Konzentration und, im gewissem Umfang, über die Reinheit von DNA in Lösungen. Die DNA - Konzentration wurde durch Extinktionsmessung bei OD₂₆₀ bestimmt. Die Absorption bei 260nm ist direkt proportional zum DNA-Gehalt. Eine Optische Dichte (OD) von 1 entspricht einem Gehalt von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA (dsDNA) (Sambrook et al. 1989, S. E5). Die DNA-Konzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g DNA/ml}$$

Da Proteine ein anderes Absorptionsmaxima aufweisen (bei 280nm aufgrund der aromatischen Aminosäuren) als Nukleinsäuren (für DNA bei ca. 260nm), lässt sich eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen mit Hilfe des UV - Absorptionsspektrums feststellen. Bei 'sauberer' DNA sollte das Verhältnis der Extinktionen bei 260nm und 280nm ($E_{260/280}$) gleich 1,8 sein. Ein niedriges $E_{260/280}$ Verhältnis ist allgemein ein Hinweis auf Protein- und Phenolverunreinigungen (Sambrook et al. 1989, S. E5).

Zur Erhöhung der Messgenauigkeit können noch die Messwerte von 325nm bzw. 320nm, zum Nachweis von partikulären Verunreinigungen in der Lösung, als auch auf der Küvette, und 230nm, das die Peptidbindungen und die aromatischen Anteile von Protein- und Phenolverunreinigungen anzeigt, herangezogen werden.

Material: Spektralphotometer 'Ultrospec 3000'

Methode: Die DNA - Lösung wurde mit Wasser angemessen verdünnt, in der Regel 1:100, in die Küvette gefüllt und im 'Ultrospec 3000' gemessen. Als Referenz diente deionisiertes Wasser.

3.2. In vivo Probenahme und Gewinnung primärer Zellsuspensionen

3.2.1. In vivo Probenahme:

Material: 0,4x19mm, 27Gx^{3/4} Kanüle (grau)

Lösungen: BrdU - Stammlösung: PBS, 30mg/ml (w/v) BrdU

BrdU-Wasser: Leitungswasser, 0,8-1mg/ml (w/v) BrdU, 5% (w/v) D-Glucose

Methode: Für intraperitoneale (i.p) oder intravenöse (i.v.) Gaben wurden die Mäuse fixiert und die jeweilige Lösung oder Zellsuspension intraperitoneal oder intravenös in die laterale Schwanzvene appliziert. BrdU wurde wahlweise per os mittels BrdU-Wasser in der Trinkflasche oder 10 μ g in 250 μ l PBS intravenös gegeben.

3.2.2. Aufreinigung von Leukozyten aus Milz und Thymus:

Material: Metallsieb (250 μ m)

Nylonsieb 'Cell Strainer', 70 μ m

Lösungen: Lysepuffer: 155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA, pH 7,29

Kollagenaselösung: GBBS, 0,05% (w/v) Kollagenase A, 100 μ g/ml DNase

MACS - Puffer: PBS, 1% (v/v) FCS, 5mM EDTA, pH 7.2

Methode: Zur Entnahme aller Organe wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, in 70% Ethanol getaucht und die Leibeshöhle bzw. der Brustkorb unter sterilen Bedingungen eröffnet. Milz bzw. Thymus wurden von Fettgewebe und Gefäßen getrennt und in PBS (4°C) überführt. Die Organe wurden daraufhin mit Hilfe eines 5ml Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, dieses mit PBS gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (10min, 350g, 4°C). Das Milzzellpellet wurde zur osmotischen Erythrozytenlyse je nach Größe in 5-10ml Lysepuffer aufgenommen und 5min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit PBS gewaschen (10min, 350g, 4°C), in 10ml Medium aufgenommen, gesiebt (70 μ m) und erneut gewaschen (10min, 350g, 4°C). Je nach der Pelletgröße wurden die Zellen beider Organe in 2-10ml Medium aufgenommen und gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt.

Zur Aufreinigung von dendritischen Zellen (DC) aus der Milz wurden die Zellen nach der Erythrozytenlyse in Kollagenaselösung aufgenommen (ca. 3ml/Milz) und im Schüttelinkubation (248rpm, 37 °C) für 20-30min verdaut. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (10min, 350g, 4°C) wurden die Zellen in MACS - Puffer resuspendiert und über eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette gegeben, um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.2.3. Aufreinigung von Lymphozyten aus Lymphknoten:

Material: Deckgläschen

Nylonsieb 'Cell Strainer', 70 μ m

Methode: Die freipräparierten Lymphknoten wurden zwischen zwei Deckgläschen vorsichtig zerquetscht und die austretenden Zellen in einer mit PBS gefüllten Petrischale aufgefangen. Die Zellsuspension wurde anschließend mit PBS gewaschen (10min, 350g, 4°C), in 2-5ml PBS oder Medium aufgenommen, gefiltert (70 μ m) und gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt.

3.2.4. Aufreinigung von Lymphozyten aus dem Knochenmark:

Material: 0,3x13mm, 30G Kanüle

Methode: Die Ober- und Unterschenkelknochen wurden freipräpariert, von Sehnen und Muskeln befreit und je einmal der Reihe nach mit PBS, 70% Ethanol und PBS gespült. Die Knochen wurde zu beiden Seiten in Höhe der Verbreiterung des Knochens (Femur) bzw. des durchscheinenden roten Markes (Tibia) durchtrennt, die

Kanüle eingeführt und das Knochenmark mit 10ml PBS ausgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend mit PBS gewaschen (10min, 350g, 4°C), in 2-5ml PBS oder Medium aufgenommen und gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt.

3.2.5. Aufreinigung von Serum und Lymphozyten aus dem peripheren Blut:

Material: Einmalröhrchen, Polypropylen- 12/75mm
Glaskanülen, heparinisiert
0,9x40mm, 20Gx1¹/₂'' Kanüle (gelb)

Lösungen: Heparinlösung: Heparin gelöst in ddH₂O zu 5U/ml
FACS - Puffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid (4°C)
Puffer: FACS - Puffer, 40U/ml Heparin
Lymphoprep - Lösung (Dichte 1.0779 g/cm³)

Methode: Um peripheres Blut zu gewinnen wurde bei lebenden Tieren die Schwanzvene mit einem Skalpell angeritzt bzw. bei letal betäubten Tieren eine Glaskanüle in das Adergeflecht hinter dem Auge eingeführt und das Blut in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt in welchem 20µl der Heparinlösung vorgelegt worden waren. Bei toten Tieren wurde das Blut nach Eröffnen des Peritonealraumes direkt aus der unteren Hohlvene (Vena cava inferior) entnommen. Die hierfür verwendete 1ml Spritze mit einer 0,9x40mm Kanüle wurde zuvor mit einigen Mikrolitern der Heparinlösung gefüllt.

Zur Gewinnung des Serums wurden die zelluläre Bestandteile des heparinisierten Blutes mittels einer Tischzentrifuge pelletiert (2-3min 2.500g, 2min 3.000g, 2min 4.000g, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Um die peripheren Blut - Lymphozyten zu erhalten, wurde, in Einmalröhrchen vorgelegtes, Lymphoprep - Lösung (ca. 1,5-2ml) mit dem heparinisierten Blut vorsichtig überschichtet und zentrifugiert (20min, 800g, RT). Die resultierende Interphase wurde abgenommen, gewaschen (10min, 350g, 4°C) und das Pellet je nach Bedarf weiterverwendet.

3.2.6. Aufreinigung primärer Zellen aus der Leber

3.2.6.1. Leberperfusion:

Material: 0,45x25mm, 26Gx1'' Kanüle (braun)

Lösungen: Perfusionslösung: GBBS (ohne Ca²⁺), 0,05% (w/v) Kollagenase A, 40°C
4% (w/v) PFA Lösung

Methode: Nach Eröffnung des Peritonealraumes wurde eine Kanüle in die Pfortader (Vena porta) eingeführt, die untere Hohlvene (Vena cava inferior) durchtrennt und die Leber mit 5-6 ml/min Perfusionslösung für 3-10 Sekunden perfundiert. Die Gallenblase wurde entfernt und die Leber in kaltes PBS (s. 3.2.6.2) bzw. ange-wärmtes GBSS (s. 3.2.6.3) überführt.

Diente die Organentnahme der Herstellung von Schnittpräparaten, so wurde mit ca. 10ml 4% PFA Lösung perfundiert, die Lebern mittels eines Skalpells zerkleinert und die resultierenden Stücke (ca. 3-6mm) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte in 2ml Reaktionsgefäßen bei -70°C.

3.2.6.2. Aufreinigung von Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) via Percollgradienten:

Material: Metallsieb (250µm)
0,9x70mm, 20Gx2³/₄'' Kanüle (gelb)

Lösungen: MACS - Puffer: PBS, 1% (v/v) FCS, 5mM EDTA, pH 7.2
100% Percoll - Stocklösung: 90% (v/v) Percoll-Lösung, 10% (v/v) 10xPBS
40% bzw. 80% Percoll-Lösung: 100% Percoll - Stocklösung, entsprechend verdünnt mit Zellkulturmedium (mit 1% FCS) bzw. MACS - Puffer (RT)
Kollagenaselösung: GBBS, 0,05% (w/v) Kollagenase A, 100µg/ml DNase

Methode: Die Perfusion und die Entnahme der Leber erfolgte wie unter 3.2.6.1. beschrieben. Die Lebern wurden daraufhin mit Hilfe eines 5ml Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, dieses mit PBS gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (10min, 350g, 4°C). In einigen Experimenten wurde das Pellet in Kollagenaselösung aufgenommen, im Schüttelinkubation (248rpm, 37 °C) für 15-30min verdaut und erneut mit PBS gewaschen (10min, 350g, 4°C). Dieser Schritt erhöhte die Gesamtzellausbeute aller untersuchten Zellpopulationen, reduzierte jedoch den relativen Anteil der NKT - Zellen an der Gesamtzellzahl. Im Anschluss daran, oder in den Experimenten ohne Kollagenaseverdau direkt nach dem ersten Waschschrift, wurde das Pellet in 4-5ml 40% Percoll-Lösung aufgenommen und in 15ml Röhrchen überführt. Bei Aufreinigung mehrerer Lebern, wurde darauf geachtet, nicht mehr als ca. 1,5 Lebern auf ein 15ml Röhrchen zu verteilen. Die Suspension wurde mittels einer 5ml Spritze und einer 70mm Kanüle mit ca. 3ml 80% Percoll-Lösung unterschichtet und zentrifugiert (20min, 800g, 14-22°C, ohne Bremse). Nach Abnehmen und Waschen der Interphase mit PBS (10min, 350g, 4°C) wurde das resultierende Pellet in 0,5-1ml Medium aufgenommen und gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt.

3.2.6.3. Aufreinigung nicht - parenchymaler Leberzellen via Metrizamidgradienten:

Material: Gewebeskulturschalen 94 / 16mm

Lösungen: Kollagenaselösung: GBSS, 0,05% (w/v) Kollagenase A, 100µg/ml DNase
30% (w/v) Metrizamid in GBSS (ohne NaCl)
MACS - Puffer: PBS, 1% (v/v) FCS, 5mM EDTA, pH 7.2

Methode: Die Perfusion und die Entnahme der Leber erfolgte wie unter 3.2.6.1. beschrieben. Die Lebern wurden daraufhin mittel Pinzette und Schere mechanisch dissoziiert, ehe sie in 4-6ml Kollagenaselösung pro Leber aufgenommen und im Schüttelinkubator verdaut wurden (30-40min, 248rpm, 37 °C). Die resultierende Zellsuspension wurde daraufhin mit Hilfe eines 5ml Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, dieses mit GBSS gespült und die Lösung zentrifugiert (10min, 350g, 20°C). Das Pellet wurde zu 5ml Gesamtvolumen mit GBSS aufgenommen und mit 7ml Metrizamid gemischt, wodurch sich eine Dichte von 1.089 g/cm³ ergab. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Röhrchen überführt, vorsichtig mit 0.5-1ml GBSS überschichtet und zentrifugiert (25min, 1400g, 20°C, ohne Bremse). Die Bande zwischen Gradientenoberfläche und GBSS wurde abgenommen und mit GBSS gewaschen (10min, 350g, 20°C). Folgte eine Aufreinigung mittels der Gegenstromzentrifugation wurde das Pellet in ca. 5ml GBSS resuspendiert, bei einer sich anschließenden Separation via MACS hingegen in ca. 5ml MACS - Puffer.

3.2.6.4. Aufreinigung von sinusoidalen Endothel- und Kupfferzellen via Gegenstromzentrifugation (Elutriation):

Die Gegenstromzentrifugation erlaubt eine effiziente Zelltrennung aufgrund der Zellgröße und -dichte. Mittels einer peristaltischen Pumpe und angeschlossenem Schlauchsystem wird die zu separierende Zellsuspension bei laufender Zentrifuge in einen speziellen Rotor eingespeist. Die Fließrichtung ist hierbei der konstantgehaltenen Zentrifugalkraft entgegengerichtet. Mit steigender Flussrate können zunehmend größere und schwerere Zellen die Zentrifugalkraft überwinden und aus der Rotorkammer ausgespült und gesammelt werden.

Material: Zentrifuge: J2-MC mit Rotor 'JE-6B'

Lösungen: Blockierungspuffer: PBS, 1% (w/v) BSA

LSEC - Medium: DMEM Medium, 10% (v/v) FCS^{-LPS}, 10⁵U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin

Methode: Der Rotor wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, an das Pumpensystem angeschlossen und auf Dichtigkeit getestet. Das komplette Schlauchsystem wurde mit 70% Ethanol desinfiziert, mit PBS gespült und für ca. 30 Minuten mit Blockierungspuffer gefüllt um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss daran wurde der Blockierungspuffer und etwaige Luftblasen mit GBSS ausgespült, die Pumpe auf eine Flussrate von 16ml/min eingestellt und die Zentrifuge gestartet (2500rpm, 24°C). Zum Beladen der Zellen (s. 3.2.6.3.) wurde der Bypass aus dem direkten Fluss genommen, die Zellsuspension mittels einer 10ml Spritze langsam injiziert und durch das Öffnen des Bypasses ins System eingespült. Der Durchlauf wurde gesammelt und die Flussrate sukzessiv erhöht. In der Regel wurden je eingestellter Flussrate folgende Volumina gesammelt (die diesen Flussraten entsprechenden Zellfraktionen sind in Klammern angegeben): bei 16ml/min (vornehmlich Erythrozyten und Lymphozyten) ca. 80-100ml, bei 22ml/min (LSEC hoher Reinheit) 100-150ml und bei 28ml/min (LSEC geringerer Reinheit), 32ml/min (Mischfraktion aus LSEC und Kupfferzellen) und 55ml/min (Kupfferzellen) je 50-100ml. Die Zellsuspensionen wurden anschließend zentrifugiert (10min, 350g, 4°C), die resultierenden Pellets in 10ml LSEC - Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.3. Zellkulturmethoden

3.3.1. Zellkulturen und ihre Propagation:

Die käuflichen RPMI- und DMEM- Medien enthalten Phenolrot als pH - Indikator, welches bei pH 7,4 eine hellrote Färbung hervorruft. Durch Stoffwechselprozesse der Zellen sinkt der pH - Wert des Mediums und die Färbung wechselt über orange zu gelb. Dieser Farbwechsel erlaubt eine einfache Inspektion der Mediumqualität. Bei allem verwendeten FCS wurde vor dem Einsatz die Komplementfaktoren hitzeinaktiviert (30min, 56°C).

Material: Schüttler, Roll-

Lösungen: T - Zellmedium: RPMI 1640 Medium, 5% (v/v) FCS, 10⁵U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50µM 2-Mercaptoethanol

Hybridommedium: T - Zellmedium mit 5% und 10% (v/v) FCS, 20mM HEPES

Methode: Die T- (B3Z, RMA, RMA-OVA) und NKT- Zelllinien (DN3A4-1.2, DN3A4-1.4, N38-3C3) wurden in T-Zellmedium bei 37°C unter 5%-iger CO₂ - Begasung kultiviert. Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden in regelmäßigen Abständen, insbesondere bei einer Veränderung der Medienfärbung, mit frischem Medium um den Faktor 10-30 verdünnt.

Zur späteren Antikörpergewinnung wurden die jeweiligen B - Zellhybridome in zwei Liter Flaschen auf einem Rollschüttler expandiert. Bis zu einem Kulturvolumen von 500ml wurde hierzu Hybridommedium mit 10%,

danach mit 5% FCS verwendet. Die Zellsuspensionen wurden nach dem Farbumschlag zu Gelb zentrifugiert (6000g, 10min, 4°C) und die Überstände zur Antikörperaufreinigung (s. 3.4.1.) eingesetzt.

3.3.2. Kultivierung primärer Zellen *in vitro*:

Lösungen: T - Zellmedium: RPMI 1640 Medium, 5% (v/v) FCS, 10⁵U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50µM 2-Mercaptoethanol
Kollagenlösung: ddH₂O, 0.1 mg/ml (w/v) Kollagen R
LSEC - Medium: DMEM Medium, 10% (v/v) FCS^{-LPS}, 10⁵U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin
Waschpuffer: PBS, 1% BSA

Methode: Zur Kultur der nicht - parenchymalen Zellen wurden Kollagen beschichtete Zellkulturplatten verwendet. Hierzu wurden die Kulturplatten vor Gebrauch mit Kollagenlösung gefüllt, mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült und unter der Sterilbank luftgetrocknet. Die Zellen aus der Elutriation wurden zu 1x10⁶ Zellen/ml in LSEC - Medium aufgenommen und 20ml dieser Zellsuspension pro beschichteter Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zum Entfernen von nicht adhären den Zellen und Zelltrümmern einmal mit Waschpuffer gespült. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter 5%-iger CO₂ - Begasung.

Zum Ernten der adhären t wachsenden LSEC wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer gespült und anschließend durch Inkubation mit Trypsin/EDTA oder Accutase bei 37°C für maximal fünf Minuten von der Zellkulturplatte abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wurde anschließend zur Inaktivierung des Trypsins mit LSEC - Medium gewaschen (10min, 350g, 4°C).

Die Kultivierung von T - Zellen erfolgte mit T - Zellmedium bei 37°C unter 5%-iger CO₂ - Begasung. Für Ko - Kulturen aus nicht - parenchymalen und T - Zellen wurde LSEC - Medium verwendet.

3.3.3. Ermittlung von Zellkonzentrationen:

Material: Zählkammer: Neubauer 'improved'

Lösungen: Trypanblau - Lösung: 1:10 (v/v) Verdünnung der 0,4% Stammlösung in ddH₂O

Methode: Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der sogenannten Neubauer Zählkammer. Nach Auszählen von 16 kleinen Außenquadraten lässt sich die Zellzahl wie folgt berechnen:

$$\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10.000 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Zellzahl/ml}$$

Um die Vitalität der Zellen zu ermitteln erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension hierbei mit Trypanblau- bzw. Türkislösung. Die enthaltenden Farbstoffe werden von lebenden Zellen aktiv aus dem Zytoplasma transportiert und färben somit nur tote Zellen blau bzw. violett an. Darüber hinaus führt das in der Türkislösung enthaltene Essigsäure zu einer Erythrozytenlyse.

3.3.4. Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen:

Material: 1ml Kryoröhrchen
Einfrierbehälter 'Kryo'

Lösungen: Einfriermedien: 90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO, 4°C

Methode: Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10-20 x 10⁶ Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen und je 1ml dieser Lösung in Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden in dem Einfrierbehälter, gefüllt mit kaltem (4°C) Isopropanol, für mindestens 5 Stunden auf -70°C gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff zur Endlagerung überführt. Das Auftauen der konservierten Zellsuspensionen wurde rasch bei 37°C durchgeführt und die Lösung nach dem Auftauen umgehend mit 50ml des entsprechenden Kulturmediums gewaschen (10min, 400g, 4°C). Das Pellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert und wie beschrieben propagiert.

3.3.5. Magnetische Zellsortierung (MACS):

Mit Hilfe des MACS ist es möglich, einzelne Zellpopulationen von einander zu trennen. Magnetische Kügelchen ('microbeads', \varnothing ca. 50nm) beschichtet mit Antikörpern gegen spezifischen Membranmoleküle werden zu der Zellsuspension gegeben. Die Antikörper binden an die Zellen, welche über das entsprechende Epitop verfügen. Die Lösung wird im Folgenden über eine Säule geführt, die sich innerhalb eines starken Magnetfeldes befindet. Durch Spülen der Säule werden alle Zellen, die nicht durch die magnetischen Kügelchen im Magnetfeld zurückgehalten werden von der Säule ausgewaschen. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes können die zuvor gebundenen Zellen eluiert werden.

Material: AutoMACS bzw. vario MACS
MS⁺ (bis zu 2×10^8 Gesamtzellen) bzw. VS⁺ (für bis zu 2×10^9 Gesamtzellen) Säulen
Magnetische Kügelchen
Rollenmischer 'M 5'

Lösungen: MACS - Puffer: PBS, 1% (v/v) FCS, 5mM EDTA, pH 7.2

Methode: Die aufgereinigten Zellen wurden zu einer Konzentration von 10^7 Zellen pro 90 μ l in MACS - Puffer aufgenommen und mit 10 μ l der jeweiligen magnetischen Kügelchen pro 10^7 Zellen versetzt. Die resultierende Zellsuspension wurde für 15min bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert und daraufhin mit dem 10-20fachen Volumen an MACS - Puffer gewaschen (10min, 350g, 4°C). Das Zellpellet wurde der Zellzahl und der verwendeten Säule entsprechend in Puffer aufgenommen, was pro MS⁺ - Säule 0,5-1ml bzw. pro VS⁺ - Säulen 1-10ml Zellsuspension entsprach. Die Säule wurde mit 500 μ l für MS⁺ bzw. 3ml für VS⁺ Puffer equilibriert und die Zellsuspension aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit 500 μ l (MS⁺) bzw. 3ml (VS⁺) Puffer wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die gebundenen Zellen eluiert. Hierzu wurden 1ml (MS⁺) bzw. 5ml (VS⁺) Puffer auf die Säule aufgetragen und dieser mit dem Stempel einer 10ml Spritze durch die Säule gepresst.

Bei einigen Versuchen wurde anstelle freier Säulen (vario MACS) die automatisierte Version des AutoMACS eingesetzt. Die Bedienung erfolgt hierbei nach Herstellerangaben.

3.4. Proteinchemische Methoden

3.4.1. Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüberständen durch Affinitätschromatographie

Material: Protein-G Säule
Konzentrationsäulen: Amicon 'centriplus YM30', Ausschlussgröße 30kD
pH - Indikatorstäbchen: pH 6,5-10,0 und pH 0-6

Lösungen: Elutionspuffer: 100mM Glycin, 100mM NaCl, pH 3,2 bzw. pH 1 (eingestellt mit HCl)
Neutralisationspuffer: 1,5M NaHCO₃

Methode: Die Überstände der B - Zellhybridomkulturen wurden über zwei Lagen Filterpapier filtriert und anschließend bei 4°C über eine mit PBS equilibrierte Protein-G Säule gegeben. Nach 1-1,5 Litern Überstand wurde die Säule mit PBS gewaschen, bis im Durchlauf kein Protein mehr nachweisbar war (Photometer, 280nm). Dies war in der Regel nach 300-500ml PBS der Fall. Anschließend wurde der Antikörper mit 10ml Elutionspuffer pH 3,2 bei Raumtemperatur eluiert. Um das Protein so kurz als möglich dem sauren pH-Wert des Elutionspuffers auszusetzen, wurde das Eluat zu 1ml Aliquots in 1.5ml Mikrozentrifugengefäße aufgefangen, in die 200 μ l Neutralisationspuffer vorgelegt worden waren. Die gewonnenen Aliquots wurden vereinigt, gegebenenfalls der pH - Wert auf pH 7-7,5 eingestellt und der Antikörper mittels der Konzentrationsäulen ankonzentriert (8.000g, 4°C). Die längerfristige Lagerung des aufgereinigten Antikörpers erfolgte bei -20°C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen wurde vermieden. Die verwendeten Protein-G Säulen wurden mit Elutionspuffer pH 1 gereinigt und in PBS gelagert.

3.4.2. Herstellung von MHC I – Tetrameren

Die Proteinketten des MHC I Moleküls, der extrazelluläre Anteil der schweren Kette K^b (HC, 'heavy chain') und das β_2 -Mikroglobulin (β_2m), wurden nach Überexpression (3.4.2.1.) aus bakteriellen Einschlusskörperchen aufgereinigt (3.4.2.2.) und in Anwesenheit des zu beladenden Peptids gefaltet (3.4.2.3.). Die via FPLC aufgereinigten Monomere (3.4.2.4.) wurden sequenzspezifisch biotinyliert (s. 3.4.6.) und mittels Streptavidin multimerisiert (3.4.2.5.).

3.4.2.1. Induktion von bakteriellen Einschlusskörperchen:

Die Proteinsynthese für die schwere Kette und das α_2 -Mikroglobulin wurde durch die Zugabe von IPTG zum Kulturmedium induziert. Die Proteine sammeln sich in Einschlusskörperchen im bakteriellen Zytoplasma. Um die Ausbeute der eukaryotischen Proteine zu erhöhen, wurde die mit eukaryotischen t-RNA rekombinierte Bakterienzelllinie BL21(DE3)pLysS verwendet. Diese Bakterien tragen darüber hinaus das Lysozymgen, wodurch nach Zellyse der enzymatische Verdau (s. 3.4.2.2.) beschleunigt wird.

Lösungen: LB-Medium: ddH₂O, 1g (w/v) Trypton, 0,5g (w/v) Hefeextrakt, 0,5g (w/v) NaCl, 0,1% (v/v) 1N NaOH, 100 μ g/ml Carbenicillin und 68 μ g/ml Chloramphenicol

Methode: Die transformierten BL21(DE3)pLysS wurden unter Selektionsbedingungen (100 μ g/ml Carbenicillin und 68 μ g/ml Chloramphenicol) in LB - Medium expandiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wurde die Synthese des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,4mM induziert. Nach weiteren 4-5 Stunden Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (20min, 2.000g, 4°C), mit PBS gewaschen (20min, 4.400g, 4°C) und das Pellet direkt weiterverwendet (s. 3.4.2.2.) bzw. wahlweise bei -20°C gelagert.

3.4.2.2. Aufreinigung von bakteriellen Einschlusskörperchen:

Die Aufreinigung der Einschlusskörperchen ist angelehnt an das Protokoll von Garboczi et al. (1996a, 1996b) und beruht auf enzymatischer und detergenten - vermittelter Zellyse der Bakterien mit anschließender Weiterverarbeitung der unlöslichen Fraktion.

Material: Sonifikator, Stab-Rollenmischer 'M 5'

1,5ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss

Lösungen: 10% (w/v) Natrium - deoxycholate in ddH₂O

EDTA: 0,5M in 50mM Tris-HCl pH8

50mg/ml (w/v) Lysozym in ddH₂O (-20°C)

DNase - Lösung: 10mg/ml (w/v) DNase Grade I oder II, 75mM NaCl, 50% (v/v) Glycerin

Lysepuffer: 50mM TRIS pH8, 25% (w/v) Sucrose, 1mM EDTA, 10mM DTT

Detergentspuffer: 20mM TRIS pH7,5, 200mM NaCl, 1% (w/v) Natrium - deoxycholate, 1% (v/v) NP40, 2mM EDTA

Waschpuffer: 0,5% (v/v) Triton-X100, 1mM EDTA

Urea/Tris: 8M Urea, 20mM TRIS pH8

Methode: Das Zellpellet von 500ml Kulturlösung (s. 3.4.2.1.) wurde in 8ml Lysepuffer resuspendiert, in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und auf mittels des Sonifikators homogenisiert (50%, 30 Impulse). Nach Zugabe von 1M MgCl₂, 100mM MnCl₂ und DNase - Lösung zu einer Endkonzentration von 10mM MgCl₂ bzw. 1mM MnCl₂ bzw. 100 μ g/ml DNase wurde die Lösung 30min bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 20ml Detergentspuffer gemischt, eingefroren (-80°C oder EtOH/Trockeneis), erneut aufgetaut (37°C) und pelletiert (20min, 15.800g, 4°C). Das Pellet wurde zweimal in Waschpuffer resuspendiert, homogenisiert (50%, 30 Impulse) und zentrifugiert (20min, 15.800g, 4°C). Nach dem Auflösen des resultierenden Pellets in 5ml Urea/Tris wurde die Lösung in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (10min, 15.800g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und dessen Proteinkonzentration bestimmt (s. 3.4.3.).

3.4.2.3. Faltung von MHC I - Monomeren:

Zur Gewinnung der MHC I Moleküle wurden die einzelnen Bestandteile, der extrazelluläre Anteil der schweren Kette K^b (HC, 'heavy chain'), das α_2 -Mikroglobulin (α_2 m) und das Zielpeptid SIINFEKL, in Urea gelöst, gemischt und dialysiert. Während der Renaturierung der Proteine falten sich diese spontan zu MHC I Monomeren.

Material: Konzentrationssäulen: Amicon 'centriplus YM30', Ausschlussgröße 30kD

Dialyseschlauch: 'spectrapor', Ausschlussgröße 500D

Lösungen: Proteinaseinhibitor: 1Tablette ('25x Complete proteinase inhibitor cocktail tablets, EDTA free') gelöst in 2ml 20mM TRIS pH8

Dialysepuffer: 10mM Kaliumphosphat pH7,4 (d.h. für 2L: 3,96ml 1M KH₂PO₄ und 16,04ml 1M K₂HPO₄)

Faltungspuffer: 4M Urea, 20mM TRIS pH8

Methode: Anhand des bekannten Molekulargewichtes (HC = 35g/mM, α_2 m = 11,7g/mM und SIINFEKL = 1g/mM) und des Extinktionsfaktors bei OD₂₈₀ (HC = 89.600 und α_2 m = 18.200) ließen sich die jeweiligen Proteinkonzentrationen in Mol berechnen. Die angestrebten Konzentrationen und Verhältnisse der Proteine für die Rückfaltung waren: HC : α_2 m : SIINFEKL = 10 μ M : 10 μ M : 80 μ M. Die entsprechenden Mengen der in Urea/Tris gelösten Proteine (s. 3.4.2.2.) wurden gemischt und mit Faltungspuffer auf das errechnete Volumen

erweitert. Die Lösung wurde nach Herstellerangaben in den Dialyseschlauch überführt, dieser in einen zwei Liter Messzylinder, gefüllt mit Dialysepuffer, gehängt und unter ständigem Rühren des Dialysepuffers für 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Hierbei wurde nach 24 Stunden der Dialysepuffer einmal gewechselt. Anschließend wurde die Lösung aus dem Dialyseschlauch in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (15.800g, 20min, 4°C) und der Überstand via Konzentrationssäulen auf ein Volumen von ca. 700µl ankonzentriert (8.000g, 4°C).

3.4.2.4. Aufreinigung von MHC I - Monomeren über 'Fast Protein Liquid Chromatography' (FPLC):

Material: Gelfiltrationsapparatur: ÄktaExplorer

Gelfiltrationssäule: Superdex 75 Säule 20/60

Lösungen: FPLC - Puffer: PBS sterilfiltriert (0,22µm)

Methode: Die Probenlösung (s. 3.4.2.3. und 3.4.2.5.) wurde sterilfiltriert (0,22µm), in die 1ml Ladeschleife injiziert und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5ml/min über die Säule geführt. Nach ca. 82min und einem Anstieg der Absorption der aus der Säule austretenden Lösung von über 10mAU wurden Fraktionen von 500µl gesammelt.

3.4.2.5. Multimerisierung von MHC I - Monomeren:

Der Proteingehalt der FPLC – Fraktionen (s. 3.4.2.4.) wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 3.4.4.) und der 'Bradford' - Reaktion (s. 3.4.3.) analysiert. MHC Monomere zeigten sich in einer Bande bei ca. 46kD. Positive Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert (s. 3.4.2.3.), biotinyliert (s. 3.4.6.) und erneut über FPLC aufgereinigt, ehe sie durch Inkubation mit Streptavidin tetramerisiert werden konnten.

Lösungen: Streptavidin-PE und -APC Konjugate

1mg/ml BSA - Lösung

Methode: Anhand des bekannten Molekulargewichtes (MHC Monomere = 46g/mM, Streptavidin = 60g/mM PE = 240g/mM und APC = 210g/mM) ließen sich die jeweiligen Proteinkonzentrationen in Mol berechnen. Das angestrebte Verhältnis der Proteine für die Multimerisierung war: Monomere : Streptavidin-Fluorochrom = 5 : 1. Die Hälfte der errechneten Menge des Streptavidin-Fluorochrom Konjugates wurde direkt mit den biotinylierten Monomeren gemischt und bei 4°C inkubiert. Das verbleibende Streptavidin-Fluorochrom wurde in 10% Volumen - Aliquots in Abständen von 10min zum Ansatz hinzugegeben und die fertige Lösung über Nacht inkubiert. Die resultierenden MHC Tetramere wurden mittels FPLC aufgereinigt (s. 3.4.2.4.), ankonzentriert (s. 3.4.2.3.), mit 1/5 Volumen Glycerol und BSA - Lösung zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v) versetzt und bei -80°C gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde vermieden.

3.4.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (1972):

Material: Spektralphotometer 'Ultraspec II Model 4050'

Lösungen: 'BioRad Essay' Bradford Reagenz

1mg/ml BSA - Lösung

Methode: Je 20µl der Probenlösungen wurden mit 800µl Wasser und 200µl Bradford Reagenz in die Küvetten pipettiert, 5min inkubiert (RT) und deren Absorption bei 595nm gemessen. Als Referenz diente eine Eichgerade, die mit 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10µg BSA erstellt wurde. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der Steigung der Eichgeraden errechnet.

3.4.4. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE):

Für die Auftrennung der Proteine wurde die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) eingesetzt. Polyacrylamidgelen entstehen durch die Polymerisierung von monomeren Acrylamid bei Anwesenheit von N,N'-methylbisacrylamid, welches die Vernetzung der Polymerketten ermöglicht. Die Reaktion wird durch Ammoniumsulfat (APS) gestartet, wobei TEMED die Reaktion durch eine Stabilisierung der Radikale katalysiert (nach Voet et al. 1995).

Hier wurde das diskontinuierliche System nach Ornstein (1964), Davies (1964) bzw. Laemmli (1970) verwendet, bei welchem dem Trenngel ein Sammelgel mit einer größeren Maschenweite und Ionenkonzentration und einem niedrigeren pH-Wert vorgeschaltet wird. Der Sammelgelpuffer enthält Chloridionen ('leading ions'), welche eine größere elektrophoretische Mobilität als die Proteine aufweisen. Der Elektrophoresepuffer enthält hingegen Glycin ('trailing ions') mit einer geringen Mobilität im Vergleich mit den Proteinen. Zwischen der Chlorid- und Glycinfront bildet sich hierdurch eine schmale Zone geringerer Leitfähigkeit und somit höhere Spannung aus, innerhalb der die Proteine der Probe fokussiert werden. Nach Erreichen des Trenngel bedingt der pH-Sprung einer Ionisierung der Glycinmoleküle die nun als Ionen schneller als die Proteine wandern und diese 'überholen'. Befreit von dieser einen Begrenzung werden die Proteine im weiteren Verlauf der Elektrophorese in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes (im denaturierten Gelen) oder nach Form und Ladung (in nativen Gelen) getrennt (Sambrook et al. 1989, S. 18.47, Ausubel et al. 1999, S.10.2.30).

Fand die Proteintrennung unter denaturierenden Bedingungen statt, so wurden die Proteine im Vorfeld mit dem Detergenz SDS und 2-Mercaptoethanol gekocht und unter Anwesenheit von SDS im Elektrophoresepuffer getrennt. Für native Gele wurde auf diesen Schritt und auf SDS und 2-Mercaptoethanol verzichtet (Ausubel et al. 1999, S.10.2.4).

Material: Mini-Protean II Cell für Gele von 7cm x 8cm x 0,75mm
Lösungen: Trenngelpuffer: 1.5M Tris - Base , pH 8,8
 Sammelgelpuffer: 0.5M Tris - Base , pH 6,8
 Elektrophoresepuffer (nativ): 25mM Tris - Base , 192mM Glycin
 Elektrophoresepuffer (denaturierend): 25mM Tris - Base , 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
 AA/Bis: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid
 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
 10% (w/v) SDS
 Ladepuffer (nativ): 125mM Tris - Base, pH 6,8, 25% (v/v) Glycerin, ca. 0,01% (w/v) Bromphenolblau
 Ladepuffer (denaturierend): 125mM Tris - Base, pH 6,8, 25% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol, ca. 0,01% (w/v) Bromphenolblau

	4% Sammelgel	10% Trenngel	[Endkonz.]
H ₂ O	6,04ml	5,01ml	-/-
SDS	100µl	125µl	0,1%
Sammelgelpuffer	2,5ml	-/-	125mM
Trenngelpuffer	-/-	3,13ml	375mM
AA/Bis	1,3ml	4,15ml	4 bzw. 10%
APS	50µl	62,5µl	0,05%
TEMED	10µl	6,25µl	0,1 bzw. 0,05%
Gesamtvolumen	10ml	12,5ml	

Tabelle 2. Zusammensetzung der Polyacrylamidgellösungen: Im Falle von nativen Gelen wurde SDS durch Wasser ersetzt.

Methode: Die Gelappatur wurde laut Herstellerangaben aufgebaut und die Gele gegossen. Die Trenngellösung wurde zum Ausschluss von Luftsauerstoff, welcher die Polymerisation verhindert, und um eine horizontale Gelfront zu gewährleisten, mit Wasser überschichtet, welches nach frühestens einer Stunde Polymerisationszeit durch die Sammelgellösung ersetzt wurde. Der Probenkamm, welcher die Probenaschen im Sammelgel ausspart, wurde nach 30-60min entfernt, Elektrophoresepuffer in die obere Kammer gefüllt und diese auf Dichtigkeit geprüft. Die Proben wurden mit einem Volumen des jeweiligen Ladepuffers gemischt und direkt, im Falle eines nativen, oder nach 5min Kochen bei 95°C, im Falle eines denaturierenden Gels, aufgetragen. Das untere Reservoirs wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese bei 4°C mit 150V und 15mA pro Gel für ca. 1h durchgeführt. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde jeweils ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Lauffront konnte durch das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau verfolgt werden.

3.4.5. Coomassie - Färbung der Polyacrylamidgelelektrophorese:

Material: Geltrockner 'Dual Temperature SLAB Gel Dryer' Model 1125B
 Rollenmischer 'M 5'
Lösungen: Färbelösung: 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250,
 Entfärbelösung: 20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Methode: Das Polyacrylamidgel wurde auf dem Rollenmischer für 30-45min in Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung solange entfärbt bis der Hintergrund neutral und die aufgetrennten Proteine als blaue Banden sichtbar waren. Anschließend konnten die Gele im Geltrockner in ca. zwei Stunden bei 80°C vakuumgetrocknet werden.

3.4.6. Biotinylierung von Proteinen:

Zum einfachen Nachweis im Durchflusszytometer mittels fluorochrom markiertem Straptavidins wurden die aus den B - Zellhybridomüberständen aufgereinigten Antikörper kovalent an Biotin gekoppelt. Hierbei wird das Biotin chemisch und ungerichtet an ein Lysinrest im Antikörper gebunden. Im Falle der MHC I Monomere erlaubte die enthaltene Erkennungssequenz für das Enzym BirA eine sequenzspezifische Biotinylierung des Proteins.

Material: Rollenmischer 'M 5'
Konzentrationsssäulen: Amicon 'centriplus YM30', Ausschlussgröße 30kD
pH - Indikatorstäbchen: pH 6,5-10,0 und pH 0-6
Biotin Protein Ligase BirA (im 'Bulk Biotin Protein Ligase' Kit)

Lösungen: Biotinester: N-Hydroxysuccinimidobiotin
Puffer: 100mM NaHCO₃, pH 8,2-8,6
PBS - Lösung: PBS, 0,05% (v/v) Natriumazid
Pepstatin: 2mg/ml in DMSO
Leupeptin: 2mg/ml in Wasser
'Bulk Biotin Protein Ligase' Kit:
Lösung A: 0,5M Bicine, pH 8,3
Lösung B: 100mM ATP, 100mM MgOAc, 200µM Biotin
Extra d-biotin: 500µM Biotin

Methode: Die Antikörperlösung mit 1-1,5mg des Proteins wurde auf die Konzentrationsssäule gegeben und für 30-45min zentrifugiert (8.000g, 4°C). Die Porengröße der Membran innerhalb der Säule hält hierbei das Protein zurück und erlaubt nur dem Lösungsmittel den Durchtritt. Dies ermöglicht, durch wiederholtes Auffüllen der Säule mit Puffer und Zentrifugation, den problemlosen Austausch des Lösungsmittels. Der Abschluss der Dialyse, meist nach dem vierten Mal zentrifugieren, wurde mittels pH - Indikatorstäbchen festgestellt. Nun wurde die Konzentration des Proteins auf 1mg/ml mit Puffer eingestellt und pro Milligramm des Proteins 120µg des Biotinesters zugegeben. Der Ansatz wurde 4 Stunden unter ständigem Mischen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung wie eben beschrieben gegen die PBS - Lösung dialysiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde vermieden.

Zu 700µl (entspricht 1-2mg) der aufgereinigten und ankonzentrierten Monomerlösung (s. 3.4.2.4.) wurden je 100µl Lösung A, Lösung B und Extra d-Biotin, sowie 10µl BirA Enzym (entspricht 30µg), 0,5µl Pepstatin und 0,5µl Leupeptin zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden die biotinylierten Monomere mittels FPLC (s. 3.4.2.4.) aufgereinigt. Zum Test der Biotinylierungseffizienz wurde ein 15µl Aliquot der resultierenden Lösung mit einem Überschuss (ca. 100µg) an Streptavidin inkubiert (2h, 4°C) und anschließend mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 3.4.4.) analysiert. Die Bindung des Streptavidin führte zu einer geringeren Laufgeschwindigkeit der biotinylierten Monomere (ca. 47kD) im Gel, aufgrund des höheren Molekulargewichtes (ca. 110kD) ('*Streptavidin - Shift*').

3.4.7. Hämatoxylin/Eosin (HE) - Färbung:

Durch Hämatoxylin werden Zellkerne blauschwarz bis violett, durch das Eosin cytoplasmatische Bestandteile rosa bis rot angefärbt.

Material: Kyoostat 2800 Frigocut N
Objektträger 'SuperFrost Plus'
Deckgläser

Lösungen: Mayer's Hämalaun - Stammlösung: ddH₂O, 1mg/ml Hämatoxylin, 0,2mg/ml Natriumjodat, 50mg/ml Kalialaun zugeben.
Mayer's Hämalaun - Gebrauchslösung: Mayer's Hämalaun - Stammlösung, 50mg/ml Chloralhydrat, 1mg/ml Zitronensäure (vor Gebrauch filtriert)
Eosin - Stammlösung. ddH₂O, 1% (w/v) Eosin y
Eosin - Lösung: 70% Ethanol, 10% (v/v) Eosin-Stammlösung, 1% (v/v) Essigsäure
HCl - Alkohol: 70% Ethanol, 0,5% (w/w) HCl
Kyoostat- Kleber 'Eukitt'

Methode: Von den schockgefrorenen Lebern wurden am Kyoostat nach Herstellerangaben 6-10µm breite Schnitte gefertigt, diese auf Objektträger überführt und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Die nachfolgende HE - Färbung konnte freundlicherweise in den Räumen der Arbeitsgruppe Gröne (DKFZ, Heidelberg) mit den dort vorrätigen Geräten und Lösungen durchgeführt werden. Alle Schritte wurden hierbei bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte ca. fünf Minuten in Mayer's Hämalaun gefärbt, in ddH₂O gespült und zwei bis fünf Sekunden in HCl - Alkohol differenziert um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Nach dem Bläuen unter fließendem Leitungswasser (ca. 10min) folgte die Eosinfärbung für ein bis zwei Minuten, gefolgt von einem Waschschrift in ddH₂O. Im Anschluss daran wurde mit Ethanol mit aufsteigender Konzentration dehydriert (2min 70%, 2min 80%, 2x 2min 96% und 2x 2min absoluter Ethanol) und in Xylol (3x 5min) äquilibriert, ehe die Schnitte mit einem Deckgläschen versiegelt wurden.

3.5. Immunfluorometrische Methoden

3.5.1. Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Untersuchung der Zellgröße, Granuliertheit und der Immunfluoreszenzmarkierung einzelner Zellen in Suspension. Mittels spezieller Fließparameter werden die Zellen einzeln an einer monochromatischen Lichtquelle (Argon-Laser $\lambda = 488\text{nm}$ bzw. Helium-Neon-Laser $\lambda = 635\text{nm}$) vorbeigeführt. Die Streuung unter einem Winkel von $2\text{-}10^\circ$ des geradewegs durch die Zelle gehenden Strahles, dem sogenannten 'forward scatter' (FS), gibt Hinweis auf die Zellgröße. Die Streuung des Lichtstrahles unter einem Winkel von 90° , dem sogenannten 'sideward scatter' (SS), ermöglicht Rückschlüsse auf die Granulierung der Zelle. Fluorochrome, die zur Immunfluoreszenzmarkierung von Zellantigenen verwendet werden, können durch das Laserlicht kurzfristig in einen angeregten Zustand überführt werden. Beim Übergang des Fluorochroms zurück in den Grundzustand wird die Energie in Form eines Photons mit einer charakteristischen Wellenlänge frei. Diese Photonen werden von hochempfindlichen Photozellen (Photomultiplier) detektiert. Diese Messung von Größe, Granulierung und Fluoreszenzintensität ermöglicht eine Charakterisierung der Zellen.

<u>Material:</u>	Durchflusszytometer 'FACScan' und 'FACSCalibur' 96-Loch Mikrotiterplatten mit spitzem bzw. flachem Boden Einmalröhrchen, Polystyren- 6,0/38mm Einmalröhrchen, Polypropylen- 12/75mm
<u>Lösungen:</u>	Annexin - Puffer ¹¹ : 10mM HEPES pH 7,4 (NaOH), 140mM NaCl, 2,5mM CaCl ₂ BACS - Puffer: PBS, 1% (w/v) BSA, 0,05% (w/v) Natriumazid FACS - Puffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid Saponinpuffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid, 0,5% (w/v) Saponin DNase - Lösung: PBS, 300µg/ml DNase I, 5mM MgCl ₂ , 150mM NaCl, pH 5-7 1:10 (v/v) Verdünnung von 7-AAD in Puffer 1% (v/v) Formalin 2% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) PFA/Tween - Lösung: 1% PFA, 0,01% Tween20 Bead - Lösung: FACS - Puffer mit vier Tropfen pro Milliliter

3.5.1.1. Färbung von Oberflächenantigenen und Fixation:

Meist wurden Antikörper verwendet, die mit einem Fluorochrom gekoppelt waren und somit direkt eine Detektion am Durchflusszytometer gestatteten. Bei unkonjugierten bzw. mit Biotin konjugierten Antikörpern erfolgte die Markierung in einem weiteren Schritt mittels eines Fluorochrom konjugierten Zweitantikörpers bzw. eines Streptavidin - Fluorochrom - Konjugats.

Methode: Die Zellen wurden zu $5\text{-}10 \times 10^6$ Zellen/ml im jeweiligen Puffer aufgenommen und je 50-100µl der Zellsuspension pro Loch auf die Mikrotiterplatte mit spitzem Boden pipettiert. Bei einer Färbung der Proben mit Annexin V bzw. MHC I Tetrameren wurde Annexin bzw. BACS - Puffer bei allen Schritten der Oberflächenfärbung verwendet. Bei allen weiteren Färbungen kam FACS - Puffer zum Einsatz. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde jeweils zu der ersten Antikörperlösung 10µg/ml Rate:Maus (1:1) IgG und 1µg/ml α -CD16/32 (2.4G2) Antikörper zugegeben.

Bei Färbungen ohne MHC I Tetrameren wurden die Zellen in 50-100µl Puffer, nach Zugabe der vom Hersteller empfohlenen bzw. in Vorversuchen ausgetesteten Menge(n) des/der Antikörper und/oder Annexins, resuspendiert und für 15min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 100µl Puffer gewaschen (2min, 350g, 4°C), der Überstand verworfen und die empfohlene Menge(n) des/der Antikörper und/oder Streptavidin - Konjugats, hinzugegeben. Die Zellen wurden kurz resuspendiert, für 15min bei 4°C inkubiert und abschließend zweimal gewaschen (2min, 350g, 4°C).

Die Färbungen der Zellen mit MHC I Tetrameren erfolgten immer zusammen mit Fluorochrom - konjugierten Antikörpern gegen CD8 α , in den jeweils in Vorversuchen ausgetesteten Mengen, in 25-35µl BACS - Puffer für 30min bei 37°C. Färbungen mit weiteren Fluorochrom - konjugierten Antikörpern wurden wahlweise zusammen mit der Tetramerfärbung oder im Anschluss daran durchgeführt. Färbungen mit Biotin - konjugierten Antikörpern erfolgten immer nach der Tetramerfärbung. Die Zellen wurden hierzu zweimal mit 100µl Puffer gewaschen (2min, 350g, 4°C), der Überstand verworfen und für die weitere Oberflächenfärbung wie oben beschrieben behandelt.

Schluss an die Oberflächenfärbung eine zytoplasmatische Färbung an und/oder war mit MHC I Tetrameren gefärbt worden, so wurden die Zellen zum Fixieren in 100µl PBS resuspendiert, und die Lösung mit 100µl 2% PFA - Lösung gemischt. Nach 15min Inkubation auf Eis wurde einmal mit FACS - Puffer gewaschen und die Zellen je nach Bedarf weiterverwendet. Zum Nachweis von nukleärem BrdU wurde mit Ethanol und PFA fixiert. Hierzu wurden die Zellen in 500µl PBS (4°C) in 12/75mm Einmalröhrchen resuspendiert und tropfenweise 1,2ml 95% Ethanol unter ständigem Schütteln zugegeben. Nach Inkubation für 30min bei 4°C und einem

¹¹ nach Vermes et al. (1995)

Waschschritt mit BACS - Puffer (10min, 350g, 4°C), wurde die Zellen in 100µl PFA/Tween inkubiert (15-30min, 4°C) und erneut mit BACS - Puffer gewaschen (10min, 350g, 4°C). Bei den verbleibenden Färbungen wurde wahlweise wie beschrieben mit PFA oder mit Formalin fixiert. Für letzteres wurden die Zellen in 1% Formalinlösung resuspendiert und mindestens 15min inkubiert.

Bei Verwendung von 7-AAD wurde nach der Oberflächenfärbung 4µl 7-AAD Lösung zu den 100µl Zellsuspension gegeben und möglichst auf eine Fixierung verzichtet. Die Proben wurden dann nach 10 Minuten bis maximal 2 Stunden Inkubation gemessen. In Ausnahmefällen erfolgte die Fixierung wie beschrieben in Formalin. Den Lösungen wurde hierzu bei Fixierung und Lagerung 2,5µg/ml Actinomycin D zugegeben, um eine Färbung aller nun permeabilisierten Zellen durch diffundierendes 7-AAD zu unterbinden.

3.5.1.2. Färbung von intrazellulären Antigenen:

Methode: Bei allen Färbungen, außer denen nach BrdU, wurden die fixierten Zellen pelletiert (2min, 350g, 4°C) und einmal mit Saponinpuffer gewaschen (2min, 350g, 4°C). Dieser Puffer wurde auch bei allen folgenden Schritten bei denen das Zytoplasma zugänglich sein sollte verwendet. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde jeweils zu der ersten Antikörperlösung 5µg/ml Rate:Maus (1:1) IgG Antikörper zugegeben. Das Pellet wurde anschließend in 50µl Puffer, nach Zugabe der vom Hersteller empfohlenen bzw. in Vorversuchen austitrierten Menge an Antikörper, resuspendiert und für 30min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte mit 100µl Puffer (2min, 350g, 4°C). Falls erforderlich wurde das Pellet im Anschluss daran in 50µl Puffer mit der entsprechenden Konzentration des jeweiligen Streptavidin - Konjugats resuspendiert, erneut für 30min bei 4°C inkubiert und hiernach zweimal gewaschen (2min, 350g, 4°C). Das Pellet wurde resuspendiert, für 5min bei 4°C inkubiert, erneut pelletiert (2min, 350g, 4°C) und abschließend mit FACS - Puffer gewaschen (2min, 350g, 4°C).

Zur Detektion von nukleärem BrdU wurden die fixierten und pelletierten Zellen in 100µl DNase - Lösung aufgenommen und eine Stunde bei 37°C inkubiert, um durch diesen teilweisen DNA - Verdau das BrdU - Epitop für den Antikörper zugänglich zu machen. Dieser Antikörper wurde im Anschluss in der vom Hersteller empfohlenen Menge hinzu pipettiert. 5µg/ml Rate:Maus (1:1) IgG Antikörper und etwaige weitere Antikörper für andere intrazelluläre Epitope wurden ebenfalls beigegeben. Nach Inkubation für 30min bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension mit BACS - Puffer gewaschen (10min, 350g, 4°C), in 100µl Puffer resuspendiert und belassen (5min, RT), ehe ein abschließender Waschschritt folgte (10min, 350g, 4°C).

3.5.1.3. Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen:

Zur Markierung von Zellen zu Beginn der Versuche wurden die Farbstoffe CFSE und CMTMR (CellTracker Orange) verwendet. Beide Reagenzien können passiv die Membran passieren und werden durch zelluläre Esterasen gespalten. Die Spaltprodukte sind fluoreszent und binden sich kovalent an freie Aminogruppen intrazellulärer Proteine. Derartige Markierungen fanden unter anderem Verwendung einerseits bei dem nichtradioaktiven Zytotoxizitätstest (Aichele et al. 1997, Hernandez et al. 2001, Coles et al. 2002, Mueller et al. 2002), bei dem, als Alternative zum ⁵¹Cr - Freisetzungstest (Brunner et al. 1968), der Fluoreszenzfarbstoff das Radioisotop ersetzt. Zum anderen wurden Zellen für Proliferationsstudien mit CFSE markiert. Da die Färbung langlebig ist und bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen weitergegeben wird, gibt die Fluoreszenzintensität Auskunft über die Anzahl der erfolgten Zellteilungen.

Methode: Die Zellen wurden zu 2-4 x 10⁷ Zellen in GBSS (RT) aufgenommen und zügig mit einem Volumen einer zweifach konzentrierten Farbstofflösung (in GBSS, RT) gemischt. Die resultierende Farbstoffkonzentration ergab sich aus der angestrebten Färbeintensität und lag zwischen 0,1-20µM/ml. Die Zellen wurden 15min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (10min, 350g, 4°C).

3.5.1.4. Messung am Durchflusszytometer:

Methode: Eine etwaige Lagerung der Mikrotiterplatten erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Für die Messung wurden die Zellen pelletiert (2min, 4°C, 350g), in 100-200µl Puffer resuspendiert und in die 6,0/38mm Einmahlröhrchen überführt. Als Ständer für die Einmahlröhrchen wurden 96-Loch Mikrotiterplatten mit flachem Boden verwendet. War ein Vergleich der absoluten Zellzahlen zwischen einzelnen Proben erwünscht, so wurde diesen Ansätzen kurz vor der Messung je 50-100µl der Bead - Lösung zugegeben und gemischt.

Die Messungen erfolgten nach Entfernen der Übernadel ('outer sleeve'). Zur Einstellung des Durchflusszytometers wurden Einzelfärbungen und Isotypenkontrollen verwendet. Die Bedienung der Durchflusszytometer erfolgte nach Herstellerangaben und die Daten wurden mit den mitgelieferten Programmen 'CellQuest' und 'CellQuest Pro' ausgewertet. Zur Berechnung der Zytotoxizität wurde das in 'CellQuest Pro' ermittelte Verhältnis aus der Zellmenge der Targetzellen (R_T) zu derjenigen der Kontrollzellen (R₀) in das 'Exel' - Programm (Microsoft) exportiert. Dieses Verhältnis R_T:R₀ wurde in den Kontrolltieren (∅) gemittelt und als 0% Zytotoxizität gesetzt. Die spezifische Zellyse in den Versuchstieren (*) in Prozent wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Zytotoxizität* (\%)} = 100 - (((R_T:R_0) * 100) / (R_T:R_0)^2)$$

3.5.2. Sandwich - ELISA

Der Sandwich - ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Verfahren welches die quantitative Detektion löslicher Proteine bis in den Pikogrammbereich erlaubt (Engall et al. 1971, Mosmann et al. 1989). Das Protein wird hierbei mittels eines Antikörpers an die feste Phase gebunden und mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, der ein nicht-kompetitives zweites Epitop des Proteins erkennt, detektiert. Durch Zugabe einer Detektionslösung setzt das an den Antikörper konjugierte Enzym Peroxidase ein Substrat in ein farbiges Produkt um. In allen verwendeten Lösungen wurde auf Natriumazid verzichtet, da dies die Peroxidase irreversibel blockiert.

Material: ELISA - Lesegerät

Mikrotiterplatten-Waschgerät

‘MaxiSorp’ 96-Loch Mikrotiterplatten mit flachen Boden

Lösungen:

Coating-Puffer: 0,1M Na₂HPO₄, pH 8,5 (eingestellt mit 0,1M NaH₂PO₄)

Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20

Blockierungspuffer: PBS, 1% BSA

ABTS Puffer: 0,1M Na₂HPO₄, pH 4,2 (eingestellt mit 1M Zitronensäure)

Detektionslösung A: ABTS-Puffer, 1mg/ml ABTS, 2µl/ml 30% H₂O₂

Detektionslösung B: BM Blue Soluble

Stoplösung: 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

Methode:

Die 96-Loch Mikrotiterplatten wurden zunächst mindestens vier Stunden mit dem primären Antikörper (100µl/Loch) gegen das entsprechende Protein in Coating-Puffer beschichtet. Die Konzentrationen aller eingesetzten monoklonaler Antikörper wurden in Vorversuchen an Hand aufgereinigter Proteine bestimmt. Alle Inkubationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die primäre Antikörperlösung verworfen, die Platte extensiv gewaschen und verbliebene freie Proteinbindungsstellen mit 250µl/Loch Blockierungspuffer für mindestens 30 Minuten abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden 50-100µl/Loch der in Frage stehenden Lösungen und der Standardlösungen aufgebracht und für mindestens sechs Stunden inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen oder verworfen, die Platte gewaschen und 100µl/Loch des biotinylierten sekundären Antikörpers in PBS oder Blockierungspuffer hinzu gegeben. Die Platte wurde nach Inkubation für mindestens 4 Stunden extensiv gewaschen und 100µl/Loch einer 1:1000 Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase in PBS hinzu pipettiert. Nach 30-45 Minuten und extensivem Waschen der Platte wurde zügig 100µl/Loch der Detektionslösung aufgebracht und die Messung vorgenommen.

Es kamen hierbei zwei Detektionsmethoden zum Einsatz. In den meisten Fällen wurde frische Detektionslösung A verwendet deren grüne Farbreaktion wiederholt bei 405nm gemessen wurde. Bei Messungen die eine höhere Sensitivität erforderten, wurde Detektionslösung B eingesetzt. Die zunächst blaue Farbreaktion wurde wiederholt bei 450nm gemessen, anschließend mit 50µl Stoplösung beendet und die Absorption der nun gelben Lösung bei 650nm erneut aufgenommen.

Die exakten Proteinkonzentrationen wurden vom Programm ‘SPF 2.6’ (Molecular Devices) an Hand der mitgeführten Verdünnungsreihe des jeweiligen Proteins in PBS errechnet. Die Standardkurve wurde hierbei mit der Einstellung ‘4-Parameter’ erstellt.

3.6. Statistische Analysen:

Methode: Sofern nicht anders angegeben, sind Fehlerabweichungen als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Hierzu wurde mit Hilfe des Excel - Programms (Microsoft), aus den Einzelwerten die Standardabweichung und hieraus der Standardfehler des Mittelwerts errechnet. Signifikanzberechnungen wurden im selben Programm mittels des zweiseitigen, homoskedastischen t-Tests durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war, zum Verständnis der Rolle beizutragen, die NKT - Zellen innerhalb des immunologischen Mikromilieus der Leber spielen. Hierzu lag der Schwerpunkt einerseits auf der Untersuchung isolierter NKT - Zelleigenschaften nach Aktivierung (4.1.), sowie ihrer spontanen Zytotoxizität (4.2.), und andererseits, wie sich diese Funktionen in der Wechselwirkung mit antigen - präsentierenden Zellen, insbesondere mit LSEC, entfalten und welche Auswirkungen eine derartige Interaktion auf das angeborene und adaptive Immunsystem besitzt (4.3.).

4.1. Aktivierung und Regulation von NKT - Zellen infolge α -CD3 β Antikörpergabe *in vivo* im Vergleich zu anderen Lymphozyten

NKT - Zellen stehen phänotypisch und funktionell zwischen den NK- und T - Zellen und schlagen hierdurch eine Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Einer solchen Vermittlerfunktion entsprechend berichten eine Vielzahl von Veröffentlichungen eine wesentliche Rolle von NKT - Zellen in der Frühphase vieler und verschiedenster Immunreaktionen. Interessant hierbei ist die Beteiligung von NKT - Zellen an Immunreaktionen, die sowohl zu Immunität als auch zur Toleranz führen. Somit scheinen NKT - Zellen mit darüber zu entscheiden, welche Immunreaktion unter gegebenen Bedingungen angemessen ist (s. Einleitung).

4.1.1. Mechanismen der Aktivierbarkeit von NKT- und T - Zellen *in vivo* durch α -CD3 β Antikörpergabe

Um ein besseres Verständnis für die Rolle der NKT - Zellen innerhalb von Immunreaktionen zu erlangen, wurden die Eigenschaften von NKT - Zellen näher untersucht und jeweils mit denjenigen von NK- und T - Zellen verglichen.

4.1.1.1. *In vivo* Aktivierung von NKT- und T - Zellen durch α -CD3 β Antikörper:

Die intravenöse Gabe geringer Mengen (1-4 μ g/Tier) α -CD3 β Antikörper des Klons 145.2C11 (Leo et al. 1987) führt zu einer *in vivo* Aktivierung der NKT - Zellen innerhalb von 30 Minuten, gekennzeichnet durch die Freisetzung großer Zytokinmengen, insbesondere Interferon (IFN) γ und Interleukin (IL) -4 (Yoshimoto et al. 1994, Eberl et al. 1998).

Diese intravenöse α -CD3 β Antikörpergabe wurde als Modellsystem einer *in vivo* NKT - Zellaktivierung eingesetzt. Der Fragestellung dieser Arbeit entsprechend wurde insbesondere die Frühphase einer solchen Aktivierung eingehender untersucht.

Hierbei wurden C57BL/6 Mäusen intravenös 1 μ g α -CD3 β Antikörper appliziert und die Lymphozyten verschiedener Organe nach 45 Minuten aufgereinigt und mit fluorochrom - konjugierten α -NK1.1 bzw. α -T-Zellrezeptor β (TCR β) Antikörpern gefärbt. Diese Färbung

erlaubt eine durchflusszytometrische Unterscheidung von NKT- ($\text{TCR}^+ \text{NK1.1}^+$) konventionellen T- ($\text{TCR}^+ \text{NK1.1}^-$) und konventionellen NK - Zellen ($\text{TCR}^- \text{NK1.1}^+$).

In Abbildung 2. sind die Ergebnisse für Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) wiedergegeben. Deutlich ist die Abnahme der TCR^+ - Expression auf der Zelloberfläche von NKT- und schwächer auf T - Zellen zu erkennen (Abb. 2). Eine saubere Trennung der NKT- von der NK - Zellpopulation war hierdurch kaum mehr möglich. Eine vergleichbare Herunterregulation des $\text{TCR}/\text{CD3}$ - Komplexes war in keinem der anderen untersuchten Organe (Milz, Lymphknoten, Thymus, peripheres Blut) zu beobachten.

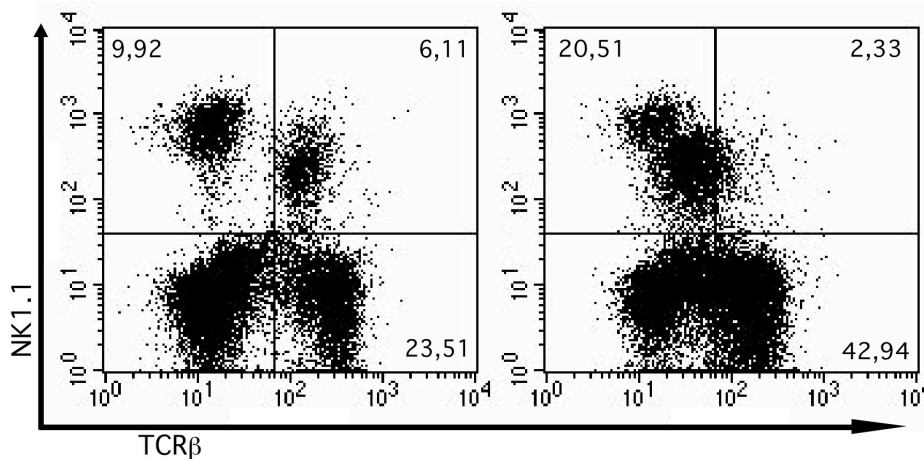


Abbildung 2. Intravenös Applikation von α -CD3 α Antikörpern führt zu einer verminderten Oberflächenexpression des TCR^+ auf NKT- und T - Zellen: C57BL/6 Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 α Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach 45 Minuten wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) aufgereinigt, mit α -TCR (H57-597) und α -NK1.1 (PK136) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In den Graphen ist die Fluoreszenzintensitäten für TCR^+ und NK1.1 aller aufgereinigten Lymphozyten eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen Quadranten in Prozent wieder. linker Graph: Oberflächenfärbung der Zellen nach PBS - Behandlung; rechter Graph: Oberflächenfärbung der Zellen nach α -CD3 α Antikörperbehandlung.

Eine verminderte Oberflächenexpression des TCR^+ infolge der α -CD3 α Antikörperstimulation auf Lymphozyten, insbesondere NKT - Zellen, ist deutlich sichtbar.

Es ist bekannt, dass T - Zellen infolge einer Stimulation via den T - Zellrezeptor den $\text{TCR}/\text{CD3}$ - Komplex von der Zelloberfläche ins Zellinnere verlagern (Valitutti et al. 1995, 1997). Eine derartige durch Internalisierung bedingte Abnahme der Oberflächenexpressionsstärke des $\text{TCR}/\text{CD3}$ - Komplexes kann selbst als qualitatives und quantitatives Anzeichen einer T - Zellrezeptor vermittelten Aktivierung herangezogen werden (Valitutti et al. 1995, 1997) und ist vermutlich die Ursache dafür, dass NKT - Zellen nach *in vivo* Aktivierung nicht mehr detektiert werden konnten (z.B. Carnaud et al. 1999).

Um NKT- und T - Zellen auch nach dem weitgehenden Verlustes des T - Zellrezeptors von der Zelloberfläche noch identifizieren zu können, wurde in den meisten Färbungen der TCR/CD3 - Komplex intrazellulär gefärbt, um neben den Epitopen auf der Zellmembran, auch diejenigen in den internalisierten Vesikeln zugänglich zu machen.

Zur Validierung dieses Vorgehens wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) *in vitro* stimuliert und anschließend die TCR β - Kette extrazellulär bzw. intrazellulär gefärbt. Parallel hierzu wurde ein Aliquot der LAL vor der Stimulation mit fluoreschromierten α -NK1.1 bzw. α -TCR β Antikörpern angefärbt.

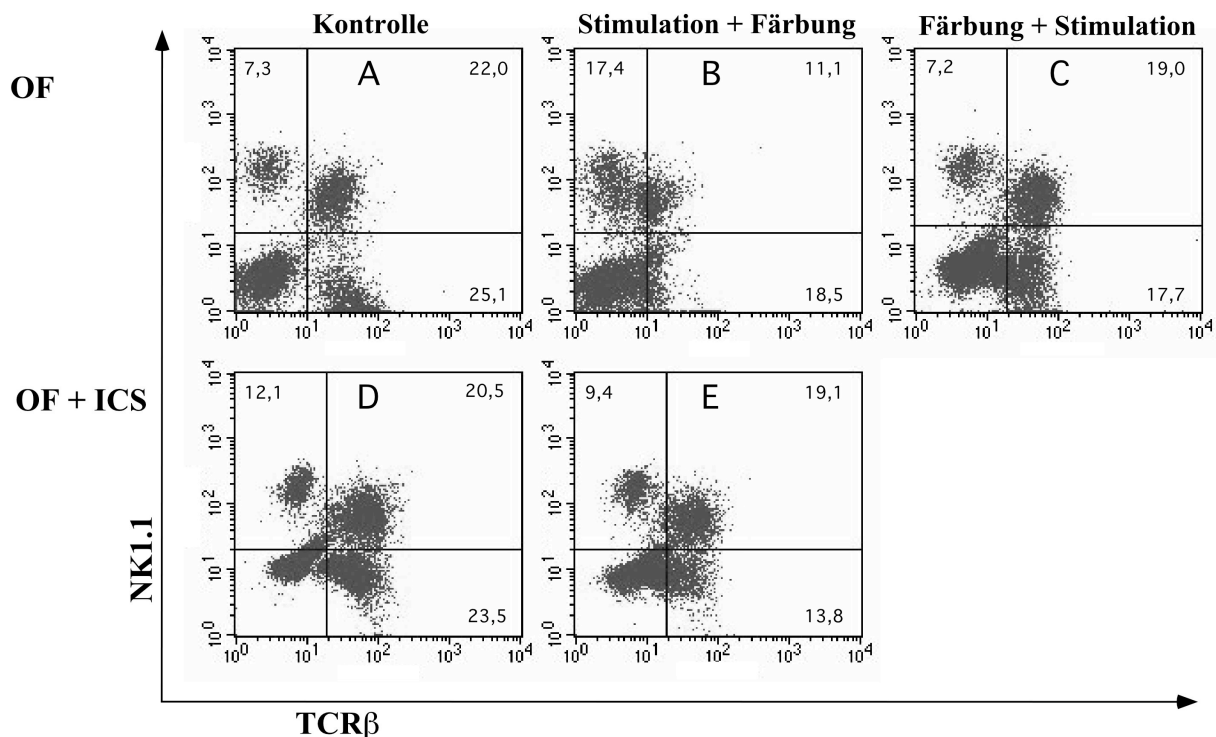


Abbildung 3. Internalisierung des T - Zellrezeptors nach Stimulation und verbesserte Detektion durch intrazelluläre Färbung: Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) wurden aus (B6/D2) F_1 Mäusen aufgereinigt und *in vitro* mit PMA (130ng/ml) und α -CD3 β Antikörpern (1 μ g/ml, Klon 17A2) stimuliert. Ein Ansatz wurde bereits vor der Stimulation mit α -TCR β (H57-597) und α -NK1.1 (PK136) Antikörpern gefärbt (C). Die anderen stimulierten Ansätze wurden nach drei Stunden Inkubation entweder extrazellulär (A und B) oder zusätzlich intrazellulär (D und E) mit α -TCR β und α -NK1.1 Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben ist die Fluoreszenzintensitäten für TCR β und NK1.1 aller aufgereinigten Lymphozyten eines repräsentativen Experiments nach der *in vitro* Kultur. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen Quadranten in Prozent wieder.

A: unstimulierte Zellen nach Oberflächenfärbung; **B:** stimulierte Zellen (3h PMA und α -CD3 β) nach Oberflächenfärbung; **C:** Oberflächenfärbung der Zellen, nebst anschließender Stimulation (3h PMA und α -CD3 β); **D:** unstimulierte Zellen nach intrazelluläre Färbung; **E:** stimulierte Zellen (3h PMA und α -CD3 β) nach intrazelluläre Färbung.

Die intrazelluläre Färbung (E) erlaubt eine bessere Trennung der Zellpopulation nach Stimulation, als die reine Oberflächenfärbung (B), da die bereits internalisierten Epitope (C) ebenfalls gefärbt werden. Der Unterschied des relativen, prozentualen Anteils der NKT - Zellen an der Gesamtzellzahl in verschiedenen Experimenten (s. z.B. Abb. 2 links vs. Abb. 3A) beruht auf den beiden verwendeten Aufreinigungsmethoden der Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) mit und ohne Kollagenaseverdau (s. 3.2.6.2.). Kleinere Unterschiede hinsichtlich der Prozentwerte der Zellpopulationen zwischen den verschiedenen Behandlungen, sind auf die durch die Fixation bedingten unterschiedlichen Einstellungen am Durchflusszytometer zurückzuführen.

Die *in vitro* stimulierten Zellen zeigten in der Analyse deutlich eine verminderte Oberflächenexpression des TCR α im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 3B vs. A). Das Verteilungsmuster der verschiedenen Zellpopulationen bei den vor der Stimulation gefärbten Zellen war dem der Kontrolle (Abb. 3C vs. A) vergleichbar. Dies legte eine Internalisierung des TCR/CD3 - Komplexes nahe. Dass es sich tatsächlich um eine Internalisierung des T - Zellrezeptors handelte, und nicht um eine etwaige enzymatische Entfernung des Moleküls von der Oberfläche ('*shedding*'), zeigte die Oberflächenfärbung vor der Stimulation (Abb. 3C), deren Ergebnis vergleichbar zur reinen Oberflächenfärbung oder der intrazellulären Färbung war (Abb. 3A und D).

Der Vergleich der Messungen der stimulierten Zellen nach reiner Oberflächenfärbung (Abb. 3B) und nach kombinierter intrazellulärer Färbung (Abb. 3E) zeigt deutlich, dass letztere besser geeignet ist, NKT - Zellen innerhalb eines heterogenen Zellgemisches nach einer Stimulation zu detektieren.

Deshalb wurde diese kombinierte intrazelluläre Färbung der TCR/CD3 - Komplexes in den meisten Experimenten verwendet, um eine Detektion der einzelnen T - Zellpopulation auch nach einer Internalisierung des T - Zellrezeptors *ex vivo* zu ermöglichen.

Im Folgenden wurden C57BL/6 bzw. (B6/D2)F₁ Mäuse 1 μ g α -CD3 α Antikörper des Klons 145.2C11 intravenös injiziert. Nach circa einer Stunde wurden die Lymphozyten aus den verschiedenen Organen aufgereinigt und auf NKT-, T- und NK - Zellen gefärbt. Die kombinierte intrazelluläre Färbung erlaubte auch in diesem Fall eine bessere Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen, als die reine Oberflächenfärbung (Abb. 4A).

Neben einer verminderten TCR α Oberflächenexpression, konnte als weiteres Anzeichen einer *in vivo* Stimulation nach α -CD3 α Antikörperinjektion die rasche Expressionszunahme des frühen Aktivierungsmarkers CD69 herangezogen werden. Als Test ob die Lymphozyten nach *in vivo* α -CD3 α Antikörperstimulation auch Effektorfunktionen ausführen, wurden die Zellen auf intrazelluläres IFN γ direkt nach der Isolation ('*ex vivo*') gefärbt.

In Übereinstimmung mit dem beschriebenen aktivierten Phänotyp (s. Einleitung), waren in den Kontrollmäusen 75,3% (\pm 5,7%) der Leber NKT - Zellen bzw. 56,9% (\pm 7,2%) der Milz NKT - Zellen positiv für CD69 (Abb. 4B und D, und Abb. 5B). Der Anteil der CD69⁺ NKT - Zellen in der Leber stieg nach α -CD3 α Antikörperinjektion noch weiter an (auf 92,7% \pm 0,9%, Abb. 5B), so dass praktisch alle NKT - Zellen in der Leber CD69⁺ wurden (Abb. 4B). Deutlich nahm hierbei auch die Expressionsstärke des CD69 Markers auf den NKT - Zellen zu (Abb. 4B). Interessanterweise zeigte sich kein vergleichbarer Anstieg an CD69 in der Milz (Abb. 4D und Abb. 5B), obwohl 22,3% (\pm 6,5%) dieser NKT - Zellen IFN γ produzierten (Abb. 5E).

In der Leber hingegen korrelierte der CD69 - Anstieg eindeutig mit der IFN γ Produktion. Eine Stunde nach der α -CD3 γ Antikörperinjektion waren 55,6% (\pm 8,5%) der Leber NKT - Zellen IFN γ ⁺ (Abb. 5E). Darüber hinaus waren 30,4% (\pm 1,5%) der Leber NKT - Zellen auch positiv für IL-4, und 38,7% (\pm 4,2%) positiv für TNF α . In der Milz lagen die Werte deutlich niedriger. Hier waren eine Stunde nach der α -CD3 γ Antikörperinjektion 22,3% (\pm 6,5%) der NKT - Zellen positiv für IFN γ (Abb. 5E), 17,0% (\pm 0,2%) positiv für IL-4, und 23,5% (\pm 9,3%) positiv für TNF α . Dies entsprach 57,6% (IFN γ) bzw. 55,9% (IL-4) bzw. 60,7% (TNF α) des relativen Zellanteil an zytokin - positiven Zellen in der Leber.

Somit fand sich, die nach Eberl et al. (1998) zu erwartende, *in vivo* Aktivierung von NKT - Zellen durch α -CD3 γ Antikörper vornehmlich in der Leber und zu einem geringeren Umfang in der Milz.

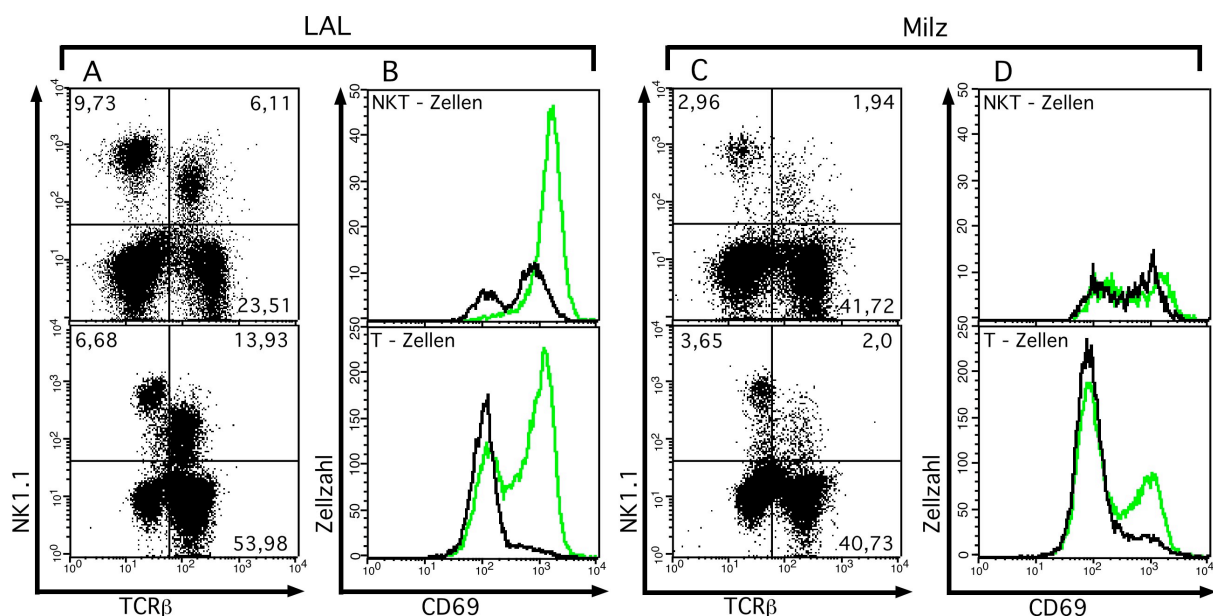


Abbildung 4. Intravenös Applikation von α -CD3 γ Antikörpern führt zu einem aktivierten Phänotyp von NKT- und T - Zellen: (B6/D2)_{F1} Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 γ Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und Milzlymphozyten aufgereinigt, mit α -TCR β (H57-597), α -NK1.1 (PK136) und α -CD69 (H1.2F3) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

A und C: In den Graphen ist die Fluoreszenzintensitäten für TCR β und NK1.1 aller aufgereinigten Lymphozyten aus LAL (A) bzw. Milz (C) nach PBS- (oberer Graph) oder α -CD3 γ Antikörperbehandlung (unterer Graph) dargestellt. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen Quadranten in Prozent wieder. **B und D:** Die Histogramme geben die Expression an CD69 auf den NKT- bzw. T-Zellen aus LAL (B) bzw. Milz (D) von Kontroll- (schwarz) und α -CD3 γ Antikörper behandelten Mäusen (grün) wieder.

Eine verminderte Oberflächenexpression des TCR β auf den Lymphozyten, insbesondere den NKT - Zellen, ist in der Leber, nicht aber der Milz deutlich sichtbar. Es lässt sich des Weiteren eine verstärkte CD69 - Expression auf NKT- und T - Zellen der Leber, und weniger ausgeprägt auf T - Zellen in der Milz erkennen.

Überraschenderweise und entgegen diesen früheren Veröffentlichungen (Eberl et al. 1998) zeigte sich ein solcher α -CD3 ϵ vermittelter Anstieg der CD69 - Expression auch auf konventionellen T - Zellen in der Leber und, deutlich schwächer, innerhalb der Milz (Abb. 4B und D und Abb. 5A). In der Leber waren eine Stunde nach Antikörperinjektion 60,4% (\pm 2,1%) der T - Zellen positiv für CD69, im Vergleich zu 7,9% (\pm 1,2%) in den Kontrollmäusen (Abb. 5A). In der Milz stieg der Anteil der CD69⁺ T - Zellen von 7,7% (\pm 1,7%) auf 37,1% (\pm 2,7%) (Abb. 5A). In beiden Organen waren deutlich zwei Population als CD69⁺ und CD69⁻ zu erkennen (Abb. 4B und D).

Übereinstimmend mit dieser vermuteten Stimulation, angezeigt durch diesen Anstieg eines frühen Aktivierungsmarkers, fand sich innerhalb der T - Zellpopulation auch IFN γ ⁺ Zellen: In der Leber 8,6% (\pm 2,7%), in der Milz 1,8% (\pm 0,4%), verglichen mit unter 0,1% in T - Zellen beider Organen aus den Kontrollmäusen (Abb. 5D). Die IFN γ Produktion korrelierte allerdings nur schwach mit einer CD69 Expression. Von den CD69⁺ T - Zellen produzierten lediglich 14,2% der in der Leber bzw. 4,9% in der Milz auch IFN γ (Abb. 5A vs. D).

Eine Färbung für IL-4 oder TNF α innerhalb der T - Zellen eine Stunde nach α -CD3 ϵ Antikörpergabe war nicht zu beobachten.

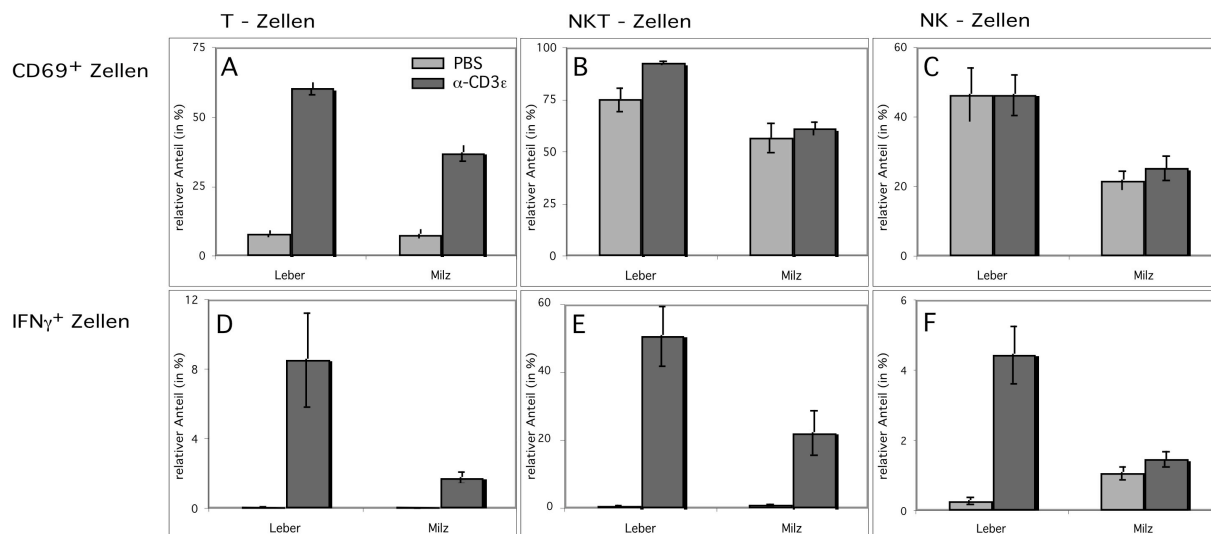


Abbildung 5. Die Expression an CD69 und IFN γ auf Leber- und Milzlymphozyten nach α -CD3 Antikörpergabe *in vivo*: (B6/D2)F₁ Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 ϵ Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und Milzlymphozyten aufgereinigt, mit α -TCR ϵ (H57-597), α -NK1.1 (PK136), α -CD69 (H1.2F3) und α -IFN γ (XMG1.2) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der relative Anteil der CD69⁺ (A-C) bzw. IFN γ ⁺ (D-F) Zellen innerhalb der beiden Organe in Prozent nach PBS- (linker, grauer Balken) oder α -CD3 ϵ Antikörperbehandlung (rechter, schwarzer Balken).

A: CD69 - Expression auf T - Zellen; **B:** CD69 - Expression auf NKT - Zellen; **C:** CD69 - Expression auf NK - Zellen; **D:** IFN γ - Expression auf T - Zellen; **E:** IFN γ - Expression auf NKT - Zellen; **F:** IFN γ - Expression auf NK - Zellen; **linker Balken:** PBS - Behandlung; **rechter Balken:** α -CD3 ϵ Antikörperbehandlung. Anzahl der analysierten Tiere, bei mindestens zwei unabhängigen Experimenten, für CD69: 4x PBS und 8x α -CD3 ϵ (Leber und Milz), bei IFN γ : 3x PBS (Leber) bzw. 4x PBS (Milz) und 8x α -CD3 ϵ (Leber und Milz). Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (Erläuterung s. Text)

Außer bei NKT- und T - Zellen, fanden sich IFN γ Zellen nur innerhalb der NK - Zellpopulation und dies, von allen untersuchten Organen (Leber, Milz, peripheres Blut, Lymphknoten, Thymus), nur in der Leber (Abb. 5F). Diese IFN γ Produktion war jedoch eine Stunde nach Injektion noch nicht von einem Anstieg der CD69 - Expression bekleidet (Abb. 5C). Eine Expressionszunahme des CD69 - Moleküls war auf keinen Zellen in Lymphknoten oder Thymus zu beobachten.

4.1.1.2. Bindung von α -CD3 γ Antikörpern an NKT- und T- Zellen *in vivo*:

Das Auftreten von CD69⁺ und IFN γ Zellen in der Milz nach α -CD3 γ Antikörperinjektion (Abb. 4D und Abb. 5) lässt vermuten, dass der Antikörper auch die Milz erreichte. Um zweifelsfrei die Frage zu klären, ob und in welchem Umfang der injizierte Antikörper die unterschiedlichen Organe erreicht, wurde 2,5 μ g des fluorochrom - markierter α -CD3 γ Antikörpers intravenös appliziert und dessen Bindung an Lymphozyten nach 30-45 Minuten *ex vivo* gemessen (Abb. 6).

Wie Abbildung 6. zeigt, waren nach dieser Behandlung praktisch alle (>92%) TCR γ ⁺ Zellen in der Leber mit dem fluorochromierten α -CD3 γ Antikörper markiert, hingegen nur ca. 40% in der Milz (Abb. 6A und B). In Lymphknoten waren lediglich 1-1,5%, und im Thymus praktisch keine (<0,1%) mit dem fluorochromierten α -CD3 γ Antikörper gefärbte Zellen zu detektieren (Abb. 6C und D). Des Weiteren war die Fluoreszenzintensität der α -CD3 γ markierten Zellen innerhalb der Milz in allen Experimenten leicht, und im Lymphknoten deutlich schwächer als diejenige in der Leber (Abb. 6B und C vs. A). So lag das Kurvenmaximum für die markierten Zellen in der Leber bei Kanal 158, in der Milz bei Kanal 128 und im Lymphknoten bei 100. In der Milz fand sich eine bimodale Verteilung der α -CD3 γ Markierung (Abb. 6B).

Eine Verzehnfachung der injizierten Antikörpermenge lieferte vergleichbare Ergebnisse, lediglich die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen aller untersuchten Organe, als auch diejenige der vormals unmarkierten Milzzellen stieg an (Abb. 6E und F).

Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass der injizierte α -CD3 γ Antikörper sowohl die Leber als auch die Milz erreicht, jedoch kaum bzw. nicht die Lymphknoten bzw. den Thymus. Die bimodale Verteilung der Fluoreszenzintensität in der Milz legt nahe, dass es innerhalb der Milz Bereiche gab, die vom α -CD3 γ Antikörper leicht bzw. kaum erreicht wurden. Dies dürfte auch erklären, warum der Anteil der CD69⁺, als auch der IFN γ T- Zellen in der Milz nach der α -CD3 γ Antikörpergabe geringer lag als in der Leber: für CD69 37,1% (Milz) gegenüber 60,4% (LAL), und für IFN γ 1,8% (Milz) gegenüber 8,6% (LAL) (Abb. 5).

Somit zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen der *in vivo* Verteilung intravenös injizierter α -CD3 Antikörpern und dem beobachteten Grad der T - Zellaktivierung.

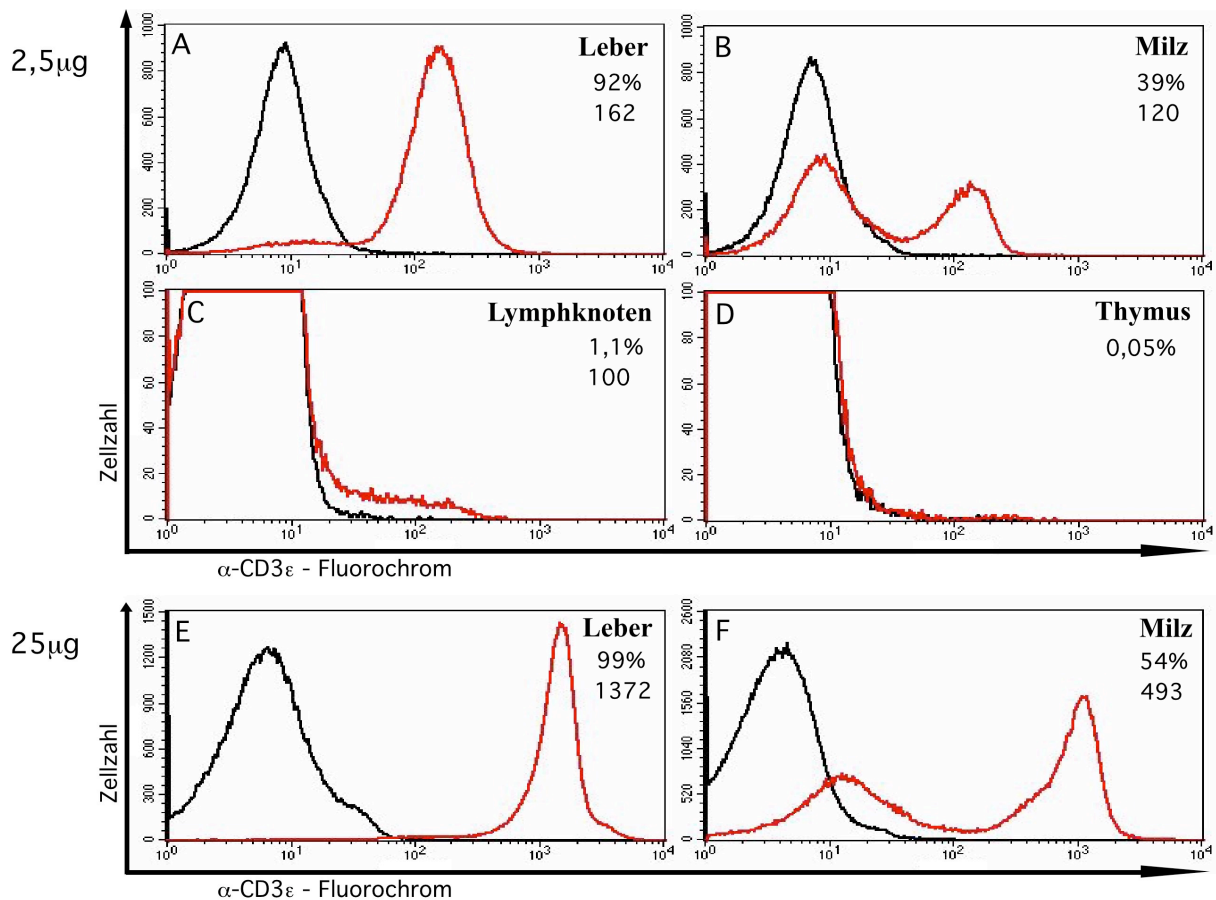


Abbildung 6. Die Bindung fluorchrom - markierter α -CD3 Antikörper an TCR⁺ Lymphozyten *in vivo*: (B6/D2)_F₁ Mäusen wurde intravenös 2,5 µg FITC- bzw. 25 µg PE - konjugierter α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach 45 Minuten wurden Lymphozyten aus Leber, Milz, Lymphknoten und Thymus aufgereinigt, mit α -TCR (H57-597) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme geben die Fluoreszenzintensität des fluorchromierten α -CD3 Antikörpers auf TCR⁺ Zellen der angegebenen Organe von PBS- (schwarz) und α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen (rot) wieder. Für Lymphknoten und Thymus ist nur ein Ausschnitt aller Zellen wiedergegeben, um die geringe Anzahl an markierten Zellen sichtbar zu machen. Wiedergegeben sind die Ergebnisse zweier repräsentativer Experimente.

A-D: Fluoreszenzintensität der 2,5 µg fluorchromierten α -CD3 Antikörpers auf TCR⁺ Zellen der angegebenen Organe; **E und F:** Fluoreszenzintensität der 25 µg fluorchromierten α -CD3 Antikörpers auf TCR⁺ Zellen der angegebenen Organe; **schwarz:** PBS - Behandlung; **rot:** α -CD3 Antikörperbehandlung. Die erste Zahl gibt den Anteil der mit dem fluorchromierten α -CD3 Antikörper markierten Zellen in Prozent wieder. Die zweite Zahl gibt die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dieser markierten Zellen an.

Das Kurvenmaximum der markierten Zellen lag nach der 2,5 µg α -CD3 Antikörpergabe im Kanal 158 (Leber) bzw. 128 (Milz) bzw. 100 (Lymphknoten) und nach der 25 µg α -CD3 Antikörpergabe im Kanal 1369 (Leber) bzw. 1134 (Milz).

4.1.1.3. Einfluss der α -CD3 β Antikörpermenge auf die Frühphase der Aktivierung:

Zum Test, ob die beobachtete Stimulation einer Subpopulation der TCR β^+ NK1.1 $^-$ T - Zellen nach intravenöser α -CD3 β Antikörperinjektion ein Dosisseffekt der eingesetzten Antikörpermenge oder eine Eigenschaft der reagierenden Zellen ist, wurde die injizierte Antikörpermenge erhöht. Nach intravenöser Injektion einer 100fach höheren α -CD3 β Antikörpermenge (d.h. 100 μ g/Tier), zeigten die Analysen vergleichbare Ergebnisse für das Ausmaß der gemessenen Aktivierung verglichen mit dem 1 μ g - Ansatz (Tab. 3). Der höhere Anteil an TCR β^+ CD69 $^+$ Milzzellen infolge der 100 μ g α -CD3 β Antikörpergabe (Tab. 3) lässt sich mit der umfangreicheren Verteilung des Antikörpers innerhalb der Milz erklären (s. Abb. 6F vs. B). Dies hatte allerdings keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion (Tab. 3). Insgesamt erschien lediglich die Kinetik der Aktivierung in der Leber nach der 100 μ g gegenüber der 1 μ g α -CD3 β Antikörperinjektion leicht beschleunigt (Tab. 3).

Dies legte den Schluss nahe, dass die beobachtete schnelle Aktivierbarkeit einer Subpopulation der konventionellen T - Zellen kein Artefakt der Antikörperdosis, sondern eine intrinsische Eigenschaft der reagierenden Zellen war.

(Angaben in %)	Leber					Milz				
	\emptyset	1 μ g		100 μ g		\emptyset	1 μ g		100 μ g	
TCR β^+ CD69 $^+$	16,8	77,4	72,8	81,7	83,7	9,1	40,5	44,7	60,3	69,7
IFN γ (alle Zellen)	0,9	12,7	10,5	14,8	14,3	0,2	3,2	3,4	2,6	3,1
TCR β^+ IFN γ	1,8	17,6	16,1	25,7	26,7	0,4	7,7	8,1	7,4	8,9
NK1.1 $^+$ TNF α $^+$ (1)	3,1	33,7	21	31,8	23,1	4,2	29,9	28,5	26,9	18,7

Tabelle 3. Vergleich der Aktivierung nach 1 μ g bzw. 100 μ g intravenöser α -CD3 β Antikörpergabe: (B6/D2) F_1 Mäusen wurde intravenös 1 μ g (zwei Tiere) bzw. 100 μ g (zwei Tiere) α -CD3 β Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Eine unbehandelte Maus diente als Kontrolle. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und Milzlymphozyten aufgereinigt, mit α -TCR β (H57-597), α -NK1.1 (PK136), α -CD69 (H1.2F3), α -IFN γ (XMG1.2) und α -TNF α (MP6-XT22) Antikörpern, in verschiedenen Kombinationen, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Aufgeführt sind die relativen Anteile der angegebenen Zellpopulation in den angegebenen Ansätzen in Prozent. (1) NK1.1 $^+$ Zellen produzierten kein TNF α .

4.1.1.4. Phänotyp der durch α -CD3 β Antikörperinjektion *in vivo* aktivierten TCR β^+ NK1.1 $^-$ T - Zellen:

Um weitere Informationen über die, nach intravenöser α -CD3 β Antikörpergabe, IFN γ produzierenden T - Zellen zu erhalten, wurden zusätzliche Oberflächenmarker in die Analyse einbezogen.

Hierbei ergab sich, dass nur diejenigen T - Zellen IFN γ produzierten, die CD69 und CD11a $^{\text{stark}}$ waren (Abb. 7A-D und Abb. 8). Insgesamt waren eine Stunde nach der intravenösen α -CD3 β Antikörpergabe 69,2% (\pm 4,4%) der CD11a $^{\text{high}}$ Zellen der Leber und 52,8% (\pm 4,3%) der Milz auch IFN γ . Konsistent exprimierten die IFN γ T - Zellen den Marker CD11a

stärker als IFN γ T - Zellen (Abb. 7E und F). CD11a^{stark} exprimierende Zellen waren darüber hinaus CD44^{stark} und CD62L^{low} (Abb. 7G und H).

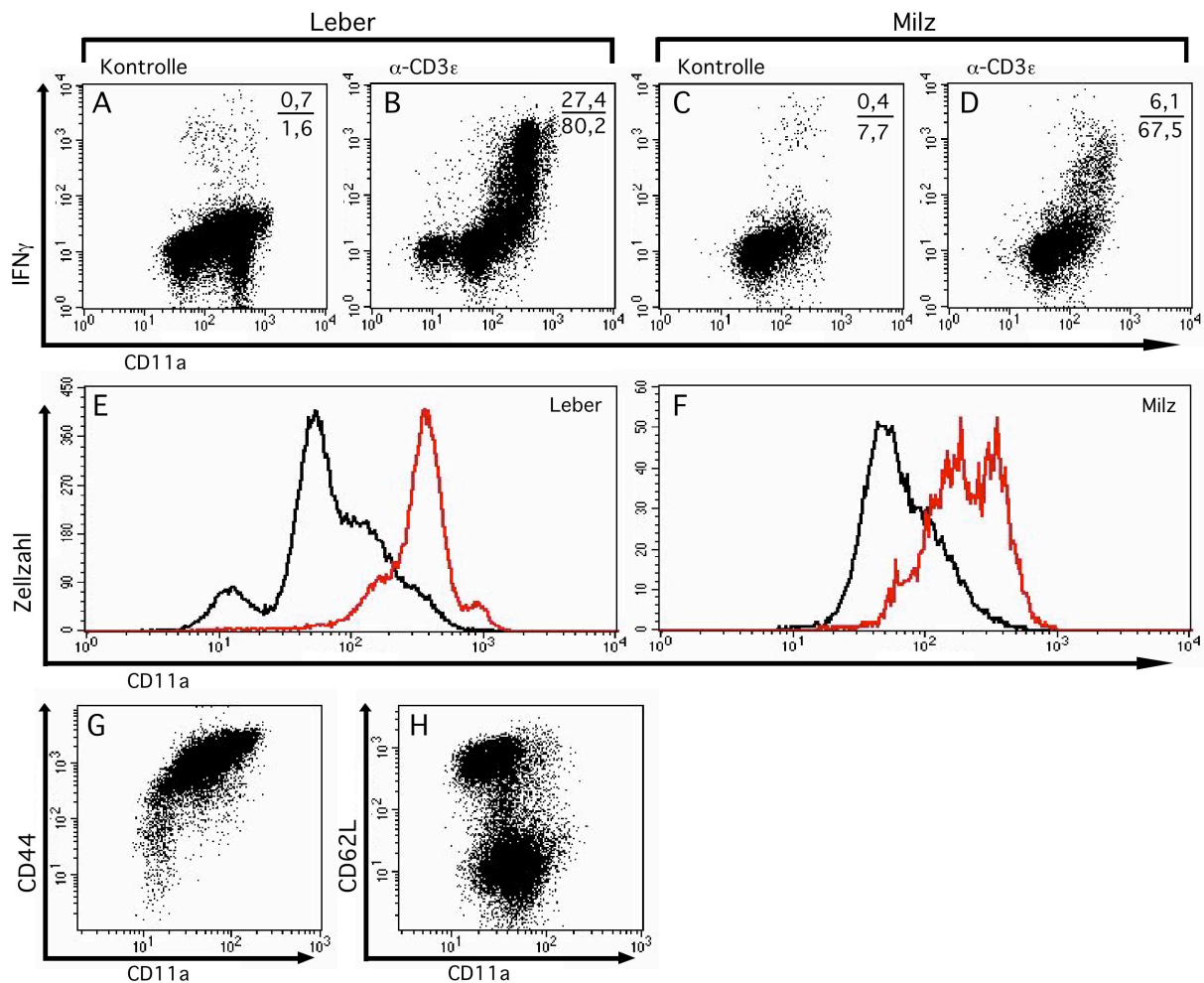


Abbildung 7. α -CD3 ϵ reaktive T - Zellen besitzen einen Phänotyp charakteristisch für Effektor- und Gedächtniszellen: (B6/D2)F₁ Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 ϵ Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und Milzlymphozyten aufgereinigt, mit α -TCR ϵ (H57-597), α -CD8 α (53-6.7), α -CD11a (2D7), α -CD44 (IM7), α -CD62L (MEL-14) und α -IFN γ (XMG1.2) Antikörpern, in verschiedenen Kombinationen, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse repräsentativer Experimente.

A-D: Dargestellt ist die Fluoreszenzintensitäten für CD11a und IFN γ auf den TCR ϵ positiven und TCR ϵ intermediären (TCR ϵ ^{+/int}) Zellen der angegebenen Ansätze. Die angegebenen Zahlen geben den Prozentanteil der IFN γ ⁺ Zellen innerhalb aller Lymphozyten (obere Zahl) bzw. innerhalb der CD11a^{stark} Zellen (untere Zahl) wieder. **E und F:** Die Histogramme geben die Expression an CD11a auf IFN γ (schwarz) und IFN γ ⁺ TCR ϵ ^{+/int} Zellen (rot) der Leber (E) bzw. der Milz (F) in den α -CD3 ϵ Antikörper behandelten Mäusen wieder. **schwarz:** PBS - Behandlung; **rot:** α -CD3 ϵ Antikörperbehandlung. **G:** Fluoreszenzintensitäten für CD11a und CD44 auf den TCR ϵ ^{+/int} Leberlymphozyten. **H:** Fluoreszenzintensitäten für CD11a und CD62L auf den CD8 α ⁺ Leberlymphozyten.

Die IFN γ produzierenden Zellen zeigen einen CD11a^{stark} TCR ϵ ^{+/int} Phänotyp.

Ein solcher Phänotyp für CD11a, CD44 und CD62L ist beschrieben für T - Zellen die bereits durch Antigenkontakt stimuliert worden waren (Sprent et al. 2002). Dies sind namentlich Effektor- T - Zellen (CD69⁺) und sogenannte Gedächtnis- T - Zellen (CD69⁻). Deshalb und im Einklang mit der Literatur (Cho et al. 1999) wurde in den weiteren Experimenten der CD11a^{stark} - Phänotyp als Surrogatmarker für Effektor- und Gedächtnis- T - Zellen verwendet.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die intravenöse Injektion von 1 µg α -CD3 Antikörpers innerhalb von einer Stunde sowohl NKT-, als auch T - Zellen eines Effektor-/Gedächtniszellenphänotyps aktiviert; gemessen an der Herunterregulation des TCR/CD3 - Komplexes, sowie der CD69- und IFN γ - Expression.

4.1.1.5. *In vivo* Restimulation von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen durch intravenöse α -CD3 Antikörpergabe:

Der Befund, dass durch α -CD3 Antikörper *in vivo* selektiv nur T - Zellen eines Effektor-/Gedächtniszellenphänotyps stimuliert werden, warf die Frage auf, ob dieses Protokoll auch methodisch für eine *in vivo* Restimulation derartiger Zellen eingesetzt werden könnte. Dies wäre, verglichen mit der bislang üblichen *in vitro* Restimulation, deutlich schneller und verbliebe näher an der *in vivo* Situation.

Zu diesem Zweck wurden Mäuse immunisiert und nach α -CD3 Gabe die T - Zellen auf antigen - spezifische MHC I - Tetramere und IFN γ gefärbt. Hierzu wurden RAG2^{-/-} Tiere mit OT-I Milzzellen rekonstituiert (RAG/OTI). OT-I Mäuse sind auf dem C57BL/6 Hintergrund transgen für einen V α 2V β 5 T - Zellrezeptor, der das SIINFEKL - Peptid, dem immundominanten Epitop des Hühnereiweißes Ovalbumin, im Kontext von H2-K^b erkennt. Die zum Nachweis der OT-I T - Zellen eingesetzten H2-K^b MHC I - Tetramere waren mit dem SIINFEKL - Peptid beladen (S*tet). Die RAG/OTI Tiere wurden subcutan (s.c.) mit Ovalbumin immunisiert und 57 Tage später analysiert.

Die transferierten OT-I Zellen waren in den RAG2^{-/-} Mäusen lebensfähig und konnten *ex vivo* detektiert werden (Abb. 8). In den rekonstituierten RAG/OTI machten die Tetramer - positiven CD8⁺ - Zellen etwa 2,2% (Leber) bzw. 3,6% (Milz) aller aufgereinigten Zellen aus. Nach der Immunisierung stieg der Anteil in der Leber auf ca. 7,9% an, während er in der Milz mit ca. 4,1% weitgehend gleich blieb. Nach der Antikörpergabe produzierten nur diejenigen CD8⁺ S*tet⁺ - Zellen deutlich IFN γ die aus den immunisierten Mäusen stammten (Abb. 8C und F). In der Leber waren ca. 66% der CD8⁺ S*tet⁺ - Zellen IFN γ - positiv, im Vergleich zu ca. 6% in den nicht immunisierten Mäusen (Abb. 8C). In der Milz lag der Anteil der IFN γ - positiven bei ca. 49%, im Vergleich zu ca. 3% in der Kontrolle (Abb. 8F). Auch in diesem Fall waren die IFN γ produzierenden Zellen CD11a^{stark} (Abb. 8A-B und D-E).

Diese Daten bestätigten die Annahme, dass die intravenöse α -CD3 Antikörpergabe (1 μ g/Maus) innerhalb von einer Stunde ausschließlich T - Zellen eines Effektor-/Gedächtniszellenphänotyps aktiviert.

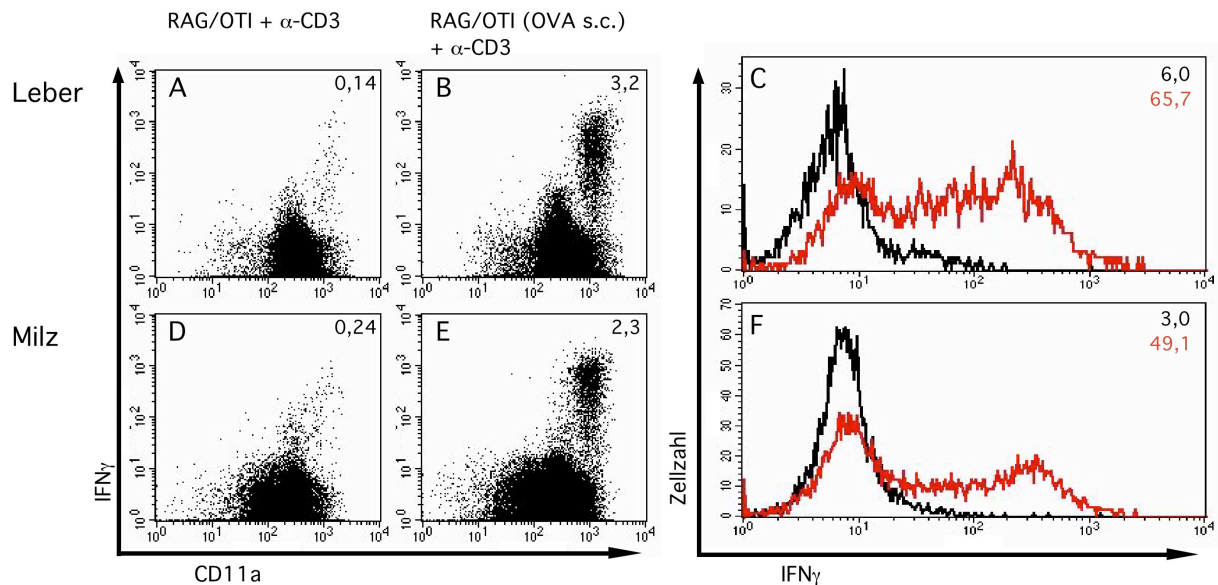


Abbildung 8. Die intravenöse α -CD3 Antikörpergabe zur Restimulation von Effektor- und Gedächtnis- T - Zellen: RAG2^{-/-} Mäusen wurden mit 5×10^7 OT-I Milzzellen rekonstituiert (RAG/OTI) und wie angegeben durch einmalige subcutan (s.c.) Injektion von 100 μ g Ovalbumin in PBS immunisiert. 57 Tage später wurde den Mäusen intravenös 1 μ g α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und Milzlymphozyten aufgereinigt, mit SIINFEKL beladenen H2-K^b Tetrameren (S*tet), sowie α -CD11a (2D7), α -CD8 (53-6.7) und α -IFN (XMG1.2) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

A und B: Fluoreszenzintensitäten für CD11a und IFN γ aller aufgereinigten LAL aus den nicht immunisierten (A) und immunisierten (B) Mäusen nach der α -CD3 Antikörperbehandlung. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl an CD11a^{stark} IFN γ ⁺ Zellen in Prozent wieder; **C und F:** Die Histogramme geben die IFN γ - Expression in den CD8⁺ S*tet⁺ Leberzellen (C) bzw. Milzzellen (F) aus den nicht immunisierten (schwarz) und immunisierten (rot) Mäusen nach der α -CD3 Antikörperbehandlung wieder. **schwarz:** nicht immunisierte Mäuse. **rot:** immunisierte Mäuse. Die angegebenen Zahlen geben den Prozentanteil der IFN γ ⁺ Zellen wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen); **D und E:** Fluoreszenzintensitäten für CD11a und IFN γ aller aufgereinigten Milzzellen aus den nicht immunisierten (D) und immunisierten (E) Mäusen nach der α -CD3 Antikörperbehandlung. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl an CD11a^{stark} IFN γ ⁺ Zellen in Prozent wieder. (Erläuterung s. Text)

4.1.1.6. Korrelation des T - Zellrezeptor assoziierten Adaptorproteins TRIM mit CD11a und IFN γ Produktion nach α -CD3 α Antikörperinjektion

NKT - Zellen wurden ursprünglich aufgrund der geringeren Expression des TCR/CD3 - Komplexes auf ihrer Zelloberfläche charakterisiert und deshalb als T - Zellrezeptor intermediäre T - Zellen bezeichnet (s. Einleitung). Dieser Phänotyp zeigte sich bei allen Oberflächenfärbungen unbehandelter NKT - Zellen (s. z.B. Abb. 3).

Überraschend war deshalb die Beobachtung, dass nach intrazellulärer Färbung auf Moleküle des TCR/CD3 - Komplexes, deren Expression innerhalb der NKT - Zellen sich an die der T - Zellen anglich (s. z.B. Abb. 4) und in vielen Färbungen sogar leicht höher lag (s. z.B. Abb. 3). Dies legte den Schluss nahe, dass nicht die Gesamtmenge des T - Zellrezeptors *per se*, sondern vielmehr dessen intrazelluläre Regulation und der Transport an die Zelloberfläche für den beobachteten phänotypischen Unterschied zwischen NKT- und T - Zellen verantwortlich ist.

Um weiteren Aufschluss über die molekularen Grundlagen dieser Beobachtung zu erhalten, wurden Färbungen nach weiteren Komponenten des TCR/CD3 - Komplexes durchgeführt. Der Fokus lag hierbei auf dem Adaptormolekül TRIM, welches an der Regulation des TCR/CD3 - Komplexes and die Oberfläche beteiligt ist (Kirchgessner et al. 2000). Infolge der Kürze des extrazellulären Anteils TRIM's von nur acht Aminosäuren, war der verwendete Antikörper gegen ein intrazelluläres Epitop gerichtet.

Hierbei zeigte sich, dass die TRIM - Expressionsstärke in Thymuszellen höher war, als im peripheren Blut, in Milz und Leber (Abb. 9A und B). Dies galt sowohl für T - Zellen (Abb. 9A) als auch für NKT - Zellen (Abb. 9B). In allen untersuchten Organen lag die TRIM - Expression in den NKT - Zellen unter der der T - Zellen (s. Abb. 9C-F).

Die vergleichbare Reaktivität von NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen gegenüber α -CD3 α Antikörpern *in vivo* (s. 4.1.1.4. und 4.1.1.5.) war Anlass, die Analyse der TRIM - Expression auch auf NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen auszuweiten.

Auch in diesem Fall ergab die Analyse, dass CD11a^{stark} T - Zellen geringere Mengen an TRIM exprimieren, als naive konventionelle T - Zellen (Abb. 9G). Bei den CD3⁺ CD11a^{stark} Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) lag der Median der TRIM - Expression bei ca. 29, verglichen mit ca. 43 bei den CD3⁺ CD11a^{int} LAL (Abb. 9G). Eine vergleichbare Verteilung fand sich innerhalb der Lymphozyten der Milz (Median der TRIM - Expression 34 zu 55) und der Lymphknoten (Median 45 zu 64). Lediglich im Thymus war die TRIM - Expression innerhalb der CD3⁺ CD11a^{stark} und CD3⁺ CD11a^{int} vergleichbar bzw. leicht höher in Ersteren (Median der TRIM - Expression 114 zu 98).

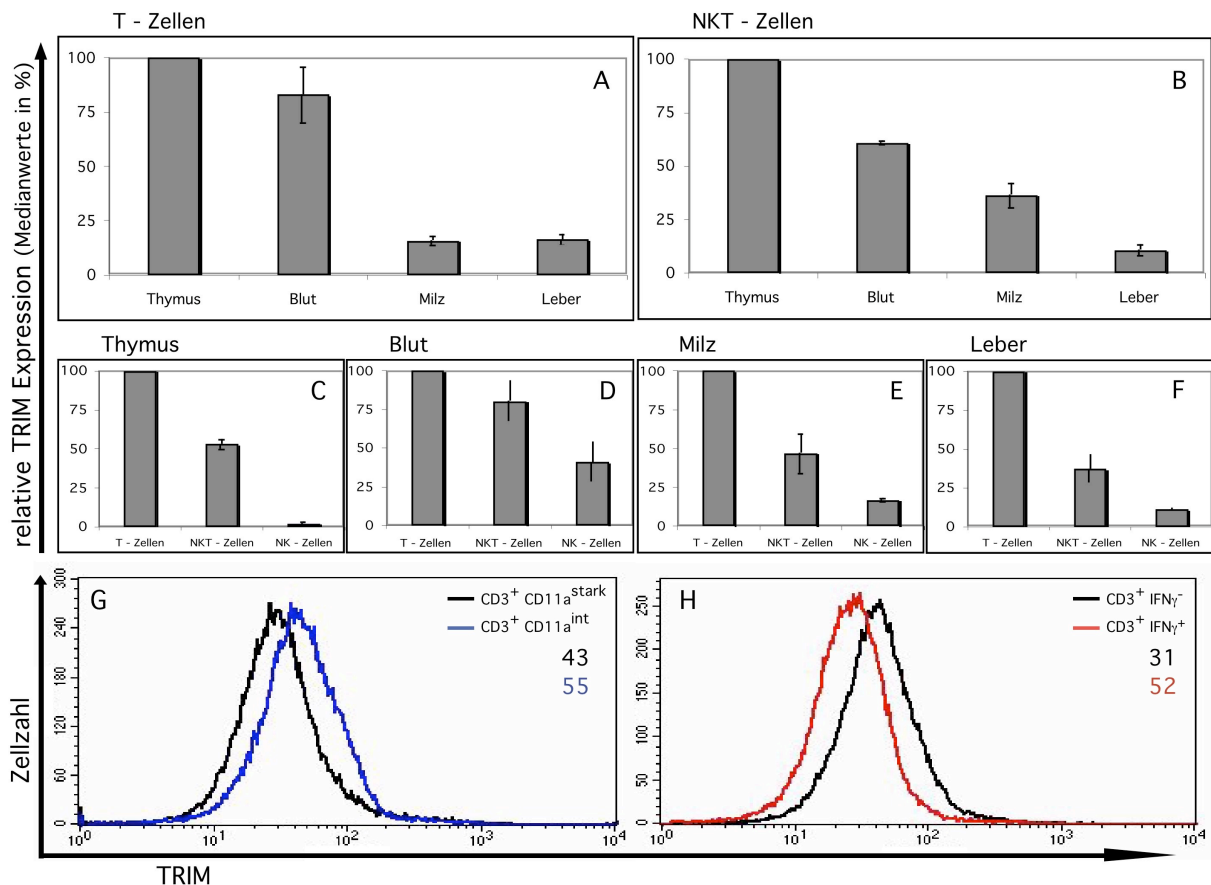


Abbildung 9. Korrelation des Adaptorproteins TRIM mit CD11a und IFN γ Produktion nach α -CD3 Antikörperinjektion: Aus C57BL/6 Mäusen wurden Lymphozyten aus Leber, Milz, Thymus und dem peripheren Blut aufgereinigt, mit α -TCR (H57-597) oder α -CD3 (154.2C11), α -NK1.1 (PK136) und α -TRIM (TRIM-4) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

A und B: Dargestellt ist die TRIM - Expression in T - Zellen (A) und NKT - Zellen (B) in den unterschiedlichen Organen. Hierfür wurden die Medianwerte der TRIM - Expressionstärke ermittelt und die jeweilige Expression im Thymus als 100% gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von sechs bis sieben analysierten Tieren aus unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken repräsentieren den SEM; **C - F:** Dargestellt ist die TRIM - Expression in den verschiedenen Zellpopulationen in Thymus (C), peripherem Blut (D), Milz (E) und Leber (F). Hierfür wurden die Medianwerte der TRIM - Expressionsstärke ermittelt und die jeweilige Expression in T - Zellen als 100% gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von sechs bis sieben analysierten Tieren aus unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken repräsentieren den SEM; **G:** Dargestellt ist die Expression an TRIM in den CD3⁺ CD11a^{stark} (schwarz) und CD3⁺ CD11a^{int} (blau). Die angegebenen Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensitäten der CD11a Färbung wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist wiedergegeben; **H:** Dargestellt ist die Expression an TRIM in den CD3⁺ IFN γ ⁺ (rot) und CD3⁺ IFN γ ⁻ (schwarz) Zellen. Die angegebenen Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensitäten der CD11a Färbung wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist wiedergegeben. (Erläuterung s. Text)

Übereinstimmend mit der schwächeren TRIM - Expression von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen, zeigten auch die IFN γ produzierenden T - Zellen nach α -CD3 Antikörperinjektion eine geringere TRIM - Expression als die IFN γ Zellen (Abb. 9H).

Somit korrelierte die beobachtete Reaktivität der NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen, in Form der IFN γ Produktion, negativ mit der TRIM - Expression.

4.1.2. *In vivo* Dynamik der NKT - Zellverteilung

4.1.2.1. Aktivierte NKT- und T - Zellen akkumulieren in der Leber:

Eine konsistente Beobachtung bei den unter Abschnitt 4.1.1. referierten Experimenten war die relative Abnahme der stimulierten NKT- und T - Zellen im peripheren Blut, einhergehend mit einer relativen und absoluten Zunahme der entsprechenden Zellen in der Leber.

Eine Stunde nach der intravenösen α -CD3 Antikörperinjektion fanden sich in den Lebern $5,5 (\pm 0,92) \times 10^6$ Leukozyten gegenüber $1,6 (\pm 0,45) \times 10^6$ Zellen in den mit PBS behandelten Kontrollmäusen. Dies entsprach einer signifikanten Zunahme der Gesamtleukozytenzahl um ca. 250% ($p = 0,022$). Ein leichter Anstieg der Zellzahl war zwar auch in der Milz zu beobachten, von $21,6 (\pm 6,9) \times 10^6$ Leukozyten in den Kontrollmäusen auf $29,1 \pm 5,2 \times 10^6$ Zellen in den mit α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen. Diese Zunahme um ca. 30% war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,423$).

In Abbildung 10. sind die relativen Anteile der unterschiedlichen Zellpopulationen nach α -CD3 Antikörper- oder PBS - Behandlung aufgeschlüsselt. Anhand der Expression von TCR und NK1.1 wurde nach NKT-, T-, und NK - Zellen differenziert. Deutlich zu sehen ist, dass infolge der α -CD3 Antikörperinjektion der relative Anteil an NKT- ($\text{TCR}^+ \text{NK1.1}^+$) Zellen im peripheren Blut signifikant von 17,4% ($\pm 3\%$) auf 1,4% ($\pm 0,3\%$) abnahm ($p < 0,001$) (Abb. 10B). In der Leber hingegen nahm der relative Anteil der NKT - Zellen von 5,5% ($\pm 1,9\%$) auf 10,2% ($\pm 1,1\%$) zu ($p = 0,024$) (Abb. 10B). Eine entsprechende Abnahme im Blut (von $35,4\% \pm 1,6$ auf $17,9\% \pm 2,1\%$; $p < 0,001$) bzw. Zunahme in der Leber (von $18,2\% \pm 3,5\%$ auf $47,9\% \pm 4,1\%$; $p = 0,002$) ließ sich für die T- ($\text{TCR}^+ \text{NK1.1}^-$) Zellen beobachten (Abb. 10A). Dies entsprach einer Zunahme des relativen Anteils der NKT- bzw. T - Zellen in der Leber um 85,5% bzw. 163% und einer Abnahme im peripheren Blut um 92% bzw. 49,4%. Diese Änderungen bedingten eine gegenläufige Verschiebung innerhalb der NK - Zellpopulation: Hier nahm der relative Anteil im peripheren Blut zu (von $16,7\% \pm 2,7\%$ auf $33,9\% \pm 4,2\%$; $p = 0,021$) und in der Leber ab (von $12\% \pm 2,5\%$ auf $7,2\% \pm 0,8\%$; $p = 0,04$) (Abb. 10C). Für die Milz ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der relativen Zellzahlen innerhalb der drei untersuchten Zellpopulationen (Abb. 10).

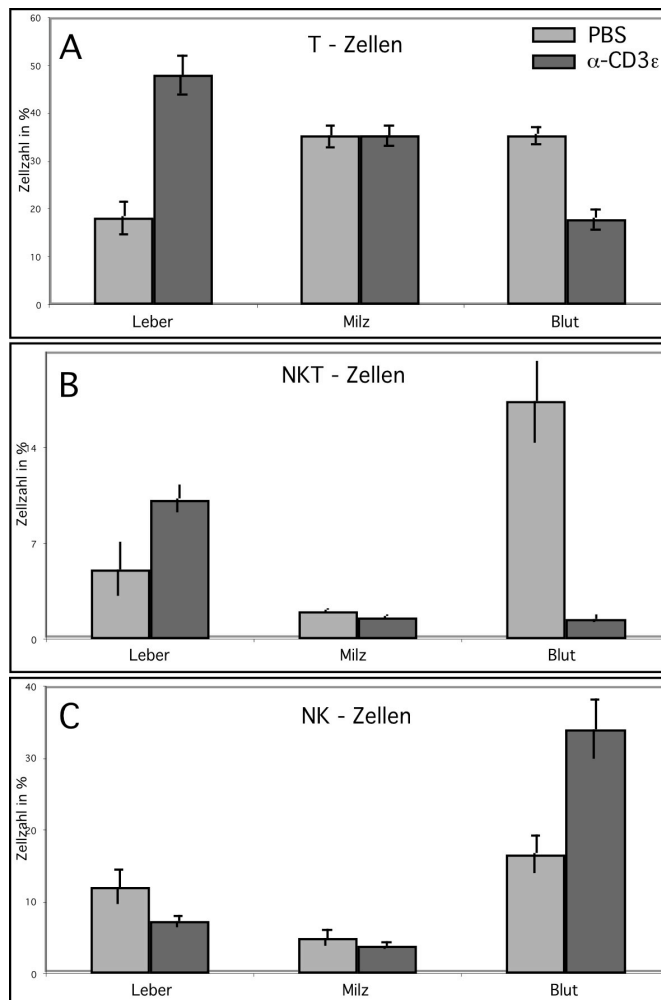


Abbildung 10. NKT- und T - Zellen des peripheren Blutes akkumulieren in der Leber: (B6/D2)F₁ Mäusen wurde intravenös 1 µg α-CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach einer Stunde wurden Lymphozyten aus Leber, Milz und peripherem Blut aufgereinigt, mit anti-TCR (H57-597) und anti-NK1.1 (PK136) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

A - C: Dargestellt ist der relative Anteil der T - Zellen (A) bzw. NKT - Zellen (B) bzw. NK - Zellen (C) an der Gesamtzellzahl innerhalb der drei angegebenen Organe in Prozent. **linker Balken:** PBS - Behandlung; **rechter Balken:** α-CD3 Antikörperbehandlung. Anzahl der analysierten Tiere, bei vier unabhängigen Experimenten: 4x PBS und 8x α-CD3. Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (Erläuterung s. Text)

Interessant war, dass auf den im peripheren Blut nach α-CD3 Antikörpergabe detektierten NKT- und T - Zellen sich praktisch keine Herunterregulation des TCR/CD3 - Komplexes beobachten lies (Daten nicht gezeigt).

Aufschlussreich war darüber hinaus der Vergleich der CD69- und IFNγ - Expression zwischen den untersuchten Zellpopulationen und Organen.

Hier zeigte sich, dass es nach der α-CD3 Antikörpergabe auf den T - Zellen im Blut zu praktisch keinem Anstieg des prozentualen Anteils an CD69⁺ Zellen kam (von 3,5% ± 0,5% auf 7,4% ± 1,0%; p = 0,059) (Abb. 11A). Bei den NKT - Zellen ging der CD69⁺ Anteil sogar signifikant zurück (von 76,1% ± 2,0% auf 31,3% ± 7,8%; p = 0,018) (Abb. 11B). Entgegen Leber und Milz zeigte sich im peripheren Blut infolge der α-CD3 Antikörpergabe auch kaum ein Anstieg am prozentuellen Anteils der IFNγ produzierenden Zellen (Abb. 11 und Abb. 5). Dies betraf sowohl die NKT - Zellen (4,3% ± 0,2% IFNγ⁺ im Blut verglichen mit 50,8% ± 8,8% in der Leber), als auch die T - Zellen (0,9% ± 0,3% verglichen mit 8,6% ± 2,7%) (Abb. 11).

Somit fanden sich im peripheren Blut eine Stunde nach α -CD3 Antikörperinjektion praktisch keine aktivierten Zellen, gemessen an einer Zunahme der CD69- und IFN γ - Expression bzw. einer Abnahme der Oberflächenkonzentration des TCR/CD3 - Komplexes.

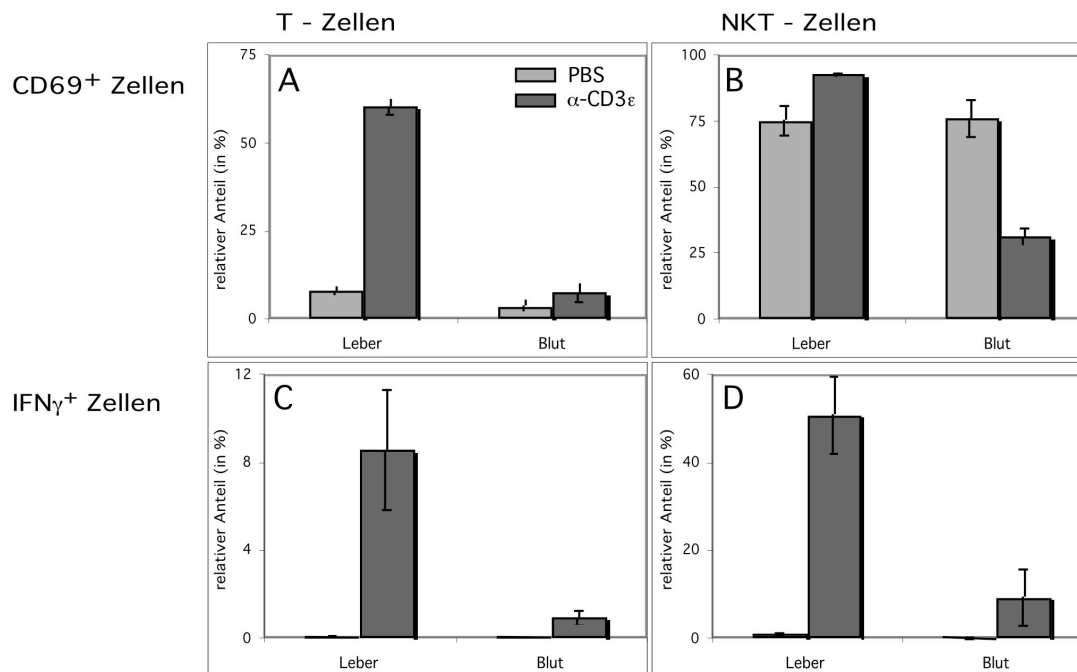


Abbildung 11. Die Expression an CD69 und IFN γ auf Leber- und Blutlymphozyten nach α -CD3 Antikörpergabe *in vivo*: (B6/D2) F_1 Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und periphere Blut Lymphozyten aufgereinigt, mit α -TCR (H57-597), α -NK1.1 (PK136), α -CD69 (H1.2F3) und α -IFN γ (XMG1.2) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der relative Anteil der CD69⁺ (A und B) bzw. IFN γ ⁺ (C und D) Zellen innerhalb der beiden Organe in Prozent nach PBS- (linker, grauer Balken) oder α -CD3 Antikörperbehandlung (rechter, schwarzer Balken).

A: CD69 - Expression auf T - Zellen; **B:** CD69 - Expression auf NKT - Zellen; **C:** IFN γ - Expression auf T - Zellen; **D:** IFN γ - Expression auf NKT - Zellen; **linker Balken:** PBS - Behandlung; **rechter Balken:** α -CD3 Antikörperbehandlung. Anzahl der analysierten Tiere, bei mindestens zwei unabhängigen Experimenten, für CD69: 4x PBS (Leber) bzw. 2x PBS (Blut) und 8x α -CD3 (Leber) bzw. 4x α -CD3 (Blut), bei IFN γ : 3x PBS (Leber) bzw. 2x PBS (Blut) und 8x α -CD3 (Leber) bzw. 3x α -CD3 (Blut). Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (Erläuterung s. Text)

Aufgrund der intravenösen Injektion konnte eine mangelnde Verfügbarkeit des α -CD3 Antikörpers nicht die Ursache dieser Unterschiede, hinsichtlich der Zellzahlen und des Phänotyps, im peripheren Blut sein. Deshalb wurde geschlossen, dass infolge der α -CD3 Antikörperinjektion der Anteil der *in vivo* aktivierten NKT- und T - Zellen im peripheren Blut zurück ging und diese Zellen in der Leber, nicht aber in der Milz, akkumulierten.

Dies beruht vermutlich auf einer Kreuzvernetzung des an die CD3⁺ Zellen gebundenen Antikörpers durch Fc - Rezeptoren der sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) (s. 4.3.1.)

4.1.2.2. Einfluss einer repetitiven intravenösen α -CD3 Antikörpergabe auf die NKT - Zellrepopulation:

Die intravenöse Injektion von α -CD3 Antikörpern bedingt somit eine *in vivo* Stimulation der NKT- und T - Zellen, sowie deren Akkumulation in der Leber. Darüber hinaus führt diese α -CD3 Antikörpergabe nach einigen Stunden zu einer weitgehend vollständigen Depletion der NKT-, nicht aber der T - Zellen (Eberl et al. 1998). Deshalb ließen sich 24 Stunden nach Injektion praktisch keine NKT - Zellen in der Leber oder im peripheren Blut mehr nachweisen (Eberl et al. 1998 und Tab. 4 1/1). Am zweiten Tag nach der Antikörperinjektion zeigte ein geringer Prozentsatz nachweisbarer NKT - Zellen die beginnende Repopulation an (Tab. 4 1/2). Diese Repopulation basiert auf einer Proliferation der NKT - Zellen und nicht auf einer Umverteilung der NKT - Zellen im Organismus (Eberl et al. 1998 und Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, dass eine repetitive Gabe des α -CD3 Antikörpers im täglichen Abstand eine konstante Depletion der NKT - Zellpopulation für die Dauer der Behandlung bewirken sollte.

Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass eine mehrmalige Gabe von 1 μ g/Tag des α -CD3 Antikörpers die Repopulation nicht wie erwartet verzögerte, sondern vielmehr beschleunigte (Tab. 4). So fanden sich in zwei der drei durchgeführten Experimente zwei Tage nach der ersten Antikörpergabe in der Leber deutlich mehr NKT - Zellen, wenn auf diese erste Injektion eine zweite am nächsten Tag folgte (Tab. 4 2/2), als ohne diese zweite Behandlung (Tab. 4 1/2). Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für das periphere Blut (Tab. 4 2/2 vs. 1/2). Im dritten Experiment waren die Prozentwerte des relativen NKT - Zellanteils beider Ansätze vergleichbar.

(Angaben in %)	Leber		Blut	
	NKT - Zellen	T - Zellen	NKT - Zellen	T - Zellen
0/2	20,3	44,3	3,1	48,3
1/1	3,1	26,3	0,5	33,3
1/2	18,7	43,7	2,3	53,6
2/2	27,1	43,4	4,1	50,7

Tabelle 4. Die mehrmalige *in vivo* α -CD3 Antikörpergabe erhöht die NKT - Zellausbeute: (B6/D2) F_1 Mäusen wurde einmalig an Tag 0 (1/1 und 1/2) oder zweimalig an Tag 0 und 1 (2/2) intravenös 1 μ g α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS an Tag 0 injizierte Mäuse dienten als Kontrolle (0/2). Nach einem (1/1) oder zwei Tagen (1/2 und 2/2) Tagen wurden Lymphozyten aus Leber (A) und peripherem Blut (B) aufgereinigt, mit α -TCR (H57-597) und α -NK1.1 (PK136) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben ist relative Anteil der NKT- (TCR $^+$ NK1.1 $^+$) und T- (TCR $^+$ NK1.1 $^-$) und NK- (TCR $^-$ NK1.1 $^+$) Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl in Prozent eines repräsentativen Experiments.

0/2: PBS Injektion an Tag 0 und Analyse an Tag 2; **2/2:** zweimalige α -CD3 Antikörperinjektion an Tag 0 und Tag 1, nebst Analyse an Tag 2; **1/1:** einmalige α -CD3 Antikörperinjektion an Tag 0 und Analyse an Tag 1; **1/2:** einmalige α -CD3 Antikörperinjektion an Tag 0 und Analyse an Tag 2. (Erläuterung s. Text)

Um entscheiden zu können, ob diese höhere NKT - Zellausbeute nach mehrmaliger α -CD3 Antikörpergabe auf ein Ausbleiben der NKT - Zelledepletion, infolge einer verminderten Zellreaktivität, oder eine verstärkten Repopulation der NKT - Zellen zurückzuführen ist, wurden phänotypische Analysen durchgeführt.

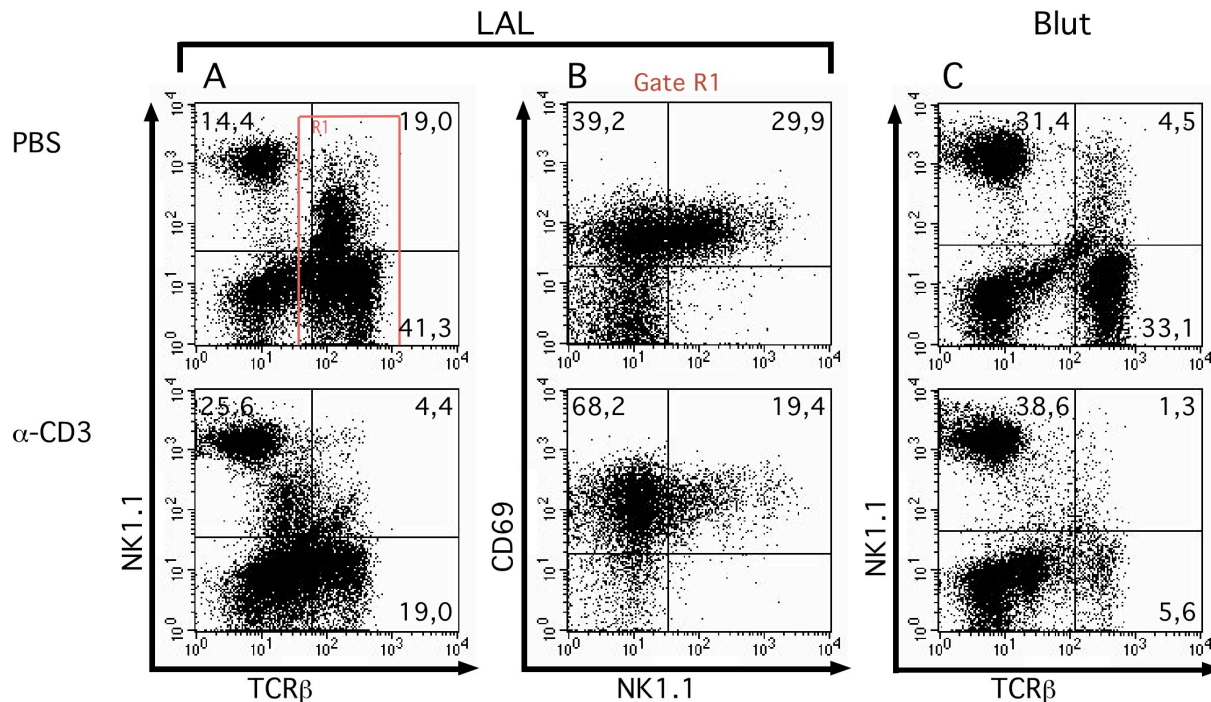


Abbildung 12. Die mehrmalige *in vivo* Gabe von 1 μ g α -CD3 Antikörper verändert die NKT - Zellreaktivität nicht: (B6/D2) F_1 Mäusen wurde zweimalig an Tag 0 und 1 oder dreimalig an Tag 0, 1 und 2 intravenös 1 μ g α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Die Mäuse der ersten Gruppe wurde an Tag 2 mit PBS injiziert und dienten als Kontrolle. Eine Stunde nach der letzten Injektion wurden Lymphozyten aus Leber (A und B) und peripherem Blut (C) aufgereinigt, mit α -TCR (H57-597), α -NK1.1 (PK136) und α -CD69 (H1.2F3) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Erste Zeile: Fluoreszenzintensitäten von Zellen aus Mäusen injiziert zweimal mit 1 μ g α -CD3 Antikörpern (Tag 0 und 1), sowie mit PBS an Tag 2; **zweite Zeile:** Fluoreszenzintensitäten von Zellen aus Mäusen injiziert dreimal mit 1 μ g α -CD3 Antikörpern (Tag 0, 1 und 2); **A:** Fluoreszenzintensitäten für TCR und NK1.1 aller aufgereinigten LAL; **B:** Fluoreszenzintensitäten für NK1.1 und CD69 auf den Leberzellen im angegebenen Fenster R1 (Gate R1 in rot in A); **C:** Fluoreszenzintensitäten für TCR und NK1.1 aller aufgereinigten peripherer Blutlymphozyten. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen Quadranten in Prozent wieder. (Erläuterung s. Text)

Hinsichtlich der Expression der untersuchten Marker NK1.1, TCR, CD69, CD44 und CD62L ließen sich zwischen den NKT - Zellen behandelter und unbehandelter Mäusen keine signifikanten Unterschiede feststellen (Tab. 4, Abb. 12 und Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde die Reaktion der NKT - Zellen eine Stunde nach erneuter α -CD3 Antikörperinjektion in beiden Gruppen untersucht. Hierzu wurden (B6/D2) F_1 Mäuse zweimal an Tag 0 und 1 oder dreimal an Tag 0, 1 und 2 mit 1 μ g α -CD3 Antikörper intravenös injiziert. Es zeigte sich eine Stunde nach der dritten α -CD3 Antikörperinjektion, die verminderte Oberflächenexpression an TCR (Abb. 12A) und der relative und absolute Anstieg der CD69

- Expression auf NKT- und T - Zellen (Abb. 12B). Diese Veränderungen der Oberflächenexpression waren hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit und ihres Ausmaßes mit derjenigen in zuvor unbehandelten Mäuse vergleichbar (Abb. 12 vs. z.B. Abb. 4 oder Abb. 17).

Aufgrund der vormaligen α -CD3 Antikörpergabe war jedoch der Anteil der CD69⁺ T - Zellen bereits vor der erneuten Injektion höher als in unbehandelten Mäusen (vgl. z.B. Abb. 12B oben mit Abb. 17B oben). Ebenso konnte die beschriebenen (s. Abb. 10) Abnahme des relativen Anteils an NKT- und T - Zellen im peripheren Blut beobachtet werden (Abb. 12C).

Folglich ließen sich phänotypisch, gemessen an der Geschwindigkeit oder des Ausmaßes mit der sich die Expression der genannten Oberflächenmarker veränderte, keine Unterschiede zwischen den repopulierten und den unbehandelten NKT - Zellen nachweisen.

Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass ein andauernder oder wiederholter NKT - Stimulus, wie z.B. infolge einer repetitiven α -CD3 Antikörperinjektion, zu einer deutlichen Verstärkung und Beschleunigung der NKT - Zellrepopulation führt. Somit erweis sich die Regulation der NKT - Zellen als dynamischer als bislang antizipiert.

4.2. Tumor- und antigen - spezifische Zytotoxizität von NKT - Zellen in T - Zellrezeptor transgenen Mäusen

Die Beteiligung von NKT - Zellen in Immunreaktionen gegenüber Pathogenen, in der Tumorbabwehr und in Autoimmunerkrankungen ist vielfach belegt (s. Einleitung). Ungeklärt blieb jedoch bislang die zugrunde liegende Antigenpezifität der NKT - Zellen. Das an CD1d bindenden α -Galactosylceramid (α -GalCer), welches offensichtlich alle Zellen mit dem invarianten V α 14J α 281 T - Zellrezeptor (V α 14i T - Zellen) aktiviert (s. Einleitung), schien diesen Kriterien zu genügen. Doch zeigte sich, dass diese V α 14i T - Zellen sehr heterogen sind und Zellen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Antigenpezifitäten umfassen (Matsuda et al. 2001). Dementsprechend ist derzeit kein Antigen bekannt, auf welches NKT - Zellen spezifisch reagieren.

Die Beobachtung, dass die unter 4.1.1. beschriebenen OT-I Mäuse auch TCR α ⁺ NK1.1⁺ - Zellen mit dem transgenen V α 2V α 5 T - Zellrezeptor besitzen, erlaubte in diesem Zusammenhang ein neuartiges Modellsystem zu etablieren.

4.2.1. Phänotyp und Aktivierbarkeit der OT-I NKT - Zellen:

10,4% (\pm 1,4%) der Leber- bzw. 2,5% (\pm 0,4%) der Milzleukozyten der OT-I Maus exprimierten sowohl die V α 5 Kette des transgenen T - Zellrezeptors, als auch den NK - Marker NK1.1 (s. z.B. Abb. 13A). Dies entsprach circa 27,9% (\pm 3,6%) aller V α 5⁺ Zellen in der Leber bzw. 9,4% \pm 1% in der Milz.

Wie in anderen Mausstämmen beschrieben (s. z.B. Abb. 4), war auch in diesem Fall die Expression beider Marker, TCR α bzw. NK1.1, schwächer als auf konventionellen T- bzw. NK - Zellen (Abb. 13A). Allerdings war die Expressionsstärke für die V α 5 - Kette auf den NKT - Zellen in den meisten Färbungen nur geringfügig geringer als auf konventionellen T - Zellen (Abb. 13A). Entsprechendes galt für die Expression von CD3 α und der zweiten transgenen T - Zellrezeptorkette V α 2. Somit war der Unterschied in der Expressionsstärke des TCR/CD3 - Komplexes zwischen NKT- und konventionellen T - Zellen in OT-I Mäusen weniger deutlich als in C57BL/6 oder (B6/D2) F_1 Mäusen.

Hinsichtlich der Expression der Oberflächenmarker CD11a, CD69 und CD44 lies sich kein Unterschied zwischen NKT - Zellen der OT-I Maus und denjenigen aus C57BL/6 oder (B6/D2) F_1 Mäusen erkennen (Daten nicht gezeigt).

Überraschenderweise waren jedoch praktisch alle (>90%) der OT-I NKT - Zellen positiv für den CD8 α Marker (Abb. 13B). In anderen Mausstämmen stellen die CD8⁺ NKT - Zellen, mit einem Anteil von 3-4% aller NKT - Zellen in der Leber, nur eine geringe Subpopulation der NKT - Zellen dar (Hammond et al. 1999, Eberl et al. 1999). In Übereinstimmung mit den beschriebenen CD8⁺ NKT - Zellen, waren auch die meisten der OT-I NKT - Zellen negativ

für den CD8 β Marker ($76,1\% \pm 12,2\%$) (Abb. 13D), woraus zu schließen ist, dass der überwiegende Teil der OT-I NKT - Zellen ein CD8 $\alpha\alpha$ Homodimer auf ihrer Oberfläche tragen. Die CD8 α - Expression auf den OT-I NKT - Zellen war hierbei in allen untersuchten Organen (Leber, peripheres Blut und Milz) schwächer als auf den konventionellen T - Zellen (Abb. 13B).

Da die meisten murinen NKT - Zellen mittels eines invarianten V β 14J β 281 T - Zellrezeptors auf CD1d selektiert werden (s. Einleitung), war es von Interesse, ob die OT-I NKT - Zellen neben den transgenen V β 2V β 5 noch über einen zweiten T - Zellrezeptor verfügen.

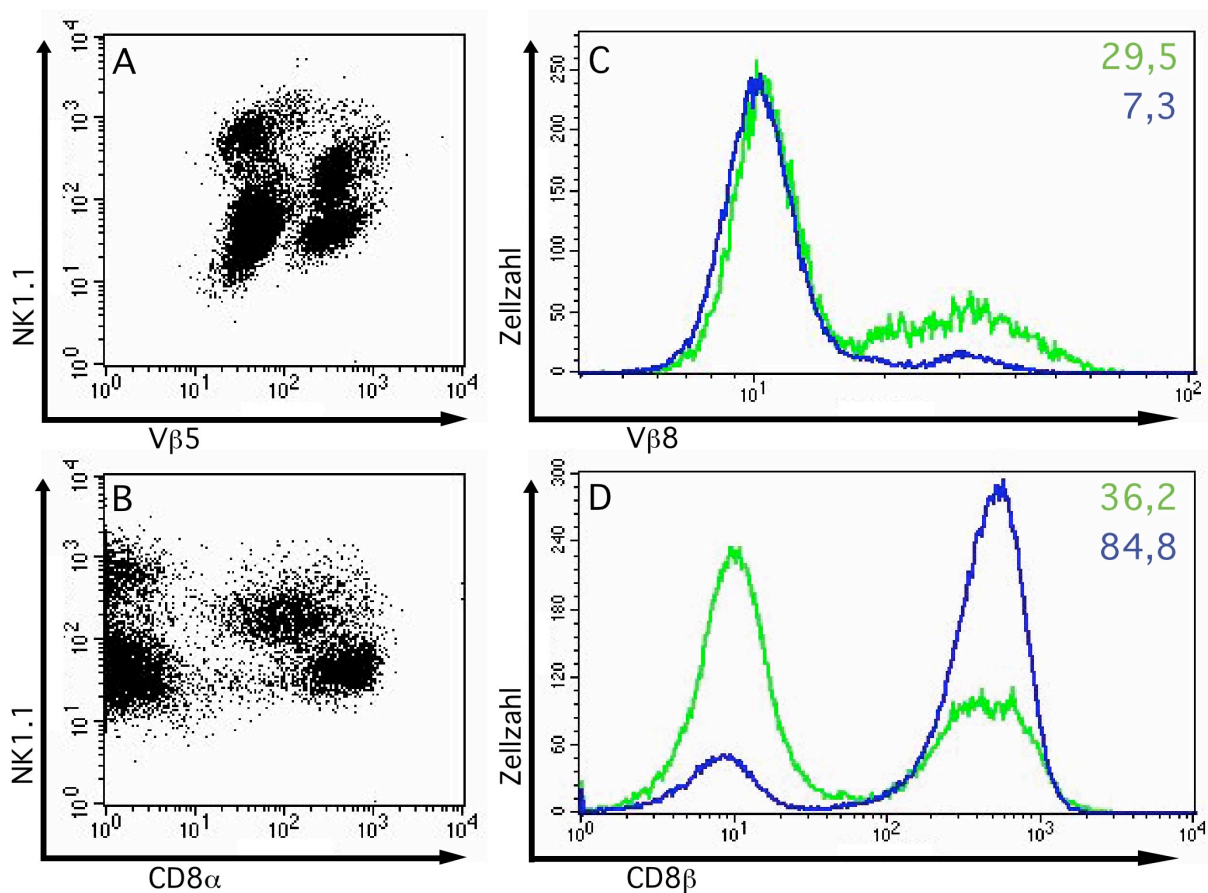


Abbildung 13. Der Phänotyp der OT-I NKT - Zellen: Aus OT-I Mäusen aufgereinigte Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) wurden direkt *ex vivo* mit α -V β 5 (MR9-4), α -NK1.1 (PK136) und α -CD8 α (53-6.7) bzw. α -V β 8 (F23.1) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse repräsentativer Experimente.

A: Fluoreszenzintensitäten für V β 5 und NK1.1 aller aufgereinigten LAL; **B:** Fluoreszenzintensitäten für CD8 α und NK1.1 aller aufgereinigten LAL; **C:** Das Histogramm gibt die Expression an V β 8 auf den V β 5⁺ NK1.1⁺ (grün) bzw. V β 5⁺ NK1.1⁻ Zellen (blau) wieder; **D:** Das Histogramm gibt die Expression an CD8 β auf den V β 5⁺ NK1.1⁺ (grün) bzw. V β 5⁺ NK1.1⁻ Zellen (blau) wieder. Die angegebenen **Zahlen** geben den Prozentanteil der V β 8⁺ Zellen wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). (Erläuterung s. Text)

Hierzu wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) mit einem α -V β 14- (freundlicherweise von M. Taniguchi (Chiba, Japan) zur Verfügung gestellt) bzw. einem α -V β 8 Antikörper

gefärbt. V β 8 ist die häufigste T - Zellrezeptor α -Kette, die zusammen mit dem invarianten V δ 14J δ 281 Segment auftritt (ca. 60-70%, Bendelac et al. 1997). Mit dem α -V δ 14 Antikörper lies sich keine Färbung auf den OT-I NKT - Zellen erzielen (Daten nicht gezeigt). Bei Verwendung des α -V β 8 Antikörpers zeigte sich, dass der Anteil der V β 5⁺ OT-I Zellen, die über diese zweite T - Zellrezeptor α -Kette verfügen, innerhalb der NKT - Zellen deutlich höher lag, als innerhalb der konventionellen T - Zellen (Abb. 13C). Folglich ist anzunehmen, dass in OT-I Mäusen mehr NKT- als T - Zellen einen zweiten, jedoch nicht den invarianten V δ 14J δ 281, T - Zellrezeptor tragen.

Ebenso wie der Phänotyp, so war auch die Reaktivität der OT-I NKT - Zellen gegenüber intravenös injiziertem α -CD3 α Antikörper zu der in C57BL/6 oder (B6/D2)F₁ Tieren vergleichbar (Abb. 14). Sowohl die verminderte Oberflächenexpression der V β 5 T - Zellrezeptorkette in den behandelten (Abb. 14B), im Vergleich zu unbehandelten OT-I Mäusen (Abb. 13A), sowie die IFN γ Produktion der OT-I NKT - Zellen (Abb. 14C) waren deutlich zu erkennen.

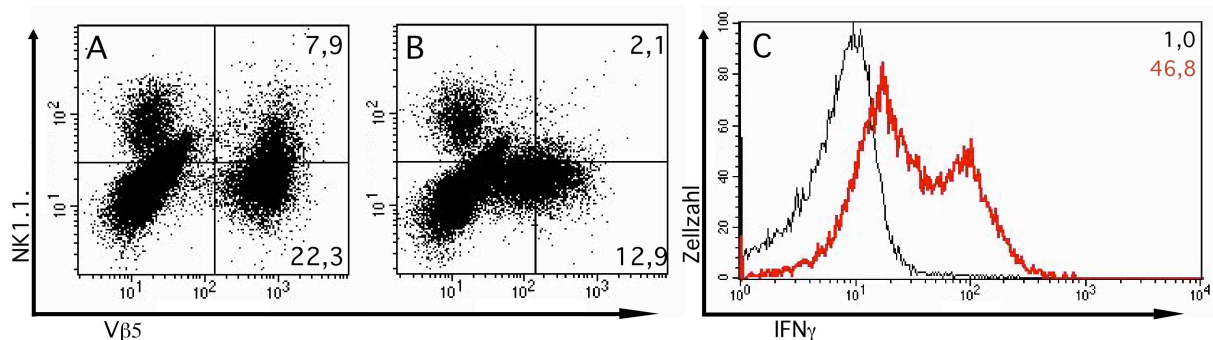


Abbildung 14. Aktivierung von OT-I NKT - Zellen durch α -CD3 α Antikörpern *in vivo*: OT-I Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 α Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) aufgereinigt, mit α -V β 5 (MR9-4), α -NK1.1 (PK136) und α -IFN γ (XMG1.2) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Wiedergegeben sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

A: Fluoreszenzintensitäten für V β 5 und NK1.1 aller aufgereinigten LAL aus unbehandelten Mäusen. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen Quadranten in Prozent wieder; **B:** Fluoreszenzintensitäten für V β 5 und NK1.1 aller aufgereinigten LAL aus mit α -CD3 α Antikörper behandelten Mäusen. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen Quadranten in Prozent wieder. **C:** Das Histogramm gibt die Fluoreszenzintensität an IFN γ in V β 5⁺ NK1.1⁺ Leberzellen aus unbehandelten (schwarz) und mit α -CD3 α Antikörper behandelten (rot) Mäusen wieder. Hierzu wurde V β 5 intrazellulär gefärbt. Die angegebenen Zahlen geben den Prozentanteil der IFN γ Zellen wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). (Erläuterung s. Text)

Zusammenfassend wurde geschlossen, dass die V β 5⁺ NK1.1⁺ Zellen der OT-I Maus, hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Reaktivität gegenüber α -CD3 α Antikörpern, den CD3⁺ NK1.1⁺ Zellen anderer Mausstämmen gleichen und sie folglich als funktionsfähige NKT - Zellpopulation angesehen werden können.

4.2.2. Tumor- und antigen - spezifische Zytotoxizität der V α 2V β 5⁺ NKT - Zellen:

Der transgene V α 2V β 5 T - Zellrezeptor, der die Erkennung des SIINFEKL - Peptids im Kontext von H2-K^b vermittelt, erlaubte es jedoch prinzipiell, den NKT - Zellen der OT-I Mäuse eindeutig ein stimulierendes Antigen zuzuordnen.

Um diese Annahme zu testen, wurde im folgenden untersucht, ob eine Antigenerkennung über den transgenen V α 2V β 5 T - Zellrezeptor auch eine zytotoxische Aktivität der NKT - Zellen aus OT-I Mäusen auslösen könnte. Hierbei wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätsassay angewendet (s. 3.5.1.3. und 3.5.1.4.). Bei dieser Methode werden zwei Zellpopulationen, die sich nur in der Beladung bzw. Expression des Modellantigens unterscheiden, differentiell mit dem Lebendfarbstoff CFSE markiert und intravenös appliziert. Zytotoxizität zeigt sich in der verminderten Zellzahl der antigen - beladenen Zielzellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten *in vivo*.

Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) wurden aus OT-I Mäusen aufgereinigt und intravenös in T-, NKT- und B - zelldefiziente RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. Die LAL proliferierten und repopulierten die gesamte RAG2^{-/-} Maus (RAG/OTI) (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde diesen RAG/OTI Mäusen die Tumorzelllinie RMA-OVA intravenös als Targetzelle injiziert. Diese Zellen exprimieren stabil das SIINFEKL - Peptid und präsentieren es im Kontext des MHC I Moleküls H2-K^b auf ihrer Oberfläche (Limmer et al. 2000). Die Mutterlinie RMA diente als interne Kontrolle. In einigen Experimenten wurden anstelle oder zusammen mit den RMA/RMA-OVA Zellen unbehandelte, sowie mit SIINFEKL beladene C57BL/6 Milzzellen injiziert. RMA und unbehandelte C57BL/6 Milzzellen wurden mit 1 μ M CFSE markiert, während RMA-OVA und SIINFEKL beladene C57BL/6 Milzzellen mit 10 μ M CFSE angefärbt wurden. Die injizierten Zellen ließen sich *ex vivo* von den endogenen Zellen an Hand der CFSE Markierung differenzieren (Abb. 15A-D). Die uniforme Expression der seltenen V α 12 T - Zellrezeptorkette auf den RMA/RMA-OVA erlaubte deren Trennung von den CFSE markierten Milzzellen (Abb. 15C und D). Der Vergleich der Verhältnisse von CFSE^{schwach} zu CFSE^{stark} markierten Zellen zwischen RAG2^{-/-} und RAG/OTI Mäusen erlaubt die Berechnung der Zytotoxizität (s. 3.5.1.4.; Abb. 15A und B).

Es zeigte sich eine schnelle und deutliche Zytotoxizität der OT-I LAL gegenüber den RMA-OVA Zellen. Diese betrug nach vier Stunden 30,1% (\pm 5,5%), nach 13-15 Stunden 76,2% (\pm 10,4%) und erreichte nach ca. 37 Stunden 100% (Abb. 15E).

Überraschenderweise fiel die Zytotoxizität der OT-I LAL gegenüber den SIINFEKL beladenen Milzzellen signifikant geringer aus. Die Zytotoxizität lag in diesem Fall bei 7,7% (\pm 3,3%) nach vier Stunden und bei 18,2% (\pm 4,7%) nach 13-15 Stunden und erreichte somit nur 25,5% (4h, p = 0,015) bzw. 23,8% (13-15h, p < 0,001) der Zytotoxizität gegenüber den RMA-OVA Zellen (Abb. 15E).

Die konventionellen T - Zellen der naiven OT-I Maus kamen aufgrund der raschen Kinetik kaum als Ursache der Zytotoxizität in Frage. Um dennoch einen weitere Bestätigung für die

Rolle der NKT - Zellen zu erhalten, wurde einigen RAG/OTI Mäusen intravenös α -NK1.1 (PK136) Antikörper injiziert, der NKT- und NK - Zellen depletiert (Kawamura et al. 1996, Tsukahara et al. 1997, Ogasawara et al. 1998).

Infolge dieser Antikörperinjektion zeigte sich eine signifikant geringere Zytotoxizität gegenüber den RMA-OVA Zellen. Sie betrug nach 15 Stunden Inkubation mit 21,9% (\pm 7,2%) nurmehr 39,5% des Wertes in den unbehandelten RAG/OTI Mäusen ($72,7\% \pm 2,7\%$, $p < 0,001$; Abb. 15F). Zwar sank die Zytotoxizität gegenüber den SIINFEKL beladenen Milzzellen infolge des α -NK1.1 Antikörpers lediglich auf 72,1% des Kontrollwertes (von $21,9\% \pm 7,2\%$ auf $15,8\% \pm 3,8\%$), dennoch war diese Abnahme statistisch signifikant ($p < 0,001$; Abb. 15F).

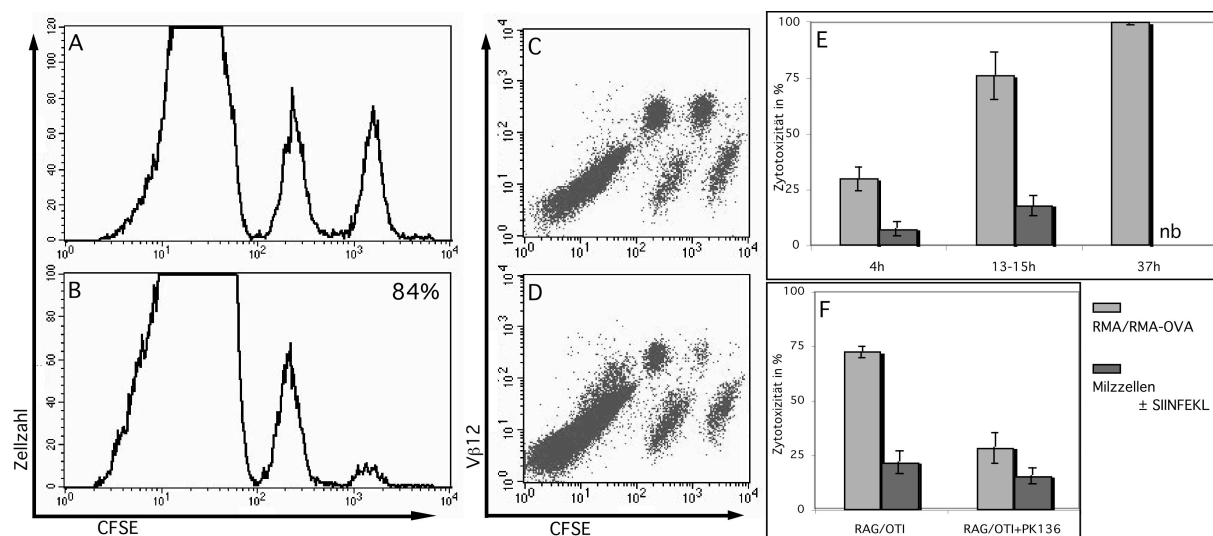


Abbildung 15. Zytotoxizität der OT-I NKT - Zellen: Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) wurden aus OT-I Mäusen aufgereinigt und intravenös in RAG2^{-/-} Mäuse (RAG/OTI) transferiert. Nach sechs bis 48 Tagen injizierte man diesen RAG/OTI Mäusen (B und D) bzw. RAG2^{-/-} (A und C) Mäusen als Kontrolle, intravenös mit 1 μ M oder 10 μ M CFSE markierte Zielzellen. Hierfür wurden einerseits ein Gemisch aus RMA (1 μ M CFSE) und RMA-OVA Zellen (10 μ M CFSE) eingesetzt (A und B). Andererseits wurde in einigen Experimenten anstelle oder zusammen mit diesem RMA/RMA-OVA Gemisch unbehandelten (1 μ M CFSE) und mit SIINFEKL beladenen (10 μ M CFSE) C57BL/6 Milzzellen verwendet (C und D). Vier bis 37 Stunden später wurden die LAL aufgereinigt, direkt *ex vivo* mit α -V β 12 (MR11-1) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

A: Fluoreszenzintensität an CFSE innerhalb der LAL aus einer RAG2^{-/-} Maus; **B:** Fluoreszenzintensität an CFSE innerhalb der LAL aus einer RAG/OTI Maus. Die angegebene Zahl gibt die berechnete Zytotoxizität an, die sich aus dem Vergleich der Verhältnisse von CFSE^{schwach} zu CFSE^{stark} Zellen zwischen den RAG2^{-/-} und RAG/OTI Mäusen ergibt (s. 3.5.1.4.); **C:** Fluoreszenzintensitäten für CFSE und V β 12 aller aufgereinigten LAL aus einer RAG2^{-/-} Maus; **D:** Fluoreszenzintensitäten für CFSE und V β 12 aller aufgereinigten LAL aus einer RAG/OTI Maus; **E:** Zusammenfassung der sich in den RAG/OTI nach vier, 13-15 und 37 Stunden ergebende Zytotoxizität gegenüber RMA-OVA (linker, grauer Balken) oder SIINFEKL beladenen Milzzellen (rechter, schwarzer Balken). Anzahl der analysierten Tiere und der unabhängigen Experimenten, für RMA/RMA-OVA: vier Stunden (3 Tiere, ein Experiment), 13-15 Stunden (15 Tiere, vier Experimente), 37 Stunden (3 Tiere, ein Experiment); bzw. für Milzzellen \pm SIINFEKL: vier Stunden (4 Tiere, ein Experiment), 13-15 Stunden (9 Tiere, drei Experimente); **F:** Effekt von 2mg intravenös applizierten α -NK1.1 (PK136) Antikörpern auf die sich in den RAG/OTI nach 15 Stunden ergebende Zytotoxizität gegenüber RMA-OVA (linker, grauer Balken) oder SIINFEKL beladenen Milzzellen (rechter, schwarzer Balken); wiedergegeben ist das Ergebnis eines Experiments mit zwei Mäusen je Gruppe. **linker Balken:** Zytotoxizität gegenüber RMA-OVA; **rechter Balken:** Zytotoxizität gegenüber SIINFEKL beladenen Milzzellen. Wiedergegeben sind in A bis D die Ergebnisse repräsentativer Experimente. Fehlerbalken repräsentieren den SEM. nb = nicht bestimmt (Erläuterung s. Text)

Diese Daten belegen, dass OT-I NKT - Zellen mit Hilfe ihres transgenen T - Zellrezeptors Antigen spezifisch erkennen, und dies innerhalb weniger Stunden eine antigenspezifische Zytotoxizität aktivieren kann. Diese Zytotoxizität zeigte sich insbesondere gegenüber Tumorzellen und fiel gegenüber syngenen Milzzellen, trotz der Antigenpräsenz, deutlich geringer aus.

4.3. Die Interaktion von LSEC und NKT - Zellen und deren Folgen

Immunreaktionen werden vielfältig und komplex reguliert. Für NKT - Zellen wurden Interaktionen mit und Regulation durch antigen - präsentierende Zellen mehrfach beschrieben. Der zahlenmäßig prominenteste antigen - präsentierende Zelltyp innerhalb der Leber sind die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC), deren primäre immunologische Funktion ihr Beitrag in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz zu sein scheint (s. Einleitung).

Nahe liegend war deshalb zu untersuchen, ob und inwiefern NKT - Zellen und LSEC interagieren können. Eine solche Interaktion zeigte sich bei der α -CD3 Antikörper vermittelten NKT- und T - Zellaktivierung *in vivo* (4.3.1.). Des Weiteren wurden die Folgen einer LSEC - NKT Interaktion für die Expression von Oberflächenmarkern studiert (4.3.2.), und schließlich wurde untersucht, welche Auswirkungen eine solche Interaktion auf T - Zell vermittelte Immunreaktionen hat (4.3.3.).

4.3.1. Die Rolle der LSEC in der *in vivo* Aktivierung von NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen durch α -CD3 Antikörper:

Bei den unter Abschnitt 4.1.1. ausgeführten Experimenten mit einer Injektion direkt fluorochrom - konjugierter α -CD3 Antikörpern (s. Abb. 6) zeigte sich, dass auch TCR/CD3 - Komplex negative Zellen den Antikörper binden konnten.

Divalente α -CD3 Antikörper können T - Zellen nicht direkt aktivieren, sondern erst nach einer Quervernetzung mittels eines sekundären Antikörpers oder aufgrund der Bindung des α -CD3 Antikörpers an eine feste Phase (Meuer et al. 1983, 1984). Darüber hinaus ist bekannt, dass α -CD3 Antikörper ohne Fc - Anteil (F(ab') - Fragmente) nach intravenöser Gabe keine T - Zellstimulation induzieren (Hirsch et al. 1990, 1991, Blazar et al. 1991). Schließlich sprechen einige Daten, dass Fc - Rezeptoren für die *in vivo* Aktivierung notwendig sind (Ceuppens et al. 1985). Deshalb war die Annahme nahe liegend, dass die Quervernetzung *in vivo* durch Fc - Rezeptoren erfolgte, und dass die Färbung der TCR/CD3 - negativen Zellen diese Bindung des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers anzeigte.

Um diese Annahme zu testen, wurde zunächst der fluorochrom - markierter α -CD3 Antikörper intravenös appliziert und dessen Bindung an TCR α Zellen nach 30-45 Minuten *ex vivo*

gemessen (Abb. 16). Verglichen werden in Abbildung 16. die Fluoreszenzintensitäten für den fluorochromierten α -CD3 Antikörper auf sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC), charakterisiert durch den endothelspezifischen Antikörper ME9F1, sowie auf CD11c^{stark} bzw. CD11b⁺ CD11c⁻ Zellen der Milz, größtenteils Dendritische Zellen bzw. Makrophagen.

Nach einer Injektion von 2,5 μ g/Maus des fluorochrom - konjugierten Antikörpers waren 19,9% (\pm 1,1%) der ME9F1⁺ Leberzellen angefärbt (s. Abb. 16A). Für die CD11c^{stark} bzw. CD11b⁺ CD11c⁻ Zellen der Milz lagen die entsprechenden Werte bei 6,7% (\pm 1,6%) bzw. 6,5% (\pm 1,8%) (s. Abb. 16B und C). Der relative Anteil der jeweiligen Populationen an der aufgereinigten Gesamtzellzahl lag bei 11,8% (\pm 2,3%, ME9F1⁺), 5,1% (\pm 1%, CD11c^{stark}) und 4,7% (\pm 0,9%, CD11b⁺ CD11c⁻). Ein Grund für die geringere Markierung dieser Milzzellen dürfte erneut darin liegen, dass nicht alle Bereiche der Milz gleichmäßig von dem intravenös applizierten Antikörper erreicht zu werden scheinen (s. Abb. 6).

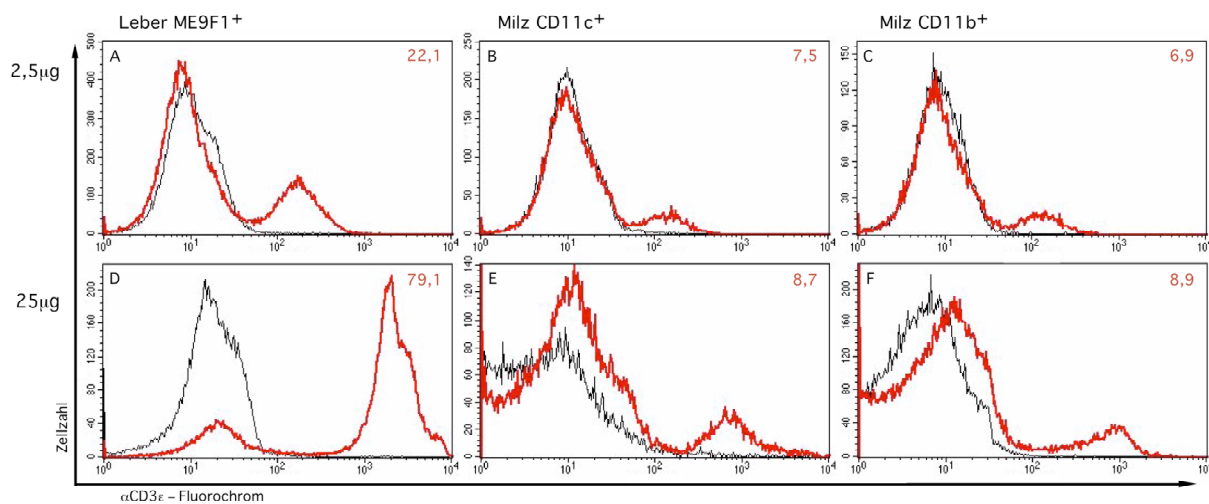


Abbildung 16. Die Bindung fluorochrom - markierter α -CD3 Antikörper an TCR/CD3 - Komplex negative Zellen *in vivo*: (B6/D2)_F₁ Mäusen wurde intravenös 2,5 μ g (A-C) oder 25 μ g (D-F) FITC- (A-C) bzw. PE- (D-F) markierter α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Unbehandelte Mäuse dienen als Kontrolle. Nach 30-45 Minuten wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und Milzlymphozyten aufgereinigt, mit dem ME9F1 - Antikörpern, sowie mit α -CD11c (HL3) und α -CD11b (M1/70) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse zweier repräsentativer Experimente.

A: Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf ME9F1⁺ Zellen der Leber von Kontroll- (schwarz) und 2,5 μ g α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen (rot); **B:** Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf CD11c⁺ Milzzellen von Kontroll- (schwarz) und 2,5 μ g α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen (rot); **C:** Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf CD11b⁺ Milzzellen von Kontroll- (schwarz) und 2,5 μ g α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen (rot); **D:** Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf ME9F1⁺ Zellen der Leber von Kontroll- (schwarz) und 25 μ g α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen (rot); **E:** Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf CD11c⁺ Milzzellen von Kontroll- (schwarz) und 25 μ g α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen (rot); **F:** Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf CD11b⁺ Milzzellen von Kontroll- (schwarz) und 25 μ g α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen (rot) wieder; **schwarz:** Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf den angegebenen Zellen von Kontrollmäusen; **rot:** Fluoreszenzintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf den angegebenen Zellen von α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen. Die angegebenen Zahlen geben den Prozentanteil der mit dem fluorochromierten α -CD3 Antikörper markierten Zellen wieder. (Erläuterung s. Text)

Eine Verzehnfachung der injizierten Antikörpermenge auf 25 µg/Maus lies den Prozentsatz an markierten CD11c^{stark} oder CD11b⁺ CD11c⁻ allerdings kaum weiter ansteigen (Abb. 16E und F). Dieser Anstieg gegenüber den Werten nach 2,5 µg α -CD3 β Antikörperinjektion fiel mit 5-30% deutlich schwächer aus als der entsprechende ca. 40%-ige Anstieg der markierten TCR β ⁺ Milzzellen (Abb. 6B vs. F). Lediglich auf den ME9F1⁺ Zellen der Leber führte die gesteigerte Antikörpermenge zu einem deutlichen Anstieg, sowohl des Prozentsatzes markierter Zellen (von ca. 20% auf 80%), als auch der Fluoreszenzintensität (Abb. 16D vs. A). Auf den entsprechenden Zellen im Lymphknoten bzw. Thymus war nur eine geringe (< 0,6%) bzw. keine (> 0,01%) Färbung mit dem fluorochromierten α -CD3 β Antikörper zu erkennen.

Zum Nachweis, ob Fc γ - Rezeptoren an der *in vivo* Stimulation von NKT- und T - Zellen infolge der intravenösen α -CD3 β Antikörpergabe beteiligt sind, wurde ein Antikörper gegen CD16/CD32 (2.4G2) ko-injiziert. Dieser Antikörper erkennt und blockiert Epitope der beiden Fc γ - Rezeptoren III (CD16) und II (CD32) (Kurlander et al. 1984, Voosen et al. 1995).

Hierbei zeigte sich, dass infolge der α -CD16/CD32 Antikörperinjektion die Aktivierung der NKT- und T - Zellen, gemessen an der veränderten TCR β - und CD69 - Expression, deutlich reduziert wurde (Abb. 17). In Leber und Milz fiel die Herunterregulierung des TCR β bei Applikation des α -CD3 β Antikörperinjektion alleine (Abb. 17 mittlere Zeile), deutlich stärker aus, als zusammen mit dem α -CD16/CD32 Antikörper (Abb. 17 letzte Zeile). Auch der drastische Anstieg der CD69 - Expression auf den T - Zellen blieb infolge der α -CD16/32 Antikörpergabe weitgehend aus (Abb. 17 letzte vs. mittlere Zeile). Bei geringeren Mengen des injizierten α -CD16/32 Antikörpers oder zu späteren Zeitpunkten nach Injektion war der Unterschied zwischen den beiden α -CD3 β Ansätzen, mit und ohne gleichzeitiger α -CD16/CD32 Antikörpergabe, geringer (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich bedurfte es für die inhibierende Wirkung des α -CD16/32 Antikörpers großer Antikörpermengen und war dennoch nur transient.

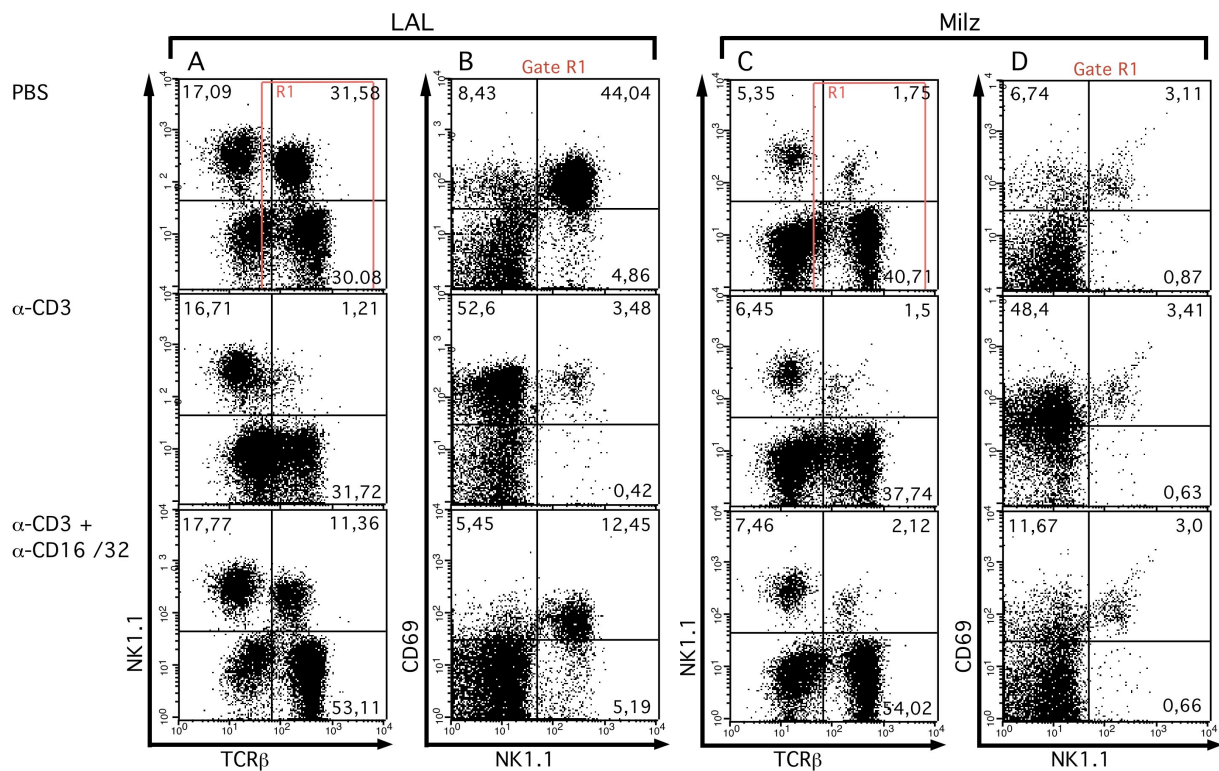


Abbildung 17. Die α -CD3e Antikörper vermittelte *in vivo* Aktivierung von NKT- und T - Zellen ist verzögert durch α -CD16/32 Antikörper: (B6/D2) F_1 Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) alleine (zweite Zeile) oder zusammen mit 600 μ g α -CD16/32 (2.4G2) Antikörper (dritte Zeile) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse (erste Zeile) dienen als Kontrolle. Nach 45 Minuten wurden Leber assoziierte Lymphozyten (erste und zweite Spalte) und Milzlymphozyten (dritte und vierte Spalte) aufgereinigt, mit α -TCR (H57-597), α -NK1.1 (PK136) und α -CD69 (H1.2F3) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Erste Zeile: Fluoreszenzintensitäten von Zellen aus mit PBS injizierten Mäusen; **zweite Zeile:** Fluoreszenzintensitäten von Zellen aus mit 1 μ g α -CD3 Antikörper injizierten Mäusen; **dritte Zeile:** Fluoreszenzintensitäten von Zellen aus mit 1 μ g α -CD3 und 600 μ g α -CD16/32 Antikörpern ko-injizierten Mäusen; **A:** Fluoreszenzintensitäten für TCR und NK1.1 aller aufgereinigten LAL; **B:** Fluoreszenzintensitäten für NK1.1 und CD69 auf den Leberzellen im angegebenen Fenster R1 (Gate R1 in rot in A); **C:** Fluoreszenzintensitäten für TCR und NK1.1 aller aufgereinigten Milzlymphozyten; **D:** Fluoreszenzintensitäten für NK1.1 und CD69 auf den Milzzellen im angegebenen Fenster R1 (Gate R1 in rot in C). Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen Quadranten in Prozent wieder. (Erläuterung s. Text)

Zum Nachweis, dass die Fc - Rezeptoren auf antigenpräsentierenden Zellen hinreichend für eine α -CD3 Antikörper vermittelte T - Zellaktivierung sind, wurden 15 Minuten nach intravenöser Antikörperinjektion LSEC, sowie CD11b⁺ CD11c⁺ Zellen aus der Milz, größtenteils Makrophagen ($M\emptyset$) und Dendritische Zellen (DC), aufgereinigt und *in vitro* mit NKT - Zellhybridomen (DN3A4-1.2) ko-inkubiert.

Hierbei zeigte sich, dass die LSEC aus α -CD3 Antikörper behandelten Mäusen *in vitro* die DN3A4-1.2 Zellen zur IL-2 Produktion stimulierten (Abb. 18A). Daraus wurde geschlossen, dass die LSEC *in vivo* α -CD3 Antikörper gebunden hatten und dieser *in vitro* die Hybridome

stimulieren konnte. Die IL-2 Werte mit den aufgereinigten Milzzellen lagen in der Regel unter denen mit den LSEC ermittelten Werten (Abb. 18A).

Des weiteren zeigte sich auch *in vitro* die Fc γ - Rezeptor Abhängigkeit der α -CD3 γ induzierten Stimulation der NKT - Zellhybridome. Denn diese Stimulation konnte durch die Zugabe von α -CD16/32 Antikörper, in der drei bis vierfachen Menge des α -CD3 γ Antikörpers, um 91-98% gehemmt werden (Abb. 18B). Die Zugabe einer identischen Menge an polyklonalem IgG - Antikörper reduzierte die produzierte IL-2 Menge nur um 5-17% (Abb. 18B), vermutlich aufgrund einer Konkurrenz mit dem α -CD3 γ Antikörper um die Fc - Rezeptorbindungsstellen.

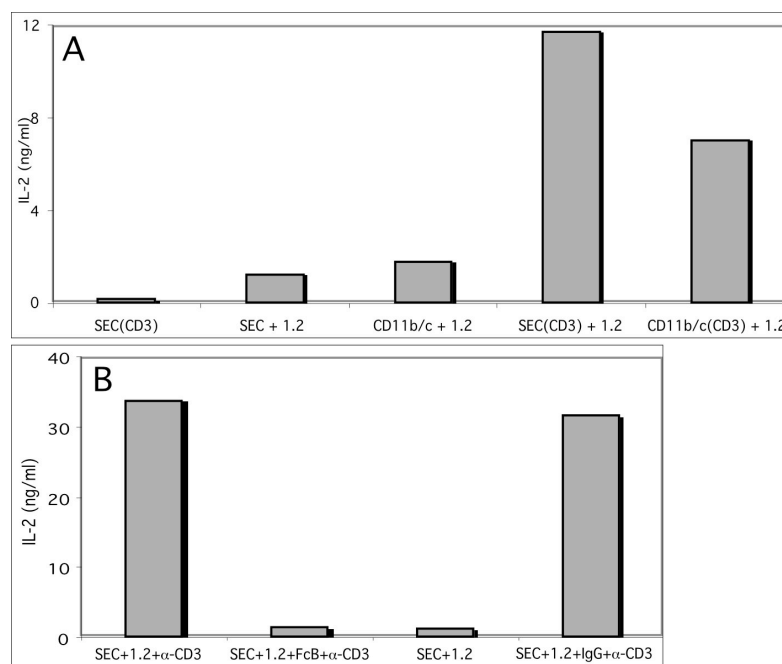


Abbildung 18. An LSEC und CD11b⁺ CD11c⁺ Milzzellen gebundene α -CD3 γ Antikörper aktivieren NKT - Zellhybridome *ex vivo* und *in vitro*:

A: (B6/D2)F₁ Mäusen wurde intravenös 25 μ g α -CD3 γ Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach 15-20 Minuten wurden sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) und CD11b⁺ CD11c⁺ Milzzellen (CD11b/c) aufgereinigt, und direkt mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) ko-inkubiert. Nach 25 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die IL-2 Konzentration (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Wiedergegeben sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

B: Aus unbehandelten (B6/D2)F₁ Mäusen aufgereinigte LSEC wurden mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) ko-inkubiert. Wie angegeben wurde zur Ko-Kultur 1 μ g α -CD3 γ Antikörper (145.2C11) alleine oder zusammen mit 4 μ g α -CD16/32- (2.4G2, FcB) bzw. 4 μ g polyklonalem IgG Antikörper (IgG) zugegeben. Nach 18 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die IL-2 Konzentration (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Wiedergegeben sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Die Bindung von α -CD3 γ Antikörpern an LSEC und CD11b⁺ CD11c⁺ Milzzellen *in vivo* ist hinreichend für eine Aktivierung der NKT - Zellhybridome *in vitro* (A) und ist abhängig von Fc γ - Rezeptoren (B).

Um weiteren Aufschluss über die beteiligten Fc γ - Rezeptoren und ihrer Rolle in unterschiedlichen Organen zu erlangen, wurden die Experimente mit verschiedenen Fc γ - Rezeptor defizienten Tieren wiederholt. Eingesetzt wurden Mäuse ohne den Fc γ - Rezeptor II

(Fc γ RII $^{-/-}$) bzw. III (Fc γ RIII $^{-/-}$), sowie ohne die FcR γ - Kette (FcR $\gamma^{-/-}$), die für die Signalweiterleitung und Expression des FcR γ und des Fc γ R essentiell ist (Takai et al. 1994).

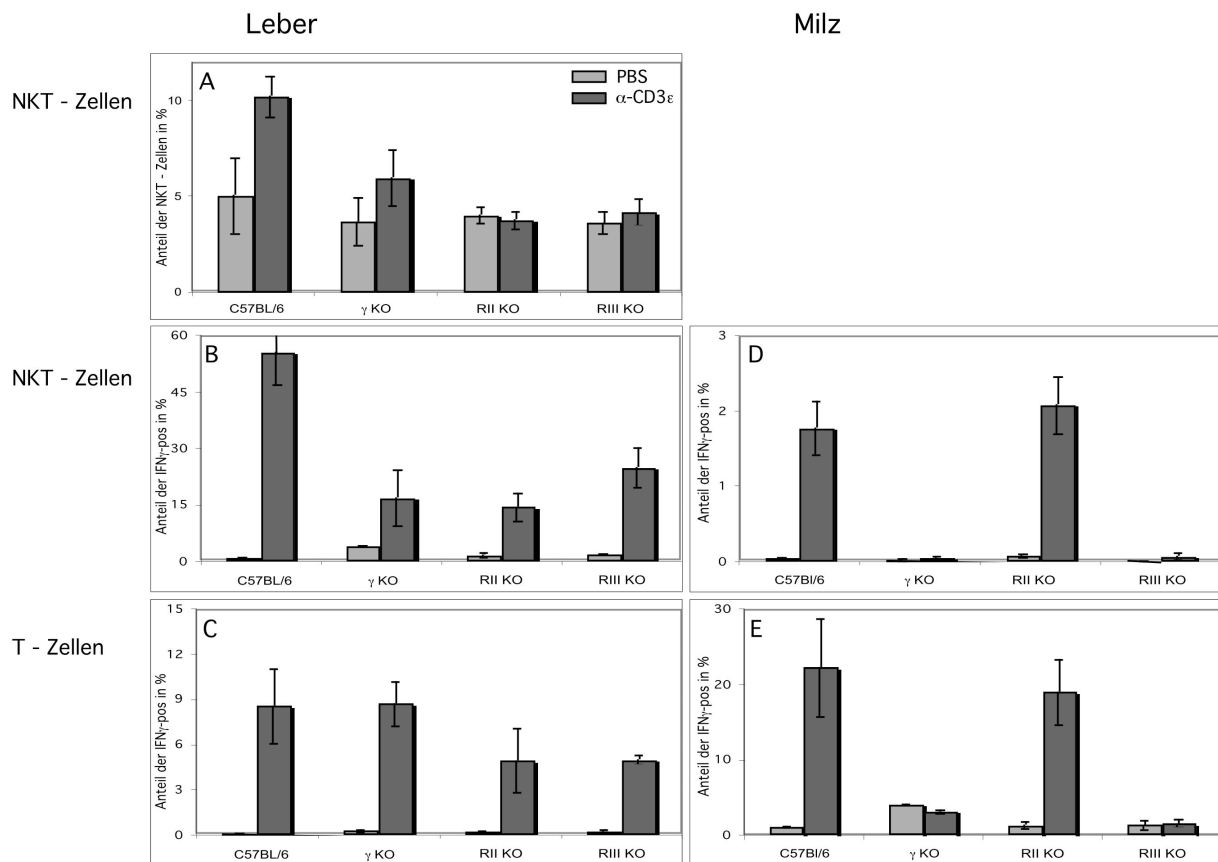


Abbildung 19. Die Rolle verschiedener Fc γ - Rezeptoren bei der α -CD3 Antikörper vermittelten Aktivierung von NKT- und T - Zellen *in vivo*: C57BL/6, FcR $\gamma^{-/-}$ (γ KO), Fc γ RII $^{-/-}$ (RII KO) und Fc γ RIII $^{-/-}$ (RIII KO) Mäusen wurde intravenös 1 μ g α -CD3 Antikörper (Klon 145.2C11) in PBS injiziert. Mit PBS injizierte Mäuse dienten als Kontrolle. Nach einer Stunde wurden Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) und Milzlymphozyten aufgereinigt, mit α -TCR γ (H57-597), α -NK1.1 (PK136) und α -IFN γ (XMG1.2) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

A: relative Anteil der NKT - Zellen an der Gesamtzellzahl aller aufgereinigten LAL; **B:** relative Anteil der IFN γ NKT - Zellen innerhalb der Leber in Prozent nach PBS- (linker, grauer Balken) oder α -CD3 Antikörperbehandlung (rechter, schwarzer Balken); **C:** relative Anteil der IFN γ T - Zellen innerhalb der Leber in Prozent nach PBS- (linker, grauer Balken) oder α -CD3 Antikörperbehandlung (rechter, schwarzer Balken); **D:** relative Anteil der IFN γ NKT - Zellen innerhalb der Milz in Prozent nach PBS- (linker, grauer Balken) oder α -CD3 Antikörperbehandlung (rechter, schwarzer Balken); **E:** relative Anteil der IFN γ T - Zellen innerhalb der Milz in Prozent nach PBS- (linker, grauer Balken) oder α -CD3 Antikörperbehandlung (rechter, schwarzer Balken); **linker Balken:** PBS - Behandlung; **rechter Balken:** α -CD3 Antikörperbehandlung. Anzahl der analysierten Tiere, bei mindestens zwei unabhängigen Experimenten, für PBS: 4x (C57BL/6) und 2x (FcR $\gamma^{-/-}$, Fc γ RII $^{-/-}$ und Fc γ RIII $^{-/-}$) bzw. für α -CD3: 8x (C57BL/6) und 4x (FcR $\gamma^{-/-}$, Fc γ RII $^{-/-}$ und Fc γ RIII $^{-/-}$). Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (Erläuterung s. Text)

Bei den Fc γ RII $^{-/-}$ und Fc γ RIII $^{-/-}$ Mäusen blieb der relative Anstieg der NKT - Zellzahl in der Leber, infolge der α -CD3 Antikörperinjektion, weitgehend aus (Abb. 19A). Dieselbe Tendenz war bei den NKT - Zellen der FcR $\gamma^{-/-}$ Tiere und bei den Leber T - Zellen aller drei defizienter Mauslinien zu erkennen, doch waren die Unterschiede nicht signifikant (Abb. 19A). Auch der Anstieg des relativen Anteils an IFN γ - produzierenden NKT- (Abb. 19B) und

T - Zellen in den Lebern (Abb. 19C) der Fc γ RII^{-/-} und Fc γ RIII^{-/-} Mäusen fiel deutlich geringer aus. Entsprechendes galt bei den Fc γ R^{-/-} defizienten Tieren ebenfalls für die NKT-, nicht aber für die T - Zellen (Abb. 19B und C). In der Milz zeigte sich ein etwas anderes Bild. Dort kam es sowohl bei den NKT- als auch bei den T - Zellen zu keinem Anstieg an IFN γ - produzierenden Zellen in den Fc γ R^{-/-} und Fc γ RIII^{-/-} Mäusen, jedoch war im Falle der Fc γ RII^{-/-} Tiere kein Unterschied zu den Werten in C57BL/6 Mäusen zu erkennen (Abb. 19D und E).

Somit zeigte sich, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen mit dem ko-injizierten α -CD16/32 Antikörper (s. Abb. 17), auch in den Experiment mit den Fc γ - Rezeptor defizienten Tieren die Rolle von Fc γ R II und III in der *in vivo* Stimulation von NKT- und T - Zellen durch α -CD3 α Antikörper. Darüber hinaus sprechen die Daten für eine Beteiligung des Fc γ RI an der *in vivo* Stimulation und für organspezifische Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung der drei Fc γ - Rezeptoren.

4.3.2. Molekulare Voraussetzungen und Folgen der LSEC/NKT Zellinteraktion

Eine Vielzahl an Molekülen sind bekannt und beschrieben, mittels derer NKT- und T - Zellen mit den antigenpräsentierenden Zellen interagieren und sich wechselseitig in ihren immunologischen Funktionen beeinflussen können (s. Einleitung).

Folglich wurde in dieser Arbeit zunächst untersucht ob die entsprechenden Moleküle auch für eine Interaktion von NKT - Zellen und LSEC zur Verfügung stünden, und ob sich infolge der Interaktion eine Regulation dieser Moleküle beobachten ließe.

4.3.2.1. LSEC exprimieren funktionell aktives CD1d:

Etwa 90% der NKT - Zellen in muriner Leber tragen einen T - Zellrezeptor der Antigen nur im Kontext des MHC I homologen Moleküls CD1d erkennt (s. Einleitung). Bisher gab es keine Veröffentlichungen, die eindeutig die Expression von CD1d auf LSEC belegen.

Zur Klärung dieser Frage wurden LSEC aufgereinigt und nach vier Tagen *in vitro* Kultur mit α -CD1d Antikörpern gefärbt. Es zeigte sich eine deutliche, homogene Expression von CD1d auf allen LSEC (Abb. 20). Diese Expression war unbeeinflusst von der Ko-Kultur mit Lymphozyten, selbst bei der zusätzlichen Anwesenheit stimulatorischer Substanzen, wie z.B. α -Galactosylceramid, immunstimulatorischer Oligonukleotide oder dem T - Zellmitogen PMA (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die CD1d - Expression auf LSEC durch eine Interaktion mit Lymphozyten nicht beeinflusst wird.

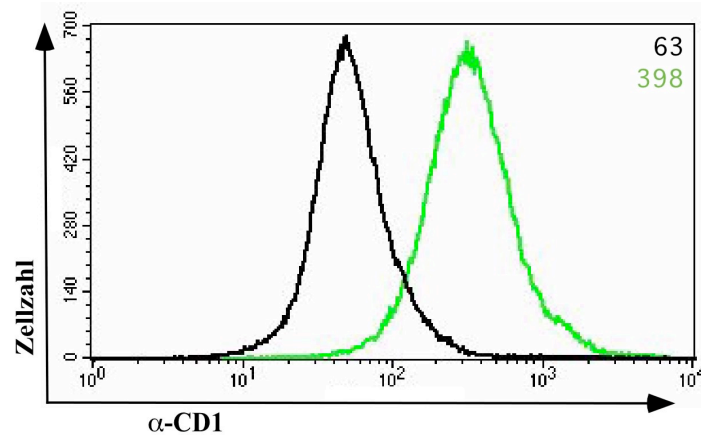


Abbildung 20. LSEC exprimieren CD1d: Aus (B6/D2) F_1 Mäusen aufgereinigte sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) wurden nach vier Tagen *in vitro* Kultur mit ME9F1 - Antikörpern, sowie mit \square -CD31 (MEC13.3) und \square -CD1d Antikörpern (1B1) oder dem entsprechenden Isotypantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Dargestellt ist die CD1d (grün) bzw. Isotyp- (schwarz) Fluoreszenzintensitäten für ME9F1 $^+$ CD31 $^+$ Zellen. Die angegebenen Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensitäten der CD1d bzw. Isotypfärbung wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen).

Zur Bestätigung, dass diese CD1d - Expression auf den LSEC auch eine funktionelle Stimulation von NKT - Zellen ermöglicht, wurden NKT - Zellhybridome mit LSEC unter Anwesenheit von \square -Galactosylceramid (\square -GalCer) ko-inkubiert (Abb. 21). \square -GalCer bindet an CD1d und stimuliert hierdurch alle NKT - Zellen mit dem invarianten V \square 24J \square 281 T - Zellrezeptor (s. Einleitung). Die verwendete NKT - Hybridomzelllinie DN3A4-1.2 exprimiert ebenfalls den V \square 24J \square 281 T - Zellrezeptor (Burdin et al. 1998, Brossay et al. 1998b). Es zeigte sich, dass die DN3A4-1.2 Zellen durch \square -GalCer zur IL-2 Produktion angeregt werden konnten (Abb. 21A). Die Tatsache, dass diese IL-2 Produktion der DN3A4-1.2 durch blockierende \square -CD1d Antikörper deutlich reduziert werden konnte (Abb. 21A), weist auf die CD1d Abhängigkeit der Stimulation hin. Eine Präinkubation der LSEC mit \square -GalCer für ca. 30 Minuten war nicht hinreichend eine solche Aktivierung zu induzieren (Abb. 21B). Erst nach einer Präinkubation von dreieinhalb Stunden und deutlicher nach 22,5 Stunden konnten die behandelten LSEC die NKT - Hybridome zur IL-2 Produktion anregen (Abb. 21B). Offensichtlich bedürfen auch die LSEC einer Aufnahme des \square -GalCer und einer endosomalen Verarbeitung für eine effektive Präsentation via CD1d, wie es für andere antigen - präsentierende Zellen bereits beschrieben wurde (Kawano et al. 1997).

Diese Daten belegen, dass LSEC CD1d exprimieren, darüber funktionell \square -GalCer präsentieren und hierdurch NKT - Zellhybridome aktivieren können.

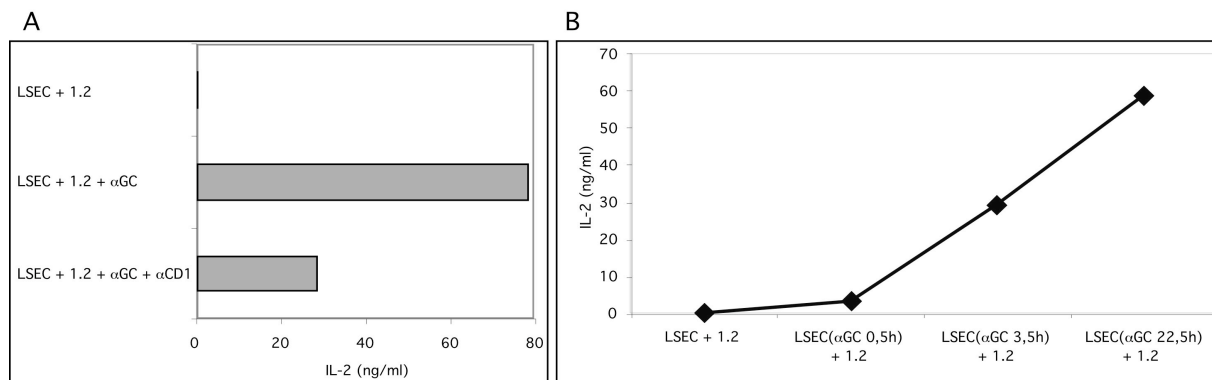


Abbildung 21. Mit β -GalCer beladenen LSEC aktivieren NKT - Zellhybridome CD1d abhängig:

A: Zu aus (B6/D2) F_1 Mäusen aufgereinigten sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) wurde nach vier Tagen *in vitro* Kultur 20ng/ml β -Galactosylceramid (β GC) zugegeben und mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) ko-inkubiert. Als Test auf die CD1d Abhängigkeit der Stimulation wurde ein Ansatz in Anwesenheit von β -CD1d Antikörpern (1B1) inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die IL-2 Konzentration (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Dargestellte Werte entsprechen dem Mittelwert von Triplikaten eines repräsentativen Experiments.

B: Zu aus (B6/D2) F_1 Mäusen aufgereinigten sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) wurde nach vier Tagen *in vitro* Kultur 20ng/ml β -Galactosylceramid (β GC) zugegeben. Nach 0,5, 3,5 und 22,5 Stunden wurden die LSEC gewaschen und in frischem Medium mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) ko-inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die IL-2 Konzentration (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Dargestellte Werte entsprechen dem Mittelwert von Triplikaten eines repräsentativen Experiments. (Erläuterung s. Text)

4.3.2.2. Folgen einer LSEC/NKT - Zellinteraktion:

NKT - Zellen und LSEC exprimieren konstitutiv oder nach Aktivierung eine Reihe von immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen die als Rezeptor/Ligand Paare potentiell eine Interaktion zwischen beiden Zelltypen ermöglichen könnten (s. Einleitung).

Auf Seiten der NKT - Zellen wurden die kostimulatorischen Moleküle CD154 und ICOS für die Analyse ausgewählt. Für beide Moleküle ist eine wesentliche Rolle als Kostimulatoren für T - Zellen beschrieben worden (Grewal et al. 1998, Diehl et al. 2000, Hurwitz et al. 2000), Seitens der LSEC wurden die Zelladhäsionsmoleküle CD54 und CD106, die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und ICOS-Ligand (ICOS-L), sowie die antigen - präsentierenden Moleküle MHC I, MHC II und CD1d näher untersucht.

LSEC wurden mit LAL oder NKT - Zellhybridomen alleine oder unter Anwesenheit von β -GalCer ko-inkubiert und nach 18 Stunden wurde die Expression der genannten Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch analysiert.

Im Falle der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD106 zeigte sich, dass die Ko-Kultur mit LAL (Abb. 22A und C) bzw. mit dem NKT - Zellybridom DN3A4-1.2 (Abb. 22B und D) ausreicht, um die Expression auf den LSEC deutlich zu erhöhen. Die zusätzliche Anwesenheit von β -GalCer steigerte die Expression für CD54 nur geringfügig weiter (Abb. 22A und B). Bei CD106 lies sich jedoch mit β -GalCer ein weiteres, deutliches Ansteigen der Expression beobachten (Abb. 22C und D).

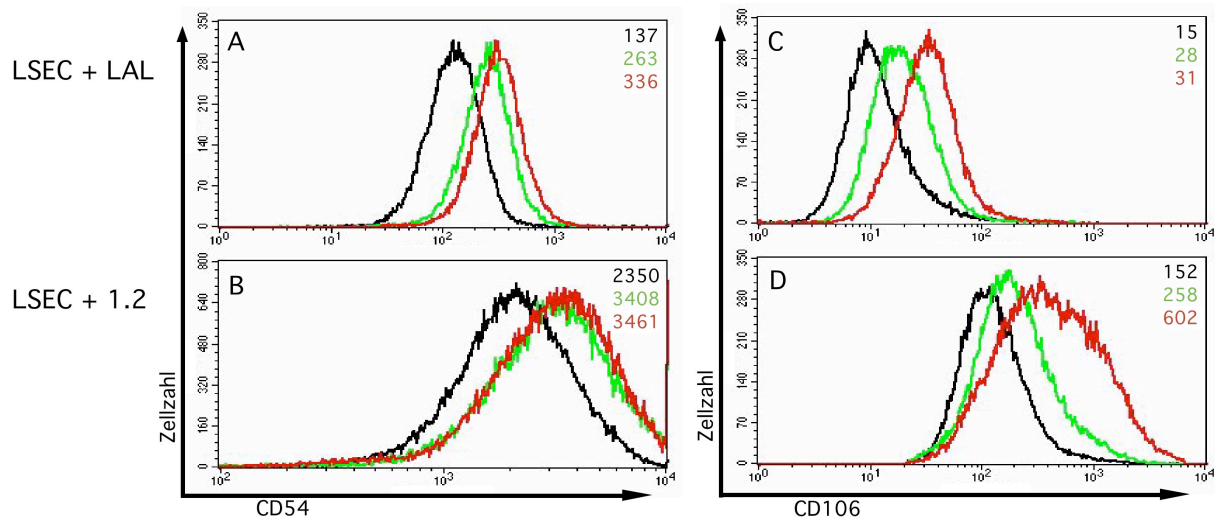


Abbildung 22. Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD106 auf LSEC nach Ko-Kultur mit Lymphozyten: Aus (B6/D2)_{F1} Mäusen aufgereinigte sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) wurde nach vier Tagen *in vitro* Kultur mit Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) (A und C) bzw. mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) (B und D) ko-inkubiert. Wie angegeben wurde zu den Ansätzen 20ng/ml α -Galactosylceramid (α -GalCer) zugegeben. Nach 18 Stunden Inkubation wurden die LSEC aus der Kulturschale abgelöst, mit ME9F1 - Antikörpern, sowie mit α -CD54 (3E2) und α -CD106 Antikörpern (429) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse repräsentativer Experimente.

A: Fluoreszenzintensitäten für CD54 für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit den LAL alleine (grün) oder in Anwesenheit von α -GalCer (rot); **B:** Fluoreszenzintensitäten für CD54 für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) alleine (grün) oder in Anwesenheit von α -GalCer (rot); **C:** Fluoreszenzintensitäten für CD106 für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit den LAL alleine (grün) oder in Anwesenheit von α -GalCer (rot); **D:** Fluoreszenzintensitäten für CD106 für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) alleine (grün) oder in Anwesenheit von α -GalCer (rot); **schwarz:** Fluoreszenzintensitäten für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen; **grün:** Fluoreszenzintensitäten für ME9F1⁺ Zellen aus der Ko-Kultur der LSEC mit den LAL (A und C) bzw. dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) (B und D); **rot:** Fluoreszenzintensitäten für ME9F1⁺ Zellen aus der Ko-Kultur der LSEC mit den LAL (A und C) bzw. dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) (B und D) in Anwesenheit von α -GalCer. Die angegebenen **Zahlen** geben die mittlere Fluoreszenzintensitäten der Färbung der ME9F1⁺ Zellen wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). (Erläuterung s. Text)

Bei den kostimulatorischen Moleküle CD40 und ICOS-L waren die Effekte weniger prominent, doch immer noch deutlich. Während die Expression von CD40 auf den LSEC nach Inkubation mit LAL leicht anstieg (Abb. 23A), blieb sie mit DN3A4-1.2 praktisch unverändert (Abb. 23B). Infolge der Ko-Kultur mit LAL stieg die ICOS-L - Expression auf den LSEC deutlich an (Abb. 23C). Die Zugabe von α -GalCer zur Ko-Kultur von LSEC und LAL erbrachte bei beiden Molekülen eine schwache weitere Zunahme der Expression (Abb. 23).

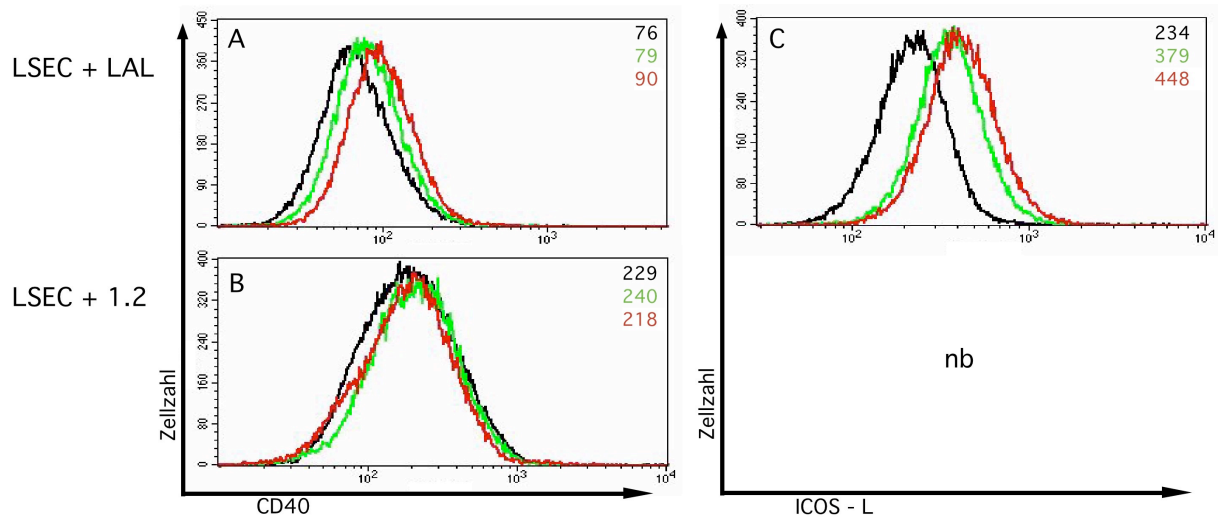


Abbildung 23. Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und ICOS-L auf LSEC nach Ko-Kultur mit Lymphozyten: Aus (B6/D2)F₁ Mäusen aufgereinigte sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) wurde nach vier Tagen *in vitro* Kultur mit Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) (A und C) bzw. mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) (B) ko-inkubiert. Wie angegeben wurde zu den Ansätzen 20ng/ml β -Galactosylceramid (β -GalCer) zugegeben. Nach 18 Stunden Inkubation wurden die LSEC aus der Kulturschale abgelöst, mit ME9F1 - Antikörpern, sowie mit β -CD40 (3/23) und β -ICOS-L Antikörpern (freundlicherweise von R. Kroczek (Berlin) zur Verfügung gestellt) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse repräsentativer Experimente.

A: Fluoreszenzintensitäten für CD40 für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit den LAL alleine (grün) oder in Anwesenheit von β -GalCer (rot); **B:** Fluoreszenzintensitäten für CD40 für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) alleine (grün) oder in Anwesenheit von β -GalCer (rot); **C:** Fluoreszenzintensitäten für ICOS-L für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit den LAL alleine (grün) oder in Anwesenheit von β -GalCer (rot); **schwarz:** Fluoreszenzintensitäten für ME9F1⁺ Zellen aus unbehandelten LSEC Kulturen; **grün:** Fluoreszenzintensitäten für ME9F1⁺ Zellen aus der Ko-Kultur der LSEC mit den LAL (A und C) bzw. dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) (B); **rot:** Fluoreszenzintensitäten für ME9F1⁺ Zellen aus der Ko-Kultur der LSEC mit den LAL (A und C) bzw. dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) (B) in Anwesenheit von β -GalCer. Die angegebenen **Zahlen** geben die mittlere Fluoreszenzintensitäten der Färbung der ME9F1⁺ Zellen wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). nb = nicht bestimmt. (Erläuterung s. Text)

Somit steigerte bereits die Anwesenheit von unstimulierten LAL oder NKT - Hybridomen die Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen auf den LSEC. Die Stimulation der NKT - Zellen mit β -GalCer hatte meist nur geringen additiven Effekt.

Hinsichtlich der Expressionsstärke von CD1d, MHC I, MHC II, CD80 und CD86 auf den LSEC ergaben sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen (Daten nicht gezeigt).

Auf der Lymphozytenseite konnte für das kostimulatorische Molekül CD154 sowohl auf den NKT - Zellen innerhalb der LAL (Abb. 24C), als auch auf den DN3A4-1.2 (Abb. 24B) ein Anstieg in Folge der Ko-Kultur mit LSEC und β -GalCer beobachten. Im Falle der Leber assoziierten NKT - Zellen genügte bereits die Inkubation mit LSEC um die Expression an CD154 zu erhöhen (Abb. 24C). Um die Expression an CD154 nach der Ko-Kultur eindeutig

zu belegen, wurde bei den DN3A4-1.2 Zellen die CD154 Färbung mit einer Isotypantikörperfärbung verglichen (Abb. 24A).

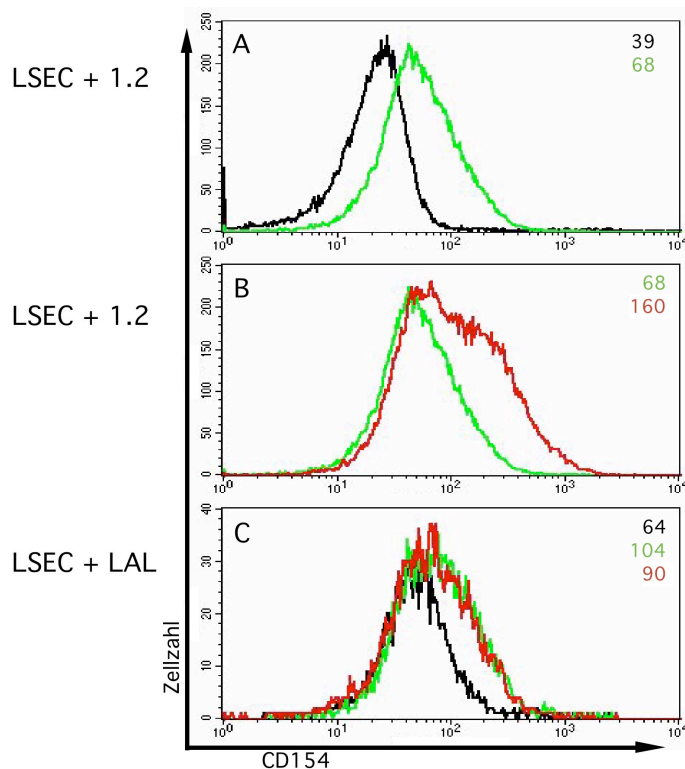


Abbildung 24. Expression des kostimulatorischen Moleküls CD154 auf NKT - Zellen bzw. NKT - Zellhybridomen nach Ko-Kultur mit LSEC: Aus (B6/D2)_F₁ Mäusen aufgereinigte sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) wurde nach vier Tagen *in vitro* Kultur mit dem NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) (A und B) bzw. mit Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) (C) ko-inkubiert. Wie angegeben wurde zu den Ansätzen 20ng/ml α -Galactosylceramid (α -GalCer) zugegeben. Nach 18 Stunden Inkubation wurden die Lymphozyten mit α -TCR α (H57-597), α -NK1.1 (PK136) und α -CD154 (MR1) Antikörpern oder dem entsprechenden Isotypantikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben sind die Ergebnisse repräsentativer Experimente.

A: Fluoreszenzintensitäten für CD154 (grün) bzw. des Isotypantikörpers (schwarz) für TCR α ⁺ Zellen aus der Ko-Kultur von NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) mit den LSEC; **B:** Fluoreszenzintensitäten für CD154 für TCR α ⁺ Zellen aus der Ko-Kultur von NKT - Zellhybridom DN3A4-1.2 (1.2) mit den LSEC alleine (grün) oder in Anwesenheit von α -GalCer (rot); **C:** Fluoreszenzintensitäten für CD154 für TCR α ⁺ NK1.1⁺ Zellen aus unbehandelten LAL Kulturen (schwarz) bzw. aus der Ko-Kultur mit den LSEC alleine (grün) oder in Anwesenheit von α -GalCer (rot). Die angegebenen Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensitäten der Färbung der TCR α ⁺ (A und B) bzw. der TCR α ⁺ NK1.1⁺ (C) Zellen wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). (Erläuterung s. Text)

Für die Expression des kostimulatorischen Moleküls ICOS auf den NKT - Zellen bzw. Hybridomen lies sich keine Veränderung infolge der Ko-Kultur mit LSEC nachweisen. Jedoch zeigte eine *ex vivo* Färbung der LAL, dass ca. 30% der NKT - Zellen ICOS konstitutiv exprimierten (Abb. 25). Bei den konventionellen T - Zellen lag der Anteil bei ca. 0,7% (Abb. 25).

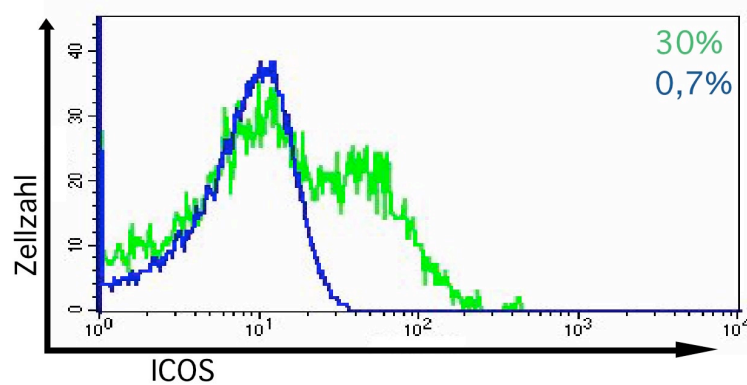


Abbildung 25. Leber assoziierte NKT - Zellen exprimieren konstitutiv ICOS: Aus (B6/D2) F_1 Mäusen aufgereinigte Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) wurden direkt *ex vivo* mit α -TCR α (H57-597), α -NK1.1 (PK136) und α -ICOS (MIC-280, freundlicherweise von R. Kroczek (Berlin) zur Verfügung gestellt) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wiedergegeben ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensitäten für ICOS. **grün:** TCR α^+ NK1.1 $^+$ Zellen; **blau:** TCR α^+ Zellen. Die angegebenen Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensitäten der ICOS Färbung wieder (die Farben entsprechen denen der Graphen). (Erläuterung s. Text)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch eine Ko-Kultur von LSEC und Leber assoziierten Lymphozyten bzw. NKT - Zellhybridomen die Expression verschiedener immunologisch relevanter Oberflächenmarker, wie z.B. CD54, CD106, CD154 und ICOS-L anstieg. In den meisten Fällen lies sich diese Expression durch die Anwesenheit des NKT - zellspezifischen Stimulators α -GalCer noch steigern. Dies legt eine funktionelle Interaktion zwischen LSEC und NKT - Zellen nahe. Insbesondere die ICOS/ICOS-L Interaktion war im Lichte der tolerogenen Funktion der LSEC von Interesse und wurde weiter untersucht (s. 4.3.3.).

4.3.3. Die Rolle der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Toleranzinduktion durch LSEC *in vitro*:

Wie unter 4.3.2. dargestellt ist ICOS/ICOS-L eines der Rezeptor/Liganden Paare, die durch die Interaktion von LSEC mit NKT - Zellen beeinflusst werden (s. Abb. 23).

Dies war von besonderem Interesse, da eine Beteiligung von ICOS/ICOS-L innerhalb der peripheren Toleranz beschrieben wurde (Akbari et al. 2002). Die tolerogene Funktion der LSEC wurde durch Arbeiten in diesem Labor bereits ausführlich dokumentiert (z.B. Limmer et al. 2000), doch war die molekulare Basis dieser Funktion bislang ungeklärt.

Um einen möglichen Einfluss des ICOS/ICOS-L Paares in der Toleranzinduktion durch LSEC zu untersuchen, wurde deren Interaktion mittels geeigneter Reagenzien blockiert. In einer Ko-Kultur von LSEC mit CD8 $^+$ T - Zellen in Anwesenheit des entsprechenden T - Zellantigens werden die T - Zellen antigenspezifischen toleriert, angezeigt durch den Verlust der

Zytotoxizität der CD8⁺ T - Zellen. Eine entsprechende Ko-Kultur mit Dendritischen Zellen aus der Milz induziert zytotoxische T - Zellen (s. Einleitung).

LSEC bzw. CD11c⁺ Milzzellen, vornehmlich Dendritische Zellen, wurden mit CD8⁺ Milzzellen von T - Zellrezeptor transgenen Desire Mäusen ko-inkubiert. Diese transgenen CD8⁺ T - Zellen erkennen drei endogenen Peptide im Kontext von H2-K^b (Guimezanes et al. 2001). Durch die Zugabe eines ICOS-Fc Konstruktes (freundlicherweise von R. Kroccek (Berlin) zur Verfügung gestellt) zur Ko-Kultur von LSEC und CD8⁺ T - Zellen wurde die Interaktion von ICOS und ICOS-L blockiert. Die CD8⁺ T - Zellen dieser Kultur zeigten nach fünf Tagen Inkubation eine deutliche zytotoxische Aktivität, im Gegensatz zur unbehandelten Ko-Kultur (Abb. 26). Folglich wurde durch die Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion die Toleranzinduktion der T - Zellen durch die LSEC unterbunden (Abb. 26). Die Anwesenheit eines \square -CD8-Fc Konstruktes hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Toleranzinduktion (Abb. 26). Dies zeigte an, dass keine unspezifische Blockade des Zell - Zell - Kontaktes für die mangelnde Tolerisierung verantwortlich sein kann.

Diese Daten belegen die wesentliche Rolle des ICOS/ICOS-L Paares an der Toleranzinduktion von CD8⁺ T - Zellen durch sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC).

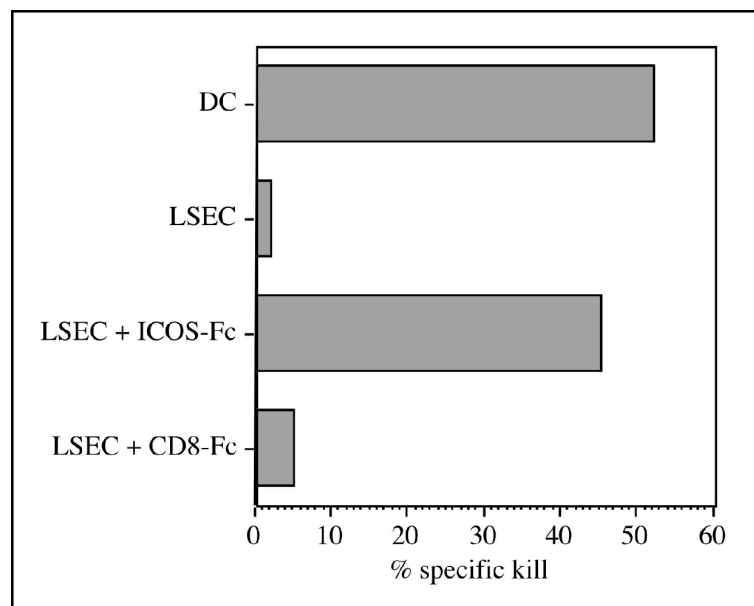


Abbildung 26. Die ICOS/ICOS-L Interaktion ist essentiell für die Toleranzinduktion von CD8⁺ T - Zellen durch LSEC: Aus C57BL/6 Mäusen aufgereinigte sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) bzw. CD11c⁺ Milzzellen (DC) wurden nach einem Tag *in vitro* Kultur mit über MACS aufgereinigte CD8⁺ Milzzymphozyten aus transgenen Desire Mäusen ko-inkubiert. Wie angegeben wurden lösliches ICOS-Fc bzw. CD8-Fc Protein hinzugegeben. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Lymphozyten abgespült und die antigenspezifische Zytotoxizität mittels des ⁵¹Cr - Freisetzungstests bestimmt (freundlicherweise von A. Limmer durchgeführt). Dargestellte Werte entsprechen dem Mittelwert von Triplikaten eines repräsentativen Experiments. (Erläuterung s. Text)

Ziel dieser Arbeit war, zum Verständnis der Rolle beizutragen, die NKT - Zellen innerhalb des immunologischen Mikromilieus der Leber spielen.

Bei der Untersuchung der NKT - Zellreaktivität zeigten sich hinsichtlich der Kinetik der Aktivierung und der Expressionsstärke des T - Zellrezeptor- Adaptorproteins TRIM klare Parallelen mit Gedächtnis- T - Zellen (5.1.1. und 5.1.2.). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass stimulierte und aktivierte NKT- und T - Zellen in die Leber rekrutiert werden, und sich die Repopulation der NKT - Zellen dynamisch am Bedarf reguliert (5.1.4.). In der Leber interagierten die NKT - Zellen mit sinusoidalen Leberendothelzellen (5.1.3. und 5.3.), was zu einer wechselseitigen Stimulation führte (5.3.). Schließlich sprechen die vorgelegten Daten einerseits für eine Rolle der NKT - Zellen in der Tumorabwehr, da erstmalig antigenspezifische zytotoxische Aktivität gegen ein tumorassoziiertes Modellantigen nachgewiesen werden konnte (5.2.). Interessanterweise ließen sich andererseits auch klare Hinweise auf eine entscheidende Beteiligung der NKT - Zellen in der antigenspezifischen Toleranzinduktion durch sinusoidalen Leberendothelzellen nachweisen (5.3.)

5.1. Mechanismen und Effekte einer *in vivo* NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T- Zellaktivierung infolge intravenöser α -CD3 β Antikörpergabe

Die von Eberl et al. (1998) beschriebene spezifische Aktivierung von NKT - Zellen durch die intravenöse Gabe von 1 μ g α -CD3 β Antikörper des Klons 145.2C11, wurde im Rahmen dieser Arbeit als Modellsystem einer *in vivo* NKT - Zellaktivierung eingesetzt.

5.1.1. Aktivierung von NKT- und NK - Zellen infolge der α -CD3 β Antikörperinjektion:

Eine *in vivo* NKT - Zellaktivierung und die Induktion von Effektormechanismen konnte erfolgreich durch die α -CD3 β Antikörperinjektion (Eberl et al. 1998) erzielt werden. Dies zeigte sich an der Herunterregulation des TCR β , der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und der Produktion von Zytokinen.

Die beobachtete verminderte Oberflächenexpression des T - Zellrezeptors auf allen NKT- und den meisten T - Zellen in der Leber infolge der α -CD3 β Stimulation (Abb. 2 und Abb. 3), ist als ein qualitatives und quantitatives Anzeichen einer T - Zellstimulation über den T - Zellrezeptor beschrieben worden (Valitutti et al. 1995, 1997). Diese Internalisierung des T - Zellrezeptors stellt ein Problem für die Detektion aktivierter NKT - Zellen *ex vivo* dar (s. z.B. Carnaud et al. 1999). Da jedoch das TCR β - bzw. das V α 5- Antikörperepitop trotz der Paraformaldehydfixierung erhalten blieb, ermöglichte die hier eingesetzte intrazelluläre Färbung auf Komponenten des TCR/CD3 - Komplexes dennoch eine eindeutige Detektion der NKT- und T - Zellen (Abb. 3 und Abb. 4). Die Internalisation des TCR/CD3 - Komplexes ist folglich die Ursache der mangelnden NKT - Zelldetektion *ex vivo* nach einer Stunde

Stimulation, und nicht wie bislang angenommen (s. z.B. Carnaud et al. 1999) eine bereits einsetzende Zelldeletion.

Somit erlaubte die hier verwendete intrazelluläre Färbung des TCR/CD3 - Komplexes erstmalig den Phänotyp und die Zytokinexpression von NKT - Zellen nach Aktivierung *ex vivo* eindeutig zu bestimmen. Diese Methode sollte zukünftig die Analyse von NKT - Zell vermittelten Immunreaktionen auf Einzelzellebene erleichtern können.

Eine Verminderung der Oberflächenexpression des NK1.1. Markers nach α -CD3 β Stimulation *in vitro* wurde zwar beschrieben (Chen et al. 1997b), wurde jedoch, unseres Wissens nach, bislang nicht bestätigt und zeigte sich in keiner der durchgeführten Färbungen (s. z.B. Abb. 2 und Abb. 3). Vermutlich war die beschriebene verminderte NK1.1 Expression Folge der gewählten *in vitro* Kulturbedingungen (Chen et al. 1997b).

Des Weiteren zeigte die rasche Zunahme der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 die Stimulation verschiedener Zellpopulationen an. Wie bereits von Eberl et al. (1998) beschrieben erfolgte diese Stimulation vornehmlich in der Leber und nur zu einem geringen Prozentsatz in der Milz. Entgegen dieser Veröffentlichung lies sich in dieser Arbeit auch ein Anstieg der CD69 Expression auf anderen Zellpopulationen, wie konventionellen T- und NK - Zellen, sowohl in der Leber als auch in der Milz nachweisen (s. z.B. Abb. 4 und Abb. 5). Diese Beobachtung steht allerdings in Einklang mit Veröffentlichungen, die eine CD69 Expression auf diesen Nicht - NKT - Zellen nach Gabe des CD1d bindenden α -Galactosylceramid (α -GalCer) beschrieben haben (Carnaud et al. 1999, Singh et al. 1999, Burdin et al. 1999, Eberl et al. 2000). Diese Daten weisen erneut auf den Einfluss der NKT - Zellen auf Immunzellen, sowohl des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems hin (Kronenberg et al. 2002).

Zum Test ob dieser Stimulation auch zelluläre Effektormechanismen folgten, wurde auf die Zytokine IL-4, TNF α und IFN γ intrazellulär gefärbt. In Übereinstimmung mit der Literatur (Yoshimoto et al. 1994, Eberl et al. 1998, Doherty et al. 1999, Ishihara et al. 2000) waren eine Stunde nach der intravenösen α -CD3 β Antikörperinjektion ein Großteil der NKT - Zellen aus der Leber positiv für IFN γ (55,6%), IL-4 (30,4%) und TNF α (38,7%) (s. Abb. 4 und Abb. 5). In der Milz war der relative Anteil an zytokin - produzierenden NKT - Zellen um 35-50% niedriger (Abb. 4 und Abb. 5). Dies mag zum Teil durch die geringere Erreichbarkeit der Milzzellen durch den α -CD3 β Antikörper erklärbar sein (s. 5.1.3.). Doch könnten auch organspezifische Unterschiede des basalen Grades der NKT - Zellaktivierung eine Rolle spielen. Hierfür spräche die Beobachtung, dass in den Kontrollmäusen der Anteil der CD69⁺ NKT - Zellen in der Milz mit 56,9% niedriger als in der Leber mit 75,3% lag (Abb. 5B).

Eine Expression von IL-4 bzw. TNF α infolge der α -CD3 β Antikörpergabe lies sich innerhalb des untersuchten Zeitraumes (bis vier Stunden nach Antikörperinjektion) nur innerhalb der NKT - Zellen der Leber und der Milz nachweisen (s. Tab. 3).

Es ist bekannt, dass die Aktivierung der NKT - Zellen mittels α -GalCer auch NK - Zellen zur Produktion von IFN γ anregt (Carnaud et al. 1999, Eberl et al. 2000). Eine derartige Aktivierung der NK - Zellen lies sich auch in dem hier verwendeten α -CD3 γ Antikörpermodell beobachten (Abb. 5). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich nicht um NKT - Zellen, die den TCR/CD3 - Komplex herunterreguliert hatten. Zu einen wäre dies durch die verwendete kombinierte intrazelluläre Färbung deutlich geworden. Zum anderen lag der Anteil der CD69⁺ NK - Zellen innerhalb der IFN γ Produzenten niedriger als bei den NKT - Zellen, und eine Abnahme der CD69 Expression bei gleichzeitiger Aktivierung zur IFN γ Produktion ist nicht zu erwarten.

Auffälligerweise war die Korrelation zwischen einer IFN γ Produktion und einer CD69 Expression nicht immer gegeben (Abb. 5). Dies machte die Verwendung des als früher Aktivierungsmarker bekannten CD69, als Surogatmarker für eine Aktivierung fraglich. Es erscheint angemessener von einer Zellaktivierung zu sprechen, wenn die betreffende Zelle auch Effektorfunktionen, wie z.B. eine Zytokinproduktion, ausführt. Es wird deshalb im Rahmen dieser Arbeit zwischen Stimulation, angezeigt durch eine CD69 Expression, und Aktivierung, angezeigt durch eine Zytokinproduktion, unterschieden.

5.1.2. Aktivierung von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen infolge der α -CD3 γ Antikörperinjektion:

Überraschend war bei der Analyse der Leber- und Milzlymphozyten nach der α -CD3 γ Antikörperinjektion das Auftreten von IFN γ produzierenden konventionellen T - Zellen (TCR γ ⁺ NK1.1⁻) mit einer zu den NKT - Zellen vergleichbaren Kinetik (Abb. 5A und D). Somit kann auch ein Teil der konventionellen T - Zellen *in vivo* durch geringe α -CD3 γ Antikörpermengen und innerhalb kurzer Zeit zur Ausführung von Effektorfunktionen aktiviert werden. Eine derartige Reaktivität ist hier erstmalig belegt.

Wie im Falle der NKT - Zellen, war auch hierbei der relative Anteil der IFN γ ⁺ an den CD69⁺ T - Zellen in der Milz geringer als in der Leber (hier um 65-80%) (Abb. 5). Dies mag ebenfalls zum Teil durch die geringere Erreichbarkeit der Milzzellen durch den α -CD3 γ Antikörper erklärbar sein (s. 5.1.3.).

Interessanterweise beruhte die Reaktivität der IFN γ ⁺ T - Zellen offensichtlich nicht auf der verfügbaren Antikörpermenge, da sich keine Korrelation zwischen der injizierten α -CD3 γ Antikörpermenge und dem Umfang der Stimulation und Aktivierung konventioneller T - Zellen zeigte (Tab. 3). Die Injektion von 2,5 μ g eines fluorochoмиerten α -CD3 γ Antikörpers zeigte darüber hinaus, dass bereits diese geringen Mengen Antikörpers genügten, alle T - Zellen in der Leber deutlich mit einer Intensität anzufärben, die auch bei einer *in vitro* Färbung zu erwarten wäre (s. Abb. 6). Eine Induktion einer IFN γ Produktion von konventio-

nelle T - Zellen infolge einer NKT - Zellaktivierung wurde bislang nicht beschrieben und erscheint unwahrscheinlich. Diese Punkte und die vergleichbare Zeitkinetik der IFN γ Produktion der reaktiven T - Zellen und NKT - Zellen, ließen vermuten, dass es sich um einen direkten Effekt des α -CD3 Antikörpers auf die T - Zellen handelte. Somit beruhte die IFN γ Produktion auf einer spezifischen Eigenschaft der reagierenden T - Zellen.

Eine sich anschließende eingehende Phänotypisierung dieser IFN γ produzierenden T - Zellen zeigte eine Expression an Oberflächenmarkern, CD44, CD62L und CD11a (Abb. 7), wie sie für Zellen beschrieben wurde, die bereits Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten, namentlich Effektor- und Gedächtnis- T - Zellen (Cho et al. 1999, Sprent et al. 2001a, 2001b, 2002). Der prozentuelle Anteil derartiger Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen ist, bei Abwesenheit einer starken Immunreaktion, innerhalb der Milzlymphozyten geringer, als innerhalb der Leberlymphozyten (Mashall et al. 2001, Masopust et al. 2001). Dies dürfte ebenfalls zum geringeren Anteil an IFN γ T - Zellen in der Milz, gegenüber der Leber beitragen,.

Somit sind es von allen konventionellen T - Zellen ausschließlich Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen, die eine Stunde nach der α -CD3 Antikörperinjektion Effektorfunktionen ausführen. Eine derartige Reaktivität von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen gegenüber intravenös appliziertem α -CD3 Antikörper wird hiermit erstmalig beschrieben.

Im Einklang mit dieser beobachteten Reaktivität, ist die Tatsache, dass die α -CD3 Antikörperinjektion auch erfolgreich zur Restimulation von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen eingesetzt werden konnte (Abb. 8). Der Prozentsatz von ca. 66% an antigenspezifischen Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen die nach der α -CD3 Antikörperinjektion IFN γ entspricht der Größenordnung nach derjenigen, die infolge einer *in vitro* Restimulation zu erwarten wäre. Die hier erstmalig beschriebene Methode einer *in vivo* Restimulation von Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen ist jedoch deutlich schneller (s.a. Chatenoud 1993) und verbleibt näher an der physiologischen Situation.

Im Lichte dieser Ergebnisse lassen sich einige publizierte Daten neu interpretieren, die darauf hinweisen, dass NKT - Zellen nicht allein für die IFN γ Produktion nach α -CD3 Antikörperinjektion verantwortlich sind. So zeigten Smiley et al. (1997), dass sich 90 Minuten nach intravenöser Injektion von 4 μ g α -CD3 Antikörper in Milzzellen CD1d defizienter, und damit auch V α 14i NKT - Zell defizienter, Tiere wie erwartet keine mRNA für IL-4 nachweisen lies, aber dennoch mRNA für IFN γ gemessen werden konnte. Die hier vorgelegten Daten legen die Vermutung nahe, dass diese IFN γ Produktion auf die Gedächtnis- T - Zellen der CD1d^{-/-} Maus zurückzuführen war.

Die dargelegte Reaktivität von NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen belegen eine weitere funktionelle Ähnlichkeit beider Zellpopulationen. Beide Zellpopulationen sind darauf ausgelegt, sehr schnell Effektorfunktionen innerhalb einer Immunreaktion zu übernehmen. Dies spiegelt sich in einer Reihe von Gemeinsamkeiten wieder.

Sowohl NKT-, als auch Gedächtnis- T - Zellen sind für eine Aktivierung nicht auf eine umfangreiche Kostimulation angewiesen, wie dies für naive T - Zellen der Fall ist (s. Einleitung). Beide Zelltypen erzielen innerhalb von wenigen Stunden Effektorfunktionen, teilweise auch aufgrund bereits synthetisierter und gespeicherter Effektormolekülen, wie z.B. Granzym B und Perforin (Dao et al. 1998, Exley et al. 1998, Kawamura et al. 1998, Kawano et al. 1998, Cho et al. 1999). Darüber hinaus hat die schnelle Sekretion von Zytokinen, wie IFN γ , IL-4 und TNF α , durch beide Zelltypen entscheidenden Einfluss auf die Initiierung und den weiteren Ablauf von Immunantworten. Sowohl NKT-, als auch Gedächtnis- T - Zellen benötigen für ihre Zellteilung und ihr weiteres Überleben keinen Kontakt mit MHC oder CD1d, sind aber auf das Zytokin IL-15 angewiesen. Auch dies steht in Gegensatz zu naiven T - Zellen, die ohne MHC Kontakt oder IL-7 nicht überleben (Ohteki et al. 1997, Zhang et al. 1998, Godfrey et al. 2000, Sprent et al. 2001a, 2001b, 2002).

Des Weiteren lassen einige Daten die strikte Trennung von NKT- und T - Zellen per se als fraglich erscheinen. So trägt eine Subpopulation der NKT - Zellen naiver Mäuse den CD8 Ko-rezeptor zusammen mit einem polyklonalen Repertoire des T - Zellrezeptors (Hammond et al. 1999, Eberl et al. 1999). Darüber hinaus wurden NK1.1⁺ T - Zellen beschrieben, die den invarianten V α 14J α 281 T - Zellrezeptor tragen (Benlagha et al. 2000, Matsuda et al. 2000). Des Weiteren ist bekannt, dass konventionelle T - Zellen nach Stimulation NK - Marker exprimieren können, wie z.B. α -asGM1 (Stein et al. 1978, Schwarting et al. 1980, Doherty et al. 1987), sowie NK1.1 und DX5 (CD49b) (Assarsson et al. 2000, Kambayashi et al. 2000, Slifka et al. 2000, McMahon et al. 2001, 2002), welche T - Zellfunktionen regulieren können. Aufgrund dieser Schwierigkeit der eindeutigen Klassifikation von Immunzellen an Hand von Oberflächenmarkern allein, wurde bereits versucht stattdessen funktionelle Kriterien heranzuziehen (Shires et al. 2001, Hayday et al. 2001).

Eine weitere Gemeinsamkeit von NKT- und Gedächtnis- T-Zellen zeigte sich bei den Färbungen auf das membranständige Adaptorprotein TRIM (Abb. 9). TRIM verbindet den TCR/CD3 - Komplex mit der nachgeschalteten Signalkaskade (Bruyns et al. 1998, Schraven et al. 1999). Darüber hinaus ist TRIM offensichtlich auch an der Regulation der T - Zellrezeptorexpression beteiligt (Kirchgessner et al. 2001). Die Experimente mit Zelllinien, die TRIM überexprimieren, sprechen dafür, dass TRIM die Oberflächenexpression an CD3 ζ stabilisiert und hierdurch die Verweildauer des TCR/CD3 - Komplexes auf der Zelloberfläche verlängert (Kirchgessner et al. 2001).

Sowohl NKT-, als auch Gedächtnis- T-Zellen exprimierten weniger TRIM als naive, konventionelle T - Zellen (Abb. 9). Somit korrelierte die beobachtete IFN γ -Produktion der NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen negativ mit der TRIM Expression. Die Daten der intrazellu-

lären Färbung (Abb. 9) geben allerdings nur die Gesamtproteinmenge an TRIM innerhalb der Zelle wieder. Somit lassen sich keine Aussagen über die sicherlich bedeutsame subzelluläre Verteilung an TRIM treffen. Dies bedürfte immunhistologischer Analysen.

5.1.3. *In vivo* Verteilung des intravenös injizierten α -CD3 Antikörpers und die Rolle von Fc γ - Rezeptoren:

Trotz dieser Gemeinsamkeiten zwischen NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen blieb zunächst die Ursache des unterschiedlichen Ausmaßes der Aktivierung in den verschiedenen Organen unklar. Wie die Experimente mit einer intravenösen Injektion eines fluorochrom - markierten α -CD3 Antikörpers zeigten, ließen sich hierfür einerseits die Verteilung des Antikörpers *in vivo* (s. 4.1.1.2) und andererseits die Häufigkeit und die Verteilung von Fc γ - Rezeptoren (s. 4.3.1.) als Erklärung heranziehen.

So reichten bereits 2,5 μ g des injizierten fluorochromierten α -CD3 Antikörpers aus, praktische alle TCR α ⁺ Zellen im peripheren Blut und in der Leber homogen und deutlich anzufärben (s. Abb. 6). In der Milz zeigte sich hingegen eine bimodale Verteilung auf den TCR α ⁺ Zellen (Abb. 6B und F), mit ca. 40% der TCR α ⁺ Zellen, die mit dem Antikörper markiert waren (Abb. 6B). Eine zehnfach größere Antikörpermenge veränderte dieses Bild nicht (Leber, peripheres Blut, Lymphknoten, Thymus) oder nur geringfügig (Milz) (s. Abb. 6). In Lymphknoten bzw. Thymus lies sich nur eine sehr geringe bzw. keine Färbung nachweisen (Abb. 6C und D). Das Grad des unterschiedlichen Ausmaßes mit dem der α -CD3 Antikörper die verschiedenen Organe erreichte, lässt sich vermutlich zum größten Teil mit der jeweiligen Organstruktur und dem Grad des direkten Kontaktes mit dem Blut erklären (Roitt et al. 1996, Goldsby et al. 2000, Abbas et al. 2000, Knolle et al. 2003).

Die angeführten Daten belegen eindeutig, dass der intravenös injizierte α -CD3 Antikörper (1 μ g) sowohl die Leber als auch, entgegen früheren Veröffentlichungen (Eberl et al. 1998), die Milz erreicht und innerhalb von einer Stunde sowohl NKT-, als auch Effektor-/Gedächtnis- T - Zellen aktivieren kann (s.o. und 4.1.1.).

Die Literatur legte nahe, dass diese Aktivierung *in vivo* durch die Quervernetzung des divalenten α -CD3 durch Fc γ - Rezeptoren erfolgte (Ceuppens et al. 1985, Ellenhorn et al. 1988, Hirsch et al. 1990, 1991, Blazar et al. 1991). Im Einklang mit einer solchen angenommenen Bindung des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers an Fc γ - Rezeptoren, lies sich auch eine Färbung TCR/CD3 - negativer Zellen mit dem Antikörper beobachten (Abb. 16). Der Vergleich dieser Färbung nach Injektion von 2,5 μ g und 25 μ g des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers (Abb. 16) zeigte, dass sich praktisch nur auf den sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) eine Zunahme des prozentualen Anteils an markierten Zellen bei der höheren

Antikörperdosis beobachten lies (Abb. 16). Folglich scheint nicht allein die Verteilung des injizierten α -CD3 Antikörpers in der Milz für die geringere Markierung der Dendritischen Zellen und der Makrophagen verantwortlich zu sein, sondern offensichtlich auch die absolute Bindungskapazität der Zellen gegenüber dem Antikörper. Dies könnte zum Beispiel auf eine höhere Dichte an oder einer kürzeren Verweildauer der Oberflächenmoleküle der Fc - Rezeptoren auf den LSEC zurückzuführen sein. Hierfür spricht auch die stärkere Färbeintensität des fluorochromierten α -CD3 Antikörpers auf den LSEC als auf den Dendritischen Zellen oder Makrophagen (Abb. 16D-F).

Die Beteiligung der Fc α - Rezeptoren an der *in vivo* Stimulation der NKT- und T - Zellen konnte durch die Ko-Injektion des blockierenden α -Fc α RIII/RII (CD16/32) Antikörpers 2.4G2 gezeigt werden (Abb. 17). Die Blockade der Fc α RII und RIII bewirkte eine deutliche Verzögerung der Abnahme der TCR α Oberflächenexpression, sowie des Anstiegs der CD69 Expression nach α -CD3 Antikörpergabe (Abb. 17).

Der *in vivo* an LSEC und CD11b⁺ CD11c⁺ Milzellen gebundene α -CD3 Antikörper konnte nach der Zellaufreinigung NKT - Zellhybridome *in vitro* stimulieren (Abb. 18A). Dies belegte eindeutig, dass die Bindung des Antikörpers an FcR⁺ Zellen *in vivo* hinreichend für eine Kreuzvernetzung des TCR/CD3 - Komplexes und somit für eine Aktivierung von T - Zellen ist. Zur Bestätigung wurden die Experimente mit dem blockierenden α -CD16/32 Antikörper auch unter definierten *in vitro* Bedingungen durchgeführt. Innerhalb einer *in vitro* Ko-Kultur von sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) mit NKT - Zellhybridomen führte die Anwesenheit des α -CD16/32 Antikörpers zu einer Hemmung der α -CD3 induzierten IL-2 Produktion von 91-98% (Abb. 18B). Somit scheinen zumindest für die LSEC Fc α RII und III die einzigen beteiligten Fc - Rezeptoren zu sein.

Diese Ergebnisse zum hemmenden Effekt des α -CD16/32 Antikörpers bestätigen publizierte Daten sowohl für *in vitro* (Ellenhorn et al. 1990a, Alegre et al. 1995), als auch *in vivo* (Vossen et al. 1995) Experimente.

Die Experimente mit Fc - Rezeptor defizienten Tieren bestätigten die Rolle von Fc α RII und III in der *in vivo* Stimulation von NKT- und T - Zellen durch α -CD3 Antikörper (Abb. 19). Sowohl die Akkumulation der NKT- und T - Zellen in die Leber, als auch der Anstieg des relativen Anteils an IFN γ - produzierenden Zellen, fiel in den Fc α RII^{-/-} und Fc α RIII^{-/-} Mäusen nach der α -CD3 Antikörperinjektion deutlich geringer aus als in den Kontrollmäusen (Abb. 19). Darüber hinaus zeigte sich eine Beteiligung des Fc α RI an der *in vivo* Stimulation. Denn auch bei den FcR α - defizienten Tieren fielen die entsprechenden Veränderungen infolge der α -CD3 Antikörperinjektion geringer aus (Abb. 19A). Interessanterweise sprechen die Daten auch für organspezifische Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung der drei Fc - Rezeptoren. Denn in der Milz, im Gegensatz zur Leber, hatte die Abwesenheit des Fc α RII keinen erkennbaren Einfluss auf den Prozentsatz der IFN γ - produzierenden NKT- und T - Zellen (Abb.

19D und E). Für T - Zellen galt dies auch für die CD69 Expression. Dies könnte bedeuten, dass in der Milz eher die Fc - Rezeptoren FcRI und III für die beobachtete Stimulation verantwortlich waren.

5.1.4. Dynamik der NKT- und Effektor-/Gedächtnis- T - Zellverteilung infolge der α -CD3 β Antikörperinjektion:

Die intravenöse α -CD3 β Antikörpergabe stimulierte und aktivierte NKT- und T - Zellen (Abb. 4 und Abb. 5), infolge der *in vivo* Kreuzvernetzung des an die CD3 β Zellen gebundenen Antikörpers durch Fc - Rezeptoren (s. 4.3.1.). Diese Stimulation erfolgte wahrscheinlich nicht im peripheren Blut. Zum einen macht der Mangel an Fc - Rezeptoren auf den makrovaskulären Endothelzellen und die Scherkräfte infolge der hohen Fließgeschwindigkeiten im peripheren Blut eine Kreuzvernetzung unwahrscheinlich. Zum anderen zeigte sich auf den TCR β ⁺ Zellen im peripheren Blut praktisch keine verminderte Oberflächenexpression der TCR β Kette, die bereits eine erfolgte Stimulation angezeigt hätte.

Deshalb, und in Übereinstimmung mit der beschriebenen Organstruktur der Leber, mit ihrem hohen Blutdurchsatz, der großen Kontaktfläche des sinusoidalen Leberendothels (LSEC) mit dem Blut (Knolle et al. 2003) und der Effektivität der Fc - Rezeptor tragenden LSEC zur Kreuzvernetzung des TCR/CD3 - Komplexes *in vitro* und *ex vivo* (Abb. 18), wurde angenommen, dass die Kreuzvernetzung *in vivo* im Lebersinusoid durch die LSEC erfolgte.

Die Hypothese einer derartigen Wechselwirkung zwischen den NKT- und T - Zellen und den LSEC wird durch weitere Beobachtungen gestützt. So ist bekannt, dass infolge einer intravenösen α -CD3 β Antikörperinjektion sich die Avidität des Adhäsionsmoleküls LFA-1 (CD11a/CD18), als auch die Expressionsstärke von CD11b, ein Bestandteil des Adhäsionsmoleküls Mac-1 (CD11b/CD18), auf TCR β ⁺ Zellen erhöht (Dustin et al. 1989, Buysmann et al. 1996). Auf Seiten des Endothels wurde nach α -CD3 β Antikörperinjektion eine Zunahme des Adhäsionsmoleküls CD106 beschrieben (Bergese et al. 1994), die vermutlich zum Teil auf die Wirkung der von NKT - Zellen freigesetzten Zytokine TNF α und IL-4 zurückzuführen sein dürfte (Briscoe et al. 1992, Sanz et al. 1998).

Eine Folge der Interaktion zwischen den LSEC und den NKT- und T - Zellen nach α -CD3 β Antikörperinjektion war, dass die stimulierten Zellen aus dem peripheren Blut verschwanden, und sich in der Leber sammelten (Abb. 10 und Abb. 11). Erstens nahm die Gesamtzellzahl der aufgereinigten Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) um ca. 250% zu. Zweitens stieg ebenfalls der relative Anteil der NKT - Zellen in der Leber um 85,5% (Abb. 10B), und derjenige der T - Zellen um 163% (Abb. 10A). Drittens ging im peripheren Blut die entsprechende relative Zellzahl für NKT- bzw. T - Zellen um 92% bzw. 49,4% zurück (Abb. 10B bzw. 10A). Viertens fand sich im peripheren Blut keine Zunahme an stimulierten oder aktivierten NKT- bzw. T - Zellen (Abb. 11). Somit zeigte diese relative, als auch absolute Zunahme der NKT-

und T - Zellen in der Leber an, dass die NKT- und T - Zellen nach der Stimulation offensichtlich in der Leber verblieben.

Eine derartige verminderte Detektierbarkeit der TCR α ⁺ Zellen aus dem peripheren Blut wurde bereits beschrieben (Hirsch et al. 1988, Buysmann et al. 1996), wurde aber meist als Depletion der Zellen interpretiert (s. z.B. Cosimi 1987, Ellenhorn et al. 1990b, Mehal et al. 1999, 2001a, 2001b, Crispe et al. 2000, Park et al. 2002). Doch ist einerseits aufgrund der raschen Kinetik, innerhalb von drei Minuten (Buysmann et al. 1996), ein apoptotischer Prozess als Ursache unwahrscheinlich, und andererseits sprechen Daten für ein Wiedererscheinen der Mehrzahl der scheinbar depletierten T - Zellen ins periphere Blut (Hirsch et al. 1988, Chatenoud et al. 1982, s.a. Abb. 12). Dies sind aber unseres Wissens die ersten Daten, die diese, auf indirekte Schlüsse beruhende These, bestätigen, und die Akkumulation von NKT- und T - Zellen aus dem Blut in ein peripheres Organ zeigen.

Eine vergleichbare relative und absolute Akkumulation von stimulierten NKT- und T - Zellen aus dem peripheren Blut in die Leber wurde auch nach der *in vivo* Gabe von weiteren Immunstimulantien, wie z.B. α -GalCer oder des immunstimulatorischen Oligonukleotids 1668, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es erscheint nahe liegend in dieser Rekrutierung aktivierter NKT- und T - Zellen einen generellen Mechanismus des immunologischen Mikromilieus der Leber zu sehen. Dies könnte die Regulation der Frühphase von Immunreaktionen in der Leber ermöglichen (s.a. 5.3.).

Das bislang Ausgeführte verdeutlicht, dass die verminderte Detektierbarkeit der NKT - Zellen zunächst auf eine geringere Oberflächenexpression an TCR α und einer Akkumulation der Zellen in die Leber zurückzuführen ist. Erst zu späteren Zeitpunkten tritt eine reale Depletion der NKT - Zellen immer deutlicher zu Tage, weshalb sich 24 Stunden nach der α -CD3 α Antikörpergabe praktisch keine NKT - Zellen mehr in der Leber oder im peripheren Blut mehr nachweisen lassen (Eberl et al. 1998 und Abb. 12 1/1). Ursache hierfür ist vermutlich ein apoptotischer Zelltod der NKT - Zellen (Eberl et al. 1998).

Beschrieben wurde die Depletion von NKT - Zellen nach *in vivo* Aktivierung bislang für α -CD3 α Antikörper und IL-12 (Eberl et al. 1998), sowie für α -GalCer (Matsuda et al. 2000). Diese Agenzien wirken direkt stimulatorisch auf NKT - Zellen, induzieren Effektorfunktionen in weniger als einer Stunde und führen innerhalb weniger Stunden zur Depletion der NKT - Zellen (Eberl et al. 1998, Matsuda et al. 2000). Bei α -CD3 α Antikörpern und IL-12 ist die Repopulation am zweiten Tag nach der Injektion zu beobachten (Eberl et al. 1998). Für α -GalCer gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen, doch sprechen die meisten Daten für eine Repopulation der NKT - Zellen fünf bis sieben Tage nach der Injektion (Matsuda et al. 2000, Kakimi et al. 2000, Eberl et al. 2000, Hong et al. 2001). Möglicherweise beruhen die beschriebenen Unterschiede auf der Menge und der Route des applizierten α -GaCer.

5.1.5. Funktionelle Aspekte der α -CD3 Antikörperinjektion:

Die Immunaktivierung durch die einmalige intravenöse Gabe geringer Mengen (1-4 μ g/Tier) α -CD3 Antikörper führt zu einer verbesserten Immunabwehr gegenüber nahe liegenden Virusinfektionen (Kast et al. 1990) oder Tumorzellgaben (Ellenhorn et al. 1988, 1990a). Arbeiten von Eberl et al. (1998) lassen vermuten, dass die *in vivo* Aktivierung von NKT - Zellen den protektiven Effekt des α -CD3 Antikörpers vermittelt. Beide Beobachtungen wurden allerdings bislang nicht direkt miteinander verknüpft.

Arbeiten in diesem Labor gelegen ebenfalls, dass die α -CD3 Antikörpergabe auch antivirale Effekte in Hepatitis B Virus (HBV) transgenen Tieren zeitigt. Diese Mäuse besitzen ein Überlängenkonstrukt des humanen HBV, und produzieren konstitutiv Virus, das im Blut nachweisbar ist (Guidotti et al. 1995). In diesen Mäusen führt die intravenöse Injektion von 1 μ g α -CD3 Antikörper zu einer Reduktion von 82,8% (\pm 7,0%, n = 5) der Viruslast im peripheren Blut sechs Tage nach der Injektion (B. Schumak, unveröffentlichte Beobachtung). Dies wird vermutlich durch das Freisetzen von löslichen Mediatoren wie IFN γ oder TNF α vermittelt (Guidotti et al. 2001, 2002).

Für die immunaktivierenden Effekte bedarf es des Fc - Anteils des α -CD3 Antikörpers (Ellenhorn et al. 1988). Bei höheren Mengen an injiziertem Antikörper (> 20 μ g/Tier) überwiegt ein immunsuppressiver Effekt des α -CD3 Antikörpers, der ebenso durch F(ab') $_2$ - Fragmente erzielt werden kann (Hirsch et al. 1990, 1991, Blazar et al. 1991, Alegre et al. 1995) und somit unabhängig von Fc - Rezeptoren ist (Smith et al. 1997). Diese Immunsuppression konnte eingesetzt werden um die Abstoßung eines Allotransplantates zu verhindern (Hirsch et al. 1988, Blazar et al. 1991) oder die Entwicklung eines autoimmunvermittelten Diabetes in NOD Mäusen zu unterbinden (Chatenoud 1994, Chatenoud et al. 1997)

In der Humanmedizin wird diese Immunsuppression, durch wiederholte Injektion des α -CD3 Antikörpers OKT3, ebenfalls verwendet um Reaktionen gegenüber Allotransplantaten zu lindern (Ortho 1985). Hierbei treten, in der Regel nur bei der ersten Antikörperinjektion, eine Reihe von Nebenwirkungen auf, wie z.B. Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit, Durchfall etc. (Ortho 1985, Chatenoud et al. 1989). Diese Nebenwirkungen beruhen auf der Fc - Rezeptor - abhängigen aktivierenden Wirkung des Antikörpers (Chatenoud et al. 1993, Vossen et al. 1995, Smith et al. 1997), setzen nach ungefähr einer Stunde ein und verschwinden nach etwa einem Tag wieder von selbst (Ortho 1985, Chatenoud et al. 1989). Vergleichbare Reaktionen lassen sich in Mäusen nach der Injektion des α -CD3 Antikörpers beobachten (Ferran et al. 1990). Zurückzuführen sind diese Wirkung vermutlich auf das freigesetzte TNF α (Chatenoud et al. 1989, Alegre et al. 1990, Ferran et al. 1991), da blockierende Antikörper gegen TNF α die Nebenwirkungen fast gänzlich unterbinden können (Ferran et al. 1991, Charpentier et al. 1992, Chatenoud et al. 1993).

In den Experimenten dieser Arbeit im murinen System produzierten ausschließlich die NKT - Zellen nach einer solchen *in vivo* α -CD3 Antikörpergabe TNF (s. Tab. 3) und kommen somit als Verursacher der angeführten Nebenwirkungen in Frage. Diese Beobachtung wird unseres Wissens hier erstmals beschrieben. Es ist zu vermuten, dass die Nebenwirkungen nur deshalb bei der ersten Injektion auftraten, da die hohe α -CD3 Antikörpermenge zu einer anhaltenden Depletion der NKT - Zellen führt, und deshalb bei wiederholter Injektion eine erneute NKT - Zellstimulation ausbleibt.

Der Umstand, dass bei einer injizierten α -CD3 Antikörpermenge von über 20 μ g pro Tag bei Mäusen, es nur bei der ersten Injektion zu den beschriebenen Nebenwirkungen kam (z.B. Ferran et al. 1990, 1991), lässt vermuten, dass die repetitive α -CD3 Antikörperinjektion für eine anhaltende Depletion der NKT - Zellpopulation eingesetzt werden könnte.

Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass eine mehrmalige Gabe von 1 μ g/Tag des α -CD3 Antikörpers die Repopulation nicht wie erwartet verzögerte, sondern vielmehr beschleunigte (Tab. 4). So fanden sich im peripheren Blut und in der Leber nach einer zweimaligen Gabe von 1 μ g/Tag α -CD3 Antikörpern die NKT - Zellen in einem höheren Prozentsatz als nach einer einmaligen Gabe (Tab. 4 2/2 vs. 1/2). Die konventionellen (TCR α^+ NK1.1 $^-$) T - Zellen schienen hiervon unbeeinflusst (Tab. 4 2/2 vs. 1/2).

Wie die phänotypischen und funktionellen Analyse (Tab. 4 und Abb. 12) nahe legt, führt somit ein wiederholter NKT - Zellstimulus offensichtlich zu einer Verstärkung und Beschleunigung der NKT - Zellrepopulation. Bislang ging man davon aus, dass die Repopulation, unabhängig von dem Stimulus, immer gleich verläuft. Diese Daten lassen vermuten, dass die Proliferationsrate der NKT - Zellen im Rahmen einer immunologischen Belastungssituation erhöht werden kann, und somit deutlich dynamischer ist als bislang angenommen. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse zur Literatur (Ferran et al. 1990, 1991), lässt sich vermutlich durch die geringere α -CD3 Antikörpermenge (1 μ g vs. >20 μ g), die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, erklären. Eine vergleichbare Abhängigkeit der Dauer der NKT - Zelldepletion von der verabreichten Antikörpermenge wurde bereits für einen α -CD4 Antikörper beschrieben (Ikehara et al. 2000).

5.2. Tumor- und antigenspezifische Zytotoxizität von NKT - Zellen in T - Zellrezeptor transgenen Mäusen:

Die Beteiligung von NKT - Zellen in Immunreaktionen gegenüber Pathogenen, in der Tumorbewehr und in Autoimmunerkrankungen ist vielfach belegt (s. Einleitung). Ungeklärt blieb jedoch bislang die zugrundeliegende Antigenspezifität der NKT - Zellen. Zwar wurden bereits einige Antigene mit NKT - Zellen assoziiert, doch geschah dies einerseits aufgrund der CD1d Abhängigkeit des Antigens (Schofield et al. 1999, Apostolou et al. 1999, Miyamoto et al. 2001), oder infolge der Untersuchung von NKT - Zellhybridomen (z.B. Gumperz et al. 2000, Burdin et al. 1998), die keine physiologischen Untersuchungen erlauben. Einzig das an CD1d bindenden α -Galactosylceramid (α -GalCer) schien bislang einem NKT - Zellklon zugeordnet werden zu können.

α -GalCer aktiviert im Kontext von CD1d alle Zellen mit dem invarianten V α 14J α 281 T - Zellrezeptor (V α 14i T - Zellen) (s. Einleitung und Kronenberg et al. 2002). Jedoch zeigen Studien von Matsuda et al. (2001), dass die reagierenden V α 14i T - Zellen sehr heterogen sind, und die Zellzahl der NKT - Zellen mit identischem T - Zellrezeptor, derjenigen entspricht, die auch für naive, konventionelle T - Zellen ermittelt wurde. Somit scheint α -GalCer NKT - Zellen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Antigenspezifitäten zu aktivieren. Aufgrund dieser polyklonalen Aktivierung repräsentiert α -GalCer wahrscheinlich kein physiologisches Antigen. Dafür spricht auch die ungewöhnliche α -Struktur des α -GalCer, die in dieser Form bislang nicht in Vertebraten nachgewiesen werden konnte (Kronenberg et al. 2002).

Folglich ist die Antigenspezifität der V α 14i T - Zellen im Besonderen, und der NKT - Zellen im Allgemeinen nach wie vor ungeklärt und erschwert das Studium dieser Zellen. Um die Beteiligung von NKT - Zellen an antigenspezifischen Immunreaktionen zu erforschen, wurden im Rahmen dieser Arbeit NKT - Zellen von T - Zellrezeptor transgenen Tieren untersucht.

OT-I Mäuse sind transgen für einen V α 2V α 5 T - Zellrezeptor, der das SIINFEKL - Peptid, dem immundominanten Epitop des Hühnereiweißes Ovalbumin, im Kontext von H2-K^b erkennt. Etwa 28% der V α 5⁺ Zellen in der Leber tragen darüber hinaus den NK - Marker NK1.1 und zeigen somit einen NKT - Zellphänotyp (Abb. 13). Auch die Reaktivität dieser OT-I V α 5⁺ NK1.1⁺ - Zellen gegenüber injiziertem α -CD3 α Antikörpern ist vergleichbar mit derjenigen von NKT - Zellen in C57BL/6 oder (B6/D2)F₁ Mäusen (Abb. 14) und weist sie somit als funktionsfähige NKT - Zellpopulation aus.

Überraschenderweise waren jedoch praktisch alle (>90%) der OT-I NKT - Zellen positiv für den CD8 α und negativ für den CD8 β Marker (Abb. 13B), was die Expression eines CD8 $\alpha\alpha$ Homodimers nahe legt. In anderen Mausstämmen stellen die CD8⁺ NKT - Zellen, mit einem Anteil von 3-4% aller NKT - Zellen in der Leber, nur eine geringe Subpopulation der NKT - Zellen dar (Hammond et al. 1999, Eberl et al. 1999). Diese beschriebenen CD8⁺ NKT - Zellen

exprimieren den CD8 α , nicht aber den CD8 α Ko-Rezeptor und die Oberflächenexpression ist schwächer als auf konventionelle T - Zellen (Hammond et al. 1999). Hingegen wurde die Expression des T - Zellrezeptors auf den CD8⁺ NK1.1⁺ und den CD8⁺ NK1.1⁻ T - Zellen als identisch beschrieben (Legendre et al. 1999). Die hier beschriebene Phänotyp der OT-I NKT - Zellen (Abb. 13B) steht somit im Einklang mit der Literatur.

Bedeutsam ist, dass die in der Literatur beschriebenen CD8⁺ NKT - Zellen nicht den invarianten T - Zellrezeptor tragen (Ishihara et al. 1999, Emoto et al. 2000). Die erzwungene CD8 Expression in einem transgenen Modell führt sogar zu einer Elimination der V α 14i T - Zellen (Bendelac et al. 1994, Lantz et al. 1994), vermutlich aufgrund einer verstärkten negativen Selektion infolge einer höheren Affinität der transgenen NKT - Zellen (Jameson et al. 1994, Lantz et al. 1994).

Für die Annahme, dass die OT-I NKT - Zellen nicht den invarianten V α 14J α 281 T - Zellrezeptor tragen, spricht auch, dass sich keine direkten Effekte von intravenös appliziertem β -GalCer auf diese NKT - Zellen nachweisen ließen (Daten nicht gezeigt). Eine eindeutige Bestätigung bedürfte jedoch einer Analyse der mRNA mittels PCR oder der durchflusszytometrischen Färbung der Zellen mit β -GalCer/CD1d - Tetrameren, die nur an den V α 14i T - Zellrezeptor binden (Benlagha et al. 2000, Matsuda et al. 2000).

Überraschend war der hohe Anteil an V α 8⁺ T- und insbesondere NKT - Zellen in den V α 2V α 5 transgenen OT-I Mäusen (Abb. 13C). In der Regel exprimieren T - Zellen nur eine funktionsfähige α -Kette (Malissen 1992). Die Expression der zweiten α -Kette wird hierbei entweder auf DNA - Ebene (*'allelic exclusion'*) oder posttranskriptional gehemmt (*'phenotypic allelic exclusion'*) (Malissen 1992, von Boehmer 1995, Alam et al. 1995, 1998, Heath et al. 1995, Sant'Angelo et al. 2001). Dieser Ausschluss der zweiten α -Kette ist jedoch nicht vollständig und deshalb lässt sich auf ca. 1% der T - Zellen im peripheren Blut die Expression zweier V α -Ketten und somit zweier T - Zellrezeptoren nachweisen (Padovan et al. 1995, Davodeau et al. 1995). Der Anteil der T - Zellen, die eine zweite α -Kette exprimieren, nimmt bei Mäusen mit dem Alter zu und dieser Anstieg ist besonders in T - Zellrezeptor transgenen Mäusen prominent (Balomenos et al. 1995). Demzufolge tragen rund 29% der T - Zellen aus acht Monate alten transgenen Tieren eine zweite α -Kette (Balomenos et al. 1995, s.a. Munthe et al. 1996). Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen OT-I Mäuse waren i.d.R. 5-8 Monate alt und dürften somit ebenfalls einen höheren Anteil an doppelt T - Zellrezeptor positiven T - Zellen besitzen. Interessanterweise exprimierten 57% der von Balomenos et al. (1995) beschriebenen T - Zellen mit zwei α -Ketten im peripheren Blut der transgenen Tieren den Marker CD44, wie dies auch für den überwiegenden Teil der NKT - Zellen der Fall ist (Bendelac et al. 1997). Jedoch wurde von Balomenos et al. (1995) die Expression des NK1.1 Markers nicht untersucht.

So mag der hohe Prozentanteil der Expression einer zweiten membranständigen V α -Kette in den OT-I Mäusen eine Besonderheit des transgenen Systems im Allgemeinen und der CD44⁺ Zellen im Besonderen sein.

Um einen ersten Hinweis auf die Funktionalität der NKT - Zellen aus den V α 2V α 5 transgenen Tieren zu erhalten, wurde ihr Verhalten auf die intravenöse Gabe von 1 μ g α -CD3 α Antikörper untersucht. Ebenso wie der Phänotyp, so war auch die Reaktivität der V α 2V α 5⁺ NKT - Zellen gegenüber dem injizierten α -CD3 α Antikörper zu der in C57BL/6 oder (B6/D2)F₁ Tieren vergleichbar, wie die Analyse der Dynamik des TCR/CD3 - Komplexes, sowie der IFN γ - Expression anzeigt (Abb. 14). Daraus wurde geschlossen, dass die V α 5⁺ NK1.1⁺ Zellen der OT-I Maus, hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Reaktivität gegenüber α -CD3 α Antikörpern, den CD3⁺ NK1.1⁺ Zellen anderer Mausstämme entsprechen.

Die Kenntnis des spezifischen, aktivierenden Antigens, dem SIINFEKL - Peptid im Kontext des H2-K^b Moleküls, erlaubte es, ein neuartiges Modellsystem zum Studium der NKT - Zellfunktionen zu etablieren.

Leber assoziierte Lymphozyten (LAL) wurden aus OT-I Mäusen aufgereinigt und in T-, NKT- und B - zelldefiziente RAG2^{-/-} Mäuse transferiert (RAG/OTI), und anschließend intravenös mit der Tumorzelllinie RMA-OVA injiziert. RMA-OVA ist stabil mit dem Ovalbuminprotein transfiziert und präsentiert das SIINFEKL Peptid in H2-K^b auf ihrer Oberfläche (Limmer et al. 2000). Diese Tumorzelllinie, aber nicht die untransfizierte Mutterlinie RMA, werden durch OT-I LAL *in vivo* innerhalb von 13-15 Stunden zu 76,2% eliminiert (Abb. 15E). Für naive T - Zellen ist dieser Zeitraum zu kurz, um zytotoxische Aktivität zu entwickeln (z.B. Kedl et al. 1998, Bachmann et al. 1999, Zimmermann et al. 1999). Des Weiteren verringerte die Depletion von NK- und NKT - Zellen durch α -NK1.1 Antikörper (PK136) die Zytotoxizität um über 60% (Abb. 15F). Die verbliebene Zytotoxizität mag auf eine unvollständige Depletion zurückzuführen sein. Da es unwahrscheinlich ist, dass die NK - Zellen zwischen den RMA und RMA-OVA Zellen, die sich nur im SIINFEKL Peptid in H2-K^b auf der Oberfläche unterscheiden, differenzieren können, sprechen diese Daten dafür, dass die OT-I NKT - Zellen *in vivo* antigenspezifisch aktiviert wurden. Diese Antigenspezifität zusammen mit der NKT zellimmanenten schnellen Reaktivität resultierte in der beobachteten Zytotoxizität der NKT - Zellen gegenüber dem RMA-OVA Tumor (Abb. 15).

Dies ist unseres Wissens die erste Beschreibung, dass einerseits OT-I Mäuse über eine funktionsfähige, vermutlich nicht CD1d restringierte, NKT - Zellpopulation verfügen, und dass andererseits diesen NKT - Zellen eindeutig ein aktivierendes Antigen zugeordnet werden kann. Somit zeigt sich in der OT-I Maus paradigmatisch, wie NKT - Zellen die Antigenspezifität des adaptiven Immunsystems mit der schnellen Reaktivität der NK - Zellen des angeborenen Immunsystems in sich vereinigen und somit eine Brücke zwischen den beiden Armen des Immunsystems schlagen. Die hier vorgelegten Daten belegen, dass die OT-I Maus

das erste antigenspezifische Modellsystem zum Studium von NKT - Zellen darstellt und somit eine Alternative zum Superantigen α -GalCer liefert.

Interessanterweise wurden syngene Milzzellen, die exogen mit dem SIINFEKL Peptid beladen wurden, deutlich schwächer von den OT-I NKT - Zellen angegriffen. Gegenüber diesen exogen beladenen Milzzellen lag die spezifische Zytotoxizität nach 15 Stunden bei 21,9% und erreichte somit nur ca. 24% des Wertes gegenüber den RMA-OVA (76,2%, $p < 0,001$; Abb. 15E). Doch auch in diesem Fall reduzierte eine Depletion der NK- und NKT - Zellen durch α -NK1.1 Antikörper (PK136) die Zytotoxizität signifikant um ca. 28% (Abb. 15F). Offensichtlich ist die reine MHC I restringierte Antigenerkennung durch die NKT - Zellen nicht hinreichend um eine zytotoxische Aktivität zu induzieren.

Vermutlich treten zur Antigenerkennung noch weitere Regulationsmechanismen für die NKT - Zellzytotoxizität hinzu, die eine potentielle Autoreaktivität unterbinden. Hierfür kämen weitere NK - Rezeptoren, insbesondere der Ly49 - Rezeptorfamilie, in Frage, die auf die Aktivität der NK- und T - Zellen Einfluss nehmen können (Long 1999, Natarajan et al. 2002). Zum einen könnte ein Signal für einen stimulierenden Rezeptor auf den syngenen Milzzellen fehlen bzw. auf den RMA Klonen vorhanden sein. Zum anderen könnte ein inhibierendes Signal auf den Milzzellen stärker ausgeprägt sein, als auf den RMA Klonen (s. z.B. Bendelac et al. 1995, Ikarashi et al. 2001). Darüber hinaus könnten die NKT - Zellen über den zweiten T - Zellrezeptor, ein weiteres aktivierendes Signal seitens des RMA Tumors erhalten. Dies wäre insbesondere denkbar, wenn der zweite T - Zellrezeptor CD1d restringiert wäre.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in den V α 2V β 5 transgenen Mäusen eine antigenspezifische, NKT - zellvermittelte Tumorabwehr beobachten lässt. Während die Stimulation mittels injizierter α -CD3 β Antikörper (s. 5.1.) NKT - Zellen antigen-unspezifisch aktivierten, ist es mit dem hier verwendeten Modellsystem erstmals möglich, NKT - Zellen antigenspezifisch zu studieren.

5.3. Die Interaktion von LSEC und NKT - Zellen und deren Auswirkung auf die Immunreaktion von T - Zellen:

Die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) stellen die zahlenmäßig prominenteste antigenpräsentierende Zellpopulation der Leber dar (Knolle et al. 2003). Die NKT - Zellen auf der anderen Seite machen bis zu 50% der TCR/CD3 - Komplex positiven Zellen innerhalb der Leber aus (Bendelac et al. 1997). Während die LSEC bei den Experimenten mit α -CD3 Antikörpern lediglich als Plattform zur Quervernetzung und Aktivierung der NKT - Zellen *in vitro* und *in vivo* dienten, war nun die Frage, welche Auswirkungen eine spezifische Interaktion beider Zelltypen habe. Um die gewonnenen Daten allerdings vergleichbar mit dem Grossteil der Literatur zu halten, wurde in den folgenden Experimenten das NKT - Zell - Superantigen α -Galactosylceramid (α -GalCer) verwendet, welches CD1d abhängig NKT - Zellen mit dem invarianten V α 14J α 281 (V α 14i) T - Zellrezeptor aktivieren kann (Kronenberg et al. 2002).

Die zur Verfügung stehende NKT - Zellhybridomlinie DN3A4-1.2 verfügt ebenfalls über den V α 14i T - Zellrezeptor und der entsprechenden α -GalCer Reaktivität (Burdin et al. 1998, Brossay et al. 1998b).

Bislang gab es keine Veröffentlichungen, die auf Einzelzellebene die CD1d Expression auf den sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) zeigte. Somit wird hier der erste eindeutige Beleg vorgelegt, dass LSEC CD1d exprimieren (Abb. 20). Diese Expression wird vermutlich nicht reguliert, da eine Ko-Kultur mit Lymphozyten und die zusätzliche Anwesenheit stimulatorischer Substanzen keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von CD1d hatte (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 21. dargestellt, können sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) mit α -GalCer beladen werden, und CD1d abhängig die NKT - Zellhybridomlinie DN3A4-1.2 aktivieren (Abb. 21A). Des Weiteren lässt sich anhand der Daten vermuten, dass auch die LSEC einer Aufnahme des α -GalCer und einer endosomalen Verarbeitung für eine effektive Präsentation via CD1d bedürfen (Abb. 21B). Denn eine Präinkubation der LSEC mit α -GalCer für mindestens dreieinhalb Stunden war notwendig, um eine Aktivierung der DN3A4-1.2 zu induzieren (Abb. 21B). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Kawano et al. (1997), die zeigen konnten, dass die Reagenzien Chloroquin bzw. Concanamycin A, welche die Ansäuerung der bzw. den Transport zu den späten Endosomen unterbinden, eine Proliferation von NKT - Zellen verhindern. Es bedürfte allerdings entsprechender Experimente um diese Annahme zweifelsfrei zu testen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) funktionell aktives CD1d exprimieren und hierüber NKT - Zellen aktivieren können. Angesichts des engen räumlichen Kontaktes beider Zellpopulationen im Lebersinusoid (Knolle et al. 2003), erscheint eine entsprechende CD1d abhängige Präsentation *in situ* wahrscheinlich.

Um Aufschluss über die Effekte einer Interaktion zwischen sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und der NKT - Zellhybridomlinie DN3A4-1.2 oder Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) zu erhalten, wurde die Veränderung der Oberflächenexpression verschiedener immunologisch relevanter Marker auf beiden Interaktionspartnern *in vitro* verfolgt. Es zeigte sich, dass die Ko-Kultur von LSEC mit DN3A4-1.2 oder LAL zu einer wechselseitigen Regulation einiger der untersuchten Oberflächenmarker führte (Abb. 22 - 24). Eine veränderte Oberflächenexpression nach der Ko-Kultur fand sich seitens der LSEC für die beiden Zelladhäsionsmoleküle CD54 und CD106 (Abb. 22), sowie für die kostimulatorischen Moleküle CD40 und ICOS-Ligand (Abb. 23). Hinsichtlich der Expressionsstärke von CD1d, MHC I, MHC II, CD80 und CD86 auf den LSEC ergaben sich keine Veränderungen infolge der Ko-Kultur (Daten nicht gezeigt).

CD54 (ICAM-1) und CD106 (VCAM-1) sind Adhäsionsmoleküle, die wesentlich zur Bindung von Lymphozyten an die sinusoidalen Leberendothelzellen beitragen (Mehal et al. 1999, Lalor et al. 2002a, 2002b). Eine erhöhte Expression dieser Moleküle geht folglich mit einer vermehrten Adhäsion von Lymphozyten einher. Interaktionen zwischen LSEC und Lymphozyten dürften durch einen solchen proadhäsiven Phänotyp der LSEC wahrscheinlicher und intensiviert werden.

Auf der NKT - Zellen stieg durch die *in vitro* Ko-Kultur mit LSEC die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD154 an (Abb. 24). Für ICOS zeigte sich keine Veränderungen infolge der Ko-Kultur (Daten nicht gezeigt), doch belegte eine *ex vivo* Färbung der Leber assoziierten Lymphozyten (LAL), dass ca. 30% der NKT - Zellen, jedoch nur 0,7% der T - Zellen in der Leber, ICOS konstitutiv exprimierten (Abb. 25). ICOS⁺ T - Zellen sind laut Literatur überwiegend Gedächtnis- T - Zellen und regulatorische T - Zellen (Yoshinaga et al. 1999, Akbari et al. 2002, Löhning et al. 2003).

Da die Effekte mit NKT - Zellhybridomen und mit aufgereinigten Leber assoziierten Lymphozyten (LAL) vergleichbar ausfielen, ist zu schließen, dass die NKT - Zellen für diese Effekte verantwortlich sind. Dafür spricht auch die Ähnlichkeit der Effekte bei beiden Zelltypen nach Zugabe von α -GalCer, welches nur NKT - Zellen mit dem invarianten V α 14i T - Zellrezeptor aktiviert (Abb. 22 - 24). Bedeutsam ist hierbei, dass es bereits durch die Ko-Kultur von LSEC und NKT - Zellen, entweder als Hybridome oder innerhalb der aufgereinigten Leber assoziierten Lymphozyten (LAL), zu einer wechselseitigen Beeinflussung beider Zelltypen kommt. Diese Interaktion bedarf somit keiner exogenen Stimulatoren, wie es α -GalCer darstellt. Die Beteiligung eines endogenen CD1d Liganden ist hingegen möglich, da in der Literatur wiederholt auf eine „Autoreaktivität“ einiger NKT - Zellklone hingewiesen wurde (z.B. Kariv et al. 1994, Bendelac et al. 1997, Brossay et al. 1998b, Schofield et al. 1999, Gumperz et al. 2000, Molano et al. 2000, Kronenberg et al. 2002).

Aufgrund dieser Beobachtungen und der Prävalenz beider Zellpopulationen in der Leber, erscheint es nahe liegend, eine konstitutive, physiologische Interaktion von NKT - Zellen und LSEC *in situ* anzunehmen.

Die beiden Rezeptor/Liganden Paare CD40/CD154 und ICOS/ICOS-L wurden in der Literatur als wesentliche Kostimulatoren von T - Zellen beschrieben (z.B. Grewal et al. 1998, Diehl et al. 2000, Hurwitz et al. 2000, Watts et al. 1999, Greenwald et al. 2002, Liang et al. 2002). Die differentielle Beteiligung des CD40/CD154 Paares in der peripheren Toleranz war für diese Arbeit von besonderem Interesse. In der peripheren Toleranz gegenüber systemischen Antigenen im Allgemeinen ist das CD40/CD154 Paar offenbar nicht beteiligt. Hier stört ein agonistischer α -CD40 Antikörper die Toleranzinduktion und führt zu Immunität (Diehl et al. 2000). Im besonderen Fall der mukosa - assoziierten Toleranz, wie z.B. bei der oralen Toleranz, ist das CD40/CD154 Paar hingegen vonnöten und hier interferiert ein agonistischer α -CD40 Antikörper mit der Toleranzinduktion (Diehl et al. 1999, 2000, Sotomayor et al. 1999). Entsprechend lässt sich in CD40 defizienten Tieren keine orale Toleranz gegenüber dem Modellantigen Ovalbumin induzieren (Kweon et al. 1999, 2002, siehe jedoch auch Hänninen et al. 2002).

ICOS ist ein Homodimer (Collins et al. 2002) welches 24 Stunden nach einer Stimulation über den T - Zellrezeptor von T - Zellen exprimiert wird (McAdam et al. 2000, Coyle et al. 2000). Die Expression ist auf CD4⁺ Zellen stärker und hält, insbesondere auf Th2 Zellen, länger an, als auf CD8⁺ T - Zellen (McAdam et al. 2000). Die Prävalenz von ICOS auf T - Zellen eines Gedächtniszellphänotyps, legt eine besondere Bedeutung des ICOS/ICOS-L Paares für Gedächtniszellen nahe (Yoshinaga et al. 1999, Akbari et al. 2002). Ligation von ICOS stimuliert die Proliferation und die Differenzierung der CD4⁺ T - Zellen zu einem Th2 Phänotyp (McAdam et al. 2000) und ist deshalb bei humoralen Immunreaktionen beteiligt, wie z.B. dem Klassenwechsel von B - Zellen gegenüber T - Zell - abhängigen Antigenen (Coyle et al. 2000, Tafuri et al. 2001, McAdam et al. 2001). Interessanterweise kann eine ICOS Ligation auch eine CD154 Expression auf T - Zellen induzieren (Hutloff et al. 1999, McAdam et al. 2001). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung des ICOS/ICOS-L Paares in der peripheren Toleranzinduktion beschrieben: Bei der Toleranz gegenüber intranasal applizierten Antigenen sind ICOS-L⁺ Dendritische Zellen entscheidend für die Generierung von regulatorischen, IL-10 produzierenden T - Zellen (Akbari et al. 2002). Eine Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion verhinderte die Toleranzinduktion (Akbari et al. 2002).

Eine Beteiligung an der Toleranzinduktion von antigenspezifischen T-Zellen durch sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) wurde im Rahmen dieser Arbeit für das Rezeptor/Liganden Paar ICOS/ICOS-L getestet (Abb. 26). Auch hier verhinderte eine Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion mittels eines hemmenden ICOS-Fc Konstruktes die Toleranzinduktion *in vitro* weitgehend (Abb. 26). Dies weist auf eine entscheidende Rolle des ICOS/ICOS-L Paares an

der Toleranzinduktion von CD8⁺ T - Zellen durch sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) hin.

Der beobachtete Anstieg von ICOS-L und CD40 auf den LSEC und derjenige von CD154 auf den NKT - Zellen nach der gemeinsamen Ko-Kultur, sowie die konstitutive Expression von ICOS auf NKT - Zellen, legte die überraschende Annahme nahe, dass NKT - Zellen auch an der Toleranzinduktion in der Leber beteiligt sein könnten.

Dieser Schluss wird auch durch einige weitere Beobachtungen gestützt. So zeigte sich zum Beispiel, dass die Zugabe geringer Mengen der allgemein als proinflammatorisch eingestuften Zytokine IFN γ und TNF α die Toleranzinduktion durch LSEC *in vitro* verbesserte (Limmer et al. 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass die orale Toleranz in IFN γ bzw. CD40 defizienten Tieren gestört ist (Kweon et al. 1998, 1999). Insbesondere NKT - Zellen stellen eine wichtige Quelle für IFN γ *in vivo* in der Leber dar und sie exprimieren nach Stimulation unter anderem auch CD154 (Tomura et al. 1999, Kitamura et al. 1999, Nishimura et al. 2000, sowie Abb. 5 und 24). Auch die Beobachtung, dass die Depletion von NK1.1⁺ Zellen die Induktion oraler Toleranz vermindert spricht für eine Beteiligung von NKT - Zellen an der Toleranzinduktion in der Leber (Trop et al. 1999, Gotsman et al. 2000, Margenthaler et al. 2002). Entsprechende Daten wurden mit CD1d defizienten Tieren gewonnen (Margenthaler et al. 2002).

Jedoch ist anzunehmen, dass neben den beiden Rezeptor/Liganden Paaren CD40/CD154 und ICOS/ICOS-L noch weitere Moleküle an der Toleranzinduktion von T - Zellen durch LSEC beteiligt sind. Ein vielfältig reguliertes System würde es Pathogenen erheblich erschweren die entsprechenden Mechanismen für ihr Überleben zu missbrauchen. So ist bekannt, dass eine Ko-stimulation über CD28 für die Induktion peripherer Toleranz vonnöten ist (Samoilova et al. 1998, Diehl et al. 2000). Für CTLA-4 (CD152) (Samoilova et al. 1998), PD-1 (Dong et al. 1999, Freeman et al. 2000, Greenwald et al. 2002) und Galectin-1 (Perillo et al. 1995, 1998, Chung et al. 2000) wurde ebenfalls eine Beteiligung in der peripheren Toleranz beschrieben.

Zusammenfassend sprechen die vorgelegten Daten sowohl für eine Rolle der NKT - Zellen bei der Tumorabwehr in der Leber (5.2.), als auch für eine Beteiligung in der Tolerisierung CD8⁺ T - Zellen durch sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) (5.3.).

NKT - Zellen fungieren aufgrund ihrer schnellen Aktivierbarkeit zusammen mit NK - Zellen als erste Verteidigungslinie des Immunsystems (*'first line of defence'*). Entsprechend wurde die Bedeutung von NKT - Zellen in der normalen Tumorabwehr (*'tumour surveillance'*) bereits wiederholt beschrieben (Nakamura et al. 1997, Smyth et al. 2000b, 2001b). In der überwiegenden Zahl der Fälle dürften nur wenige entartete Zellen zur selben Zeit vorliegen. Werden diese entarteten Zellen von NKT- und NK - Zellen erkannt und vollständig beseitigt, so besteht keine Notwendigkeit einer Erkennung durch und einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Die durch OT-I NKT - Zellen getöteten, und vermutlich apoptotischen,

Tumorzellen (s. 4.2.2.) werden offensichtlich auch von den sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) aufgenommen, da sich 16 Stunden nach Injektion eindeutig eine CFSE Färbung der ME9F1⁺ Zellen *ex vivo* nachweisen lässt (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus können LSEC Zelltrümmer apoptotischer Zellen aus dem Blut aufnehmen, prozessieren und Antigene präsentieren (A. Limmer, unveröffentlichte Beobachtung). In allen bislang untersuchten Situationen führt eine Präsentation von Antigen ausschließlich durch LSEC zur Toleranzinduktion in naiven antigenspezifischen T - Zellen (z.B. Knolle et al. 1998, 1999, Limmer et al. 2000 und A. Limmer, persönliche Mitteilung). Unter physiologischen Bedingungen werden vornehmlich überalterte und überzählige Zellen apoptotisch, und diese Zellen akkumulieren in der Leber (*'graveyard hypothesis'*, Crispe et al. 2000, 2003, Mehal et al. 1999, 2001a, 2001b, Park et al. 2002). Die Präsentation von Peptiden aus diesen apoptotischen Zellen auf sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) trägt im Normalfall sicherlich zur Selbsttoleranz des Immunsystems bei, indem potentiell autoreaktive T - Zellen toleriert werden. Die entsprechende Behandlung einiger weniger entarteter Zellen stellt vermutlich kein Risiko für diese Selbsttoleranz dar.

Im pathophysiologischen Falle einer großen Tumorlast wäre derselbe Mechanismus jedoch problematisch. Unter der Annahme, dass auch Antigene der aufgenommenen Tumorzellen durch die LSEC präsentiert werden, sprechen diese Daten dafür, dass die Präsenz von Tumorzellen in der Leber zu einer LSEC vermittelten Toleranzinduktion in T - Zellen gegenüber diesem Tumor führen könnte. Dies wäre dann von Bedeutung, wenn die Tumorlast so groß würde, dass NK- und NKT - Zellen nicht mehr alle entarteten Zellen beseitigen könnten und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems vonnöten würde. Damit ließe sich zum Beispiel erklären, weshalb das Auftreten von Lebermetastasen mit einer schlechten Prognose einhergeht. In diesem Sinne können auch die Daten von Terabe et al. (2000) interpretiert werden, die zeigen, dass die Präsenz der NKT - Zellen eine vollständige Beseitigung eines Tumors durch zytotoxische CD8⁺ T - Zellen *in vivo* verhindert.

Die Beobachtung, dass NKT - Zellen sowohl bei der Tumorabwehr, als auch bei der Toleranzinduktion durch sinusoidale Endothelzellen beteiligt sind, kann deshalb durch einen gemeinsamen Mechanismus erklärt werden.

Die hier vorgelegten Daten sprechen somit dafür, dass NKT - Zellen in der Leber physiologisch die Toleranzinduktion durch sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) unterstützen.

Das Mikromilieu der Leber induziert unter physiologischen Bedingungen systemische Immuntoleranz in CD4⁺ und CD8⁺ T - Zellen. Hierfür sind die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) maßgeblich mitverantwortlich. Trotz dieser tolerogenen Funktion finden effektive Immunreaktionen gegenüber Pathogenen und Tumoren innerhalb der Leber statt, die sowohl über lösliche Mediatoren, als auch über zytotoxische T- und NK - Zellen vermittelt werden. Ungeklärt ist bislang, wie die Balance zwischen Toleranz und Immunität im lokalen Mikromilieu der Leber reguliert wird, und wie Immunreaktionen initiiert werden können. Wahrscheinlich sind Natürlichen Killer T- (NKT-) Zellen, die als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem fungieren, wesentlich an dieser Regulation beteiligt.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, zum Verständnis der Rolle beizutragen, die NKT - Zellen innerhalb des immunologischen Mikromilieus der Leber spielen.

Es zeigten sich hierbei klare Parallelen zwischen NKT - Zellen und Gedächtnis- T - Zellen. Einerseits war die Kinetik der Aktivierung *in vivo* durch den TCR/CD3 - Komplex, gemessen an der Expression von Aktivierungsmarkern und der Zytokinproduktion (IFN γ), bei beiden Zelltypen vergleichbar (4.1.1.1. - 4.1.1.4., 5.1.1. und 5.1.2.). Andererseits korrelierte diese Reaktivität negativ mit der Expressionsstärke des T - Zellrezeptor- Adaptorproteins TRIM, und lag sowohl bei NKT - Zellen, als auch bei Gedächtnis- T- Zellen niedriger als bei naiven T - Zellen (4.1.1.6. und 5.1.2.). Darüber hinaus ergab sich, dass stimulierte und aktivierte NKT- und T - Zellen in die Leber rekrutiert werden, und sich die Proliferation der NKT - Zellen dynamisch am Bedarf reguliert (4.1.2. und 5.1.4.).

Im Einklang mit der deutlichen und raschen Reaktivität der NKT - Zellen, konnte auch eine zytotoxische Aktivität der NKT - Zellen in der Leber nachgewiesen werden. Innerhalb der leberassoziierten Lymphozyten von V β 2V β 5 T - Zellrezeptor transgenen Mäusen waren die V β 5⁺ NK1.1⁺ CD8 α ⁺ Zellen für die Elimination von RMA-OVA Tumorzellen verantwortlich (4.2. und 5.2.). Diese Zytotoxizität war antigenspezifisch für den vom V β 2V β 5 T - Zellrezeptor erkannten H-2K^b/SIINFEKL - Komplex, und weitgehend spezifisch für die Tumorzellen, da antigenbeladene syngene Milzzellen deutlich schwächer eliminiert wurden. Dies stellt die erstmalige Beschreibung einer antigenspezifischen zytotoxischen Aktivität von NKT - Zellen gegenüber einem tumorassoziierten Modellantigen dar.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in der Leber NKT - Zellen mit sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) interagieren (4.3., 5.1.3. und 5.3.). LSEC exprimieren funktionell CD1d, und die Interaktion von NKT - Zellen und LSEC führt zu einer Hochregulation verschiedener Adhäsions- (CD54, CD106) und kostimulatorischer (CD40, CD154, ICOS-L) Moleküle auf beiden Zelltypen (4.3.2. und 5.3.).

Schließlich konnte belegt werden, dass das Rezeptor/Liganden - Paar ICOS/ICOS-L für die Toleranzinduktion von CD8⁺ T - Zellen durch sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC) notwendig ist (4.3.3. und 5.3.). Da ein Teil der NKT - Zellen *in vivo* konstitutiv ICOS exprimieren (4.3.3.), und deren Interaktion mit LSEC zu einer Hochregulation von ICOS-L auf den LSEC führt, legt dies einen Einfluss der NKT - Zellen auf die Toleranzinduktion durch LSEC nahe.

Folglich sprechen die vorgelegten Daten für eine Rolle der NKT - Zellen im immunologischen Mikromilieu der Leber sowohl in der Tumorabwehr, als auch für eine Beteiligung in der antigenspezifischen Toleranzinduktion durch sinusoidalen Leberendothelzellen.

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. (2000). Cellular and molecular immunology, 4th edition (Philadelphia, W.B. Saunders Company).
- Abo, T., Kawamura, T., and Watanabe, H. (2000). Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 174, 135-149.
- Adachi, Y., Koseki, H., Zijlstra, M., and Taniguchi, M. (1995). Positive selection of invariant V alpha 14+ T cells by non-major histocompatibility complex-encoded class I-like molecules expressed on bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1200-1204.
- Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Oehen, S., Odermatt, B., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H., and Pircher, H. (1997). Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity* 6, 519-529.
- Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8, 1024-1032.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* 2, 675-680.
- Alam, S. M., Crispe, I. N., and Gascoigne, N. R. (1995). Allelic exclusion of mouse T cell receptor alpha chains occurs at the time of thymocyte TCR up-regulation. *Immunity* 3, 449-458.
- Alam, S. M., and Gascoigne, N. R. (1998). Posttranslational regulation of TCR Valpha allelic exclusion during T cell differentiation. *J Immunol* 160, 3883-3890.
- Alegre, M., Vandenabeele, P., Flamand, V., Moser, M., Leo, O., Abramowicz, D., Urbain, J., Fiers, W., and Goldman, M. (1990). Hypothermia and hypoglycemia induced by anti-CD3 monoclonal antibody in mice: role of tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 20, 707-710.
- Alegre, M.-L., Tso, J. Y., Sattar, H. A., Smith, J., Desalle, F., Cole, M., and Bluestone, J. A. (1995). An anti-murine CD3 monoclonal antibody with a low affinity for Fcγ receptors suppresses transplantation responses while minimizing acute toxicity and immunogenicity. *J Immunol* 155, 1544-1555.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Anzai, R., Seki, S., Ogasawara, K., Hashimoto, W., Sugiura, K., Sato, M., Kumagai, K., and Takeda, K. (1996). Interleukin-12 induces cytotoxic NK1+ alpha beta T cells in the lungs of euthymic and athymic mice. *Immunology* 88, 82-89.
- Apostolou, I., Takahama, Y., Belmont, C., Kawano, T., Huerre, M., Marchal, G., Cui, J., Taniguchi, M., Nakauchi, H., Fournie, J. J., et al. (1999). Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5141-5146.
- Arase, H., Saito, T., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (2001). Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol* 167, 1141-1144.
- Arnold, B. (2002). Levels of peripheral T cell tolerance. *Transpl Immunol* 10, 109-114.
- Assarsson, E., Kambayashi, T., Sandberg, J. K., Hong, S., Taniguchi, M., Van Kaer, L., Ljunggren, H. G., and Chambers, B. J. (2000). CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. *J Immunol* 165, 3673-3679.
- Austyn, J. M., and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11, 805-815.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1999). Current protocols in molecular biology (New York, John Wiley & Sons).
- Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A., and Kopf, M. (1999). Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* 29, 291-299.
- Badovinac, V. P., Porter, B. B., and Harty, J. T. (2002). Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3, 619-626.
- Ballas, Z. K., and Rasmussen, W. (1990). NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J Immunol* 145, 1039-1045.
- Balomenos, D., Balderas, R. S., Mulvany, K. P., Kaye, J., Kono, D. H., and Theofilopoulos, A. N. (1995). Incomplete T cell receptor Vα allelic exclusion and dual V beta-expressing cells. *J Immunol* 155, 3308-3312.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Barker, C. F., and Corriere, J. N., Jr. (1967). Canine renal homotransplantation with venous drainage via the portal vein. *Ann Surg* 165, 279-282.
- Barnaba, V., Franco, A., Alberti, A., Benvenuto, R., and Balsano, F. (1990). Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I-restricted, exogenous antigen-specific T lymphocytes. *Nature* 345, 258-260.
- Baron, J. L., Gardiner, L., Nishimura, S., Shinkai, K., Locksley, R., and Ganem, D. (2002). Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 16, 583-594.

- Barry, M., and Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-409.
- Bashirova, A. A., Geijtenbeek, T. B., van Duijnhoven, G. C., van Vliet, S. J., Eilering, J. B., Martin, M. P., Wu, L., Martin, T. D., Viebig, N., Knolle, P. A., *et al.* (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193, 671-678.
- Baxter, A. G., Kinder, S. J., Hammond, K. J., Scollay, R., and Godfrey, D. I. (1997). Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46, 572-582.
- Baxter, A. G., and Hodgkin, P. D. (2002). Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol* 2, 439-446.
- Behar, S. M., Dascher, C. C., Grusby, M. J., Wang, C. R., and Brenner, M. B. (1999a). Susceptibility of mice deficient in CD1d or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189, 1973-1980.
- Behar, S. M., Podrebarac, T. A., Roy, C. J., Wang, C. R., and Brenner, M. B. (1999b). Diverse TCRs recognize murine CD1. *J Immunol* 162, 161-167.
- Behar, S. M., and Cardell, S. (2000). Diverse CD1d-restricted T cells: diverse phenotypes, and diverse functions. *Semin Immunol* 12, 551-560.
- Bendelac, A., Killeen, N., Littman, D. R., and Schwartz, R. H. (1994). A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263, 1774-1778.
- Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M. E., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., and Brutkiewicz, R. R. (1995). CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268, 863-865.
- Bendelac, A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 182, 2091-2096.
- Bendelac, A., Hunziker, R. D., and Lantz, O. (1996). Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J Exp Med* 184, 1285-1293.
- Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., and Roark, J. H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15, 535-562.
- Benlagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L., and Bendelac, A. (2000). In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med* 191, 1895-1903.
- Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296, 553-555.
- Bergese, S. D., Pelletier, R. P., Ohye, R., Vallera, D. A., and Orosz, C. G. (1994). Treatment of mice with anti-CD3 mAb induces endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Transplantation* 57, 711-717.
- Bertolino, P., Trescol-Biemont, M. C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 28, 221-236.
- Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143, 1283-1288.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 1513-1522.
- Biron, C. A., and Brossay, L. (2001). NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 13, 458-464.
- Bissell, D. M., Wang, S. S., Jarnagin, W. R., and Roll, F. J. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 96, 447-455.
- Bix, M., Liao, N. S., Zijlstra, M., Loring, J., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991). Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 349, 329-331.
- Blazar, B. R., Hirsch, R., Gress, R. E., Carroll, S. F., and Vallera, D. A. (1991). In vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibodies or immunotoxins in murine recipients of allogeneic T cell-depleted marrow for the promotion of engraftment. *J Immunol* 147, 1492-1503.
- Boeckx, W., Sobis, H., Lacquet, A., Gruwez, J., and Vandeputte, M. (1975). Prolongation of allogeneic heart graft survival in the rat after implantation on portal vein. *Transplantation* 19, 145-149.
- Bogers, W. M., Stad, R. K., Janssen, D. J., Prins, F. A., van Rooijen, N., van Es, L. A., and Daha, M. R. (1991). Kupffer cell depletion in vivo results in clearance of large-sized IgA aggregates in rats by liver endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 85, 128-136.
- Bonish, B., Jullien, D., Dutronc, Y., Huang, B. B., Modlin, R., Spada, F. M., Porcelli, S. A., and Nickoloff, B. J. (2000). Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol* 165, 4076-4085.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 248-254.
- Braet, F., and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 1, 1.
- Briscoe, D. M., Cotran, R. S., and Pober, J. S. (1992). Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration. *J Immunol* 149, 2954-2960.

- Brossay, L., Jullien, D., Cardell, S., Sydora, B. C., Burdin, N., Modlin, R. L., and Kronenberg, M. (1997). Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol* *159*, 1216-1224.
- Brossay, L., Chioda, M., Burdin, N., Koezuka, Y., Casorati, G., Dellabona, P., and Kronenberg, M. (1998a). CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* *188*, 1521-1528.
- Brossay, L., Tangri, S., Bix, M., Cardell, S., Locksley, R., and Kronenberg, M. (1998b). Mouse CD1-autoreactive T cells have diverse patterns of reactivity to CD1+ targets. *J Immunol* *160*, 3681-3688.
- Brown, D. R., Fowell, D. J., Corry, D. B., Wynn, T. A., Moskowitz, N. H., Cheever, A. W., Locksley, R. M., and Reiner, S. L. (1996). Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *J Exp Med* *184*, 1295-1304.
- Brunner, K. T., Maurel, J., Cerottini, J.-C., and Chapuis, B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drug. *Immunology*, 181-196.
- Bruyns, E., Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Sagolla, K., Shevchenko, A., Mann, M., Autschbach, F., Bensussan, A., Meur, S., and Schraven, B. (1998). T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med* *188*, 561-575.
- Budd, R. C., Miescher, G. C., Howe, R. C., Lees, R. K., Bron, C., and MacDonald, H. R. (1987). Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med* *166*, 577-582.
- Burdin, N., Brossay, L., Koezuka, Y., Smiley, S. T., Grusby, M. J., Gui, M., Taniguchi, M., Hayakawa, K., and Kronenberg, M. (1998). Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J Immunol* *161*, 3271-3281.
- Burdin, N., Brossay, L., and Kronenberg, M. (1999). Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol* *29*, 2014-2025.
- Buysmann, S., Bemelman, F. J., Schellekens, P. T. A., van Kooyk, Y., Figdor, C. G., and ten Berge, I. J. M. (1996). Activation and increased expression of adhesion molecules on peripheral blood lymphocytes is a mechanism for the immediate lymphocytopenia after administration of OKT3. *Blood* *87*, 404-411.
- Callery, M. P., Kamei, T., and Flye, M. W. (1989). Kupffer cell blockade inhibits induction of tolerance by the portal venous route. *Transplantation* *47*, 1092-1094.
- Calne, R. Y., Sells, R. A., Pena, J. R., Davis, D. R., Millard, P. R., Herbertson, B. M., Binns, R. M., and Davies, D. A. (1969). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* *223*, 472-476.
- Cantor, H. M., and Dumont, A. E. (1967). Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* *215*, 744-745.
- Carbone, F. R., Kurts, C., Bennett, S. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* *19*, 368-373.
- Cardell, S., Tangri, S., Chan, S., Kronenberg, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1995). CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* *182*, 993-1004.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., and Bendelac, A. (1999). Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* *163*, 4647-4650.
- Ceuppens, J. L., Bloemmen, F. J., and van Wauwe, J. P. (1985). T cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from deficiency of monocyte Fcγ receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the T3-Ti complex. *J Immunol* *135*, 3882-3886.
- Chargui, J., Hase, T., Wada, S., Naganuma, T., and Yoshimura, R. (2001). NKT cells as nonspecific immune-regulator inducing tolerance in mouse model transplantation. *Transplant Proc* *33*, 3833-3834.
- Charpentier, B., Hiesse, C., Lantz, O., Ferran, C., Stephens, S., O'Shaughnessy, D., Bodmer, M., Benoit, G., Bach, J.-F., and Chatenoud, L. (1992). Evidence that antihuman tumor necrosis factor monoclonal antibody prevents OKT3-induced acute syndrome. *Transplantation* *54*, 997-1002.
- Chatenoud, L., Baudrihay, M. F., Kreis, H., Goldstein, G., Schindler, J., and Bach, J. F. (1982). Human in vivo antigenic modulation induced by the anti-T cell OKT3 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* *12*, 979-982.
- Chatenoud, L., Ferran, C., Reuter, A., Legendre, C., Gevaert, Y., Kreis, H., Franchimont, P., and Bach, J. F. (1989). Systemic reaction to the anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 in relation to serum levels of tumor necrosis factor and interferon-gamma [corrected]. *N Engl J Med* *320*, 1420-1421.
- Chatenoud, L. (1993). OKT3-induced cytokine-release syndrome: preventive effect of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody. *Transplant Proc* *25*, 47-51.
- Chatenoud, L., and Bach, J. F. (1993). Therapeutic monoclonal antibodies in transplantation. *Transplant Proc* *25*, 473-474.
- Chatenoud, L. (1994). Use of CD3 antibodies in transplantation and autoimmune diseases. *Transplant Proc* *26*, 3191-3193.
- Chatenoud, L., Primo, J., and Bach, J.-F. (1997). CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* *158*, 2947-2954.

- Chen, Y. H., Chiu, N. M., Mandal, M., Wang, N., and Wang, C. R. (1997a). Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 6, 459-467.
- Chen, H., Huang, H., and Paul, W. E. (1997b). NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation. *J Immunol* 158, 5112-5119.
- Chen, Y. C., Ye, Y. L., and Chiang, B. L. (1997c). Establishment and characterization of cloned CD4- CD8- alphabeta-T cell receptor (TCR)-bearing autoreactive T cells from autoimmune NZB x NZW F1 mice. *Clin Exp Immunol* 108, 52-57.
- Chisari, F. V. (1997). Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 99, 1472-1477.
- Chiu, Y. H., Jayawardena, J., Weiss, A., Lee, D., Park, S. H., Dautry-Varsat, A., and Bendelac, A. (1999). Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med* 189, 103-110.
- Chiu, Y. H., Park, S. H., Benlagha, K., Forestier, C., Jayawardena-Wolf, J., Savage, P. B., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d. *Nat Immunol* 3, 55-60.
- Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N., and Chen, J. (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2976-2981.
- Chung, C. D., Patel, V. P., Moran, M., Lewis, L. A., and Miceli, M. C. (2000). Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol* 165, 3722-3729.
- Coles, M. C., and Raulet, D. H. (1994). Class I dependence of the development of CD4+ CD8- NK1.1+ thymocytes. *J Exp Med* 180, 395-399.
- Coles, R. M., Mueller, S. N., Heath, W. R., Carbone, F. R., and Brooks, A. G. (2002). Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 168, 834-838.
- Collins, A. V., Brodie, D. W., Gilbert, R. J. C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., van der Merwe, P. A., and Davis, S. J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201-210.
- Cosimi, A. B. (1987). Clinical development of orthoclone OKT3. *Transplantation Proceedings* 19, 7-16.
- Cosley, S. D., and Oishi, M. (1973). Genetic Transformation in *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 84-87.
- Couedel, C., Peyrat, M. A., Brossay, L., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Davodeau, F., and Bonneville, M. (1998). Diverse CD1d-restricted reactivity patterns of human T cells bearing "invariant" AV24BV11 TCR. *Eur J Immunol* 28, 4391-4397.
- Coyle, A. J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J. A., et al. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, 95-105.
- Crispe, I. N., Moore, M. W., Husmann, L. A., Smith, L., Bevan, M. J., and Shimonkevitz, R. P. (1987). Differentiation potential of subsets of CD4-8- thymocytes. *Nature* 329, 336-339.
- Crispe, I. N., and Mehal, W. Z. (1996). Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today* 17, 522-525.
- Crispe, I. N. (2000). Do natural T cells promote liver regeneration? *Hepatology* 31, 1022-1024.
- Crispe, I. N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 51-62.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626.
- Cui, J., Watanabe, N., Kawano, T., Yamashita, M., Kamata, T., Shimizu, C., Kimura, M., Shimizu, E., Koike, J., Koseki, H., et al. (1999). Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated Valpha14 natural killer T cells. *J Exp Med* 190, 783-792.
- Dao, T., Mehal, W. Z., and Crispe, I. N. (1998). IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J Immunol* 161, 2217-2222.
- Davidson, H. W., and Watts, C. (1989). Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes. *J Cell Biol* 109, 85-92.
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 404.
- Davis, M. M., and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402. Erratum: Davis, M. M., and Bjorkman, P. J. (1988). *Nature* 335, 744.
- Davodeau, F., Peyrat, M.-A., Romagne, F., Necker, A., Hallet, M.-M., Vie, H., and Bonneville, M. (1995). Dual T cell receptor b chain expression on human T lymphocytes. *J Exp Med* 181, 1391-1398.
- Davodeau, F., Peyrat, M. A., Necker, A., Dominici, R., Blanchard, F., Leget, C., Gaschet, J., Costa, P., Jacques, Y., Godard, A., et al. (1997). Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains. *J Immunol* 158, 5603-5611.
- Denkers, E. Y., Scharton-Kersten, T., Barbieri, S., Caspar, P., and Sher, A. (1996). A role for CD4+ NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp Med* 184, 131-139.

- Diehl, L., den Boer, A. T., Schoenberger, S. P., van der Voort, E. I. H., Schumacher, T. N. M., Melief, C. J. M., Offringa, R., and Toes, R. E. M. (1999). CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nature Medicine* 5, 774-779.
- Diehl, L., den Boer, A. T., van der Voort, E. I. H., Melief, C. J. M., Offringa, R., and Toes, R. E. M. (2000). The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. *J Mol Med* 78, 363-371.
- Doherty, P. C., and Allan, J. E. (1987). Anti-asialo GM1 eliminates both inflammatory process and cytotoxic T-cell function in the lymphocytic choriomeningitis adoptive transfer model. *Cell Immunol* 107, 1-7.
- Doherty, D. G., Norris, S., Madrigal-Estebas, L., McEntee, G., Traynor, O., Hegarty, J. E., and O'Farrelly, C. (1999). The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 163, 2314-2321.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5, 1365-1369.
- Dustin, M. L., and Springer, T. A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-624.
- Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16, 201-223.
- Eberl, G., and MacDonald, H. R. (1998). Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* 9, 345-353.
- Eberl, G., Lees, R., Smiley, S. T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., and MacDonald, H. R. (1999). Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* 162, 6410-6419.
- Eberl, G., and MacDonald, H. R. (2000). Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur J Immunol* 30, 985-992.
- Ellenhorn, J. D. I., Hirsch, R., Schreiber, H., and Bluestone, J. A. (1988). In vivo administration of anti-CD3 prevents malignant progressor tumor growth. *Science* 242, 569-571.
- Ellenhorn, J. D., Schreiber, H., and Bluestone, J. A. (1990a). Mechanism of tumor rejection in anti-CD3 monoclonal antibody-treated mice. *J Immunol* 144, 2840-2846.
- Ellenhorn, J. D., Woodle, E. S., Ghobreal, I., Thistlethwaite, J. R., and Bluestone, J. A. (1990b). Activation of human T cells in vivo following treatment of transplant recipients with OKT3. *Transplantation* 50, 608-612.
- Emoto, M., Emoto, Y., and Kaufmann, S. H. (1995). Interleukin-4-producing CD4+ NK1.1+ TCR alpha/beta intermediate liver lymphocytes are down-regulated by *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol* 25, 3321-3325.
- Emoto, M., Emoto, Y., and Kaufmann, S. H. (1997). Bacille Calmette Guerin and interleukin-12 down-modulate interleukin-4-producing CD4+ NK1+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 27, 183-188.
- Emoto, M., Emoto, Y., Buchwalow, I. B., and Kaufmann, S. H. (1999). Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. *Eur J Immunol* 29, 650-659.
- Emoto, M., Zerrahn, J., Miyamoto, M., Perarnau, B., and Kaufmann, S. H. (2000). Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells. *Eur J Immunol* 30, 2300-2311.
- Engvall, E., and Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Enomoto, A., Nishimura, H., and Yoshikai, Y. (1997). Predominant appearance of NK1.1+ T cells producing IL-4 may be involved in the increased susceptibility of mice with the beige mutation during *Salmonella* infection. *J Immunol* 158, 2268-2277.
- Exley, M., Garcia, J., Balk, S. P., and Porcelli, S. (1997). Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 186, 109-120.
- Exley, M., Porcelli, S., Furman, M., Garcia, J., and Balk, S. (1998). CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V alpha 24 J alpha Q T cell receptor alpha chains. *J Exp Med* 188, 867-876.
- Exley, M. A., Tahir, S. M., Cheng, O., Shaulov, A., Joyce, R., Avigan, D., Sackstein, R., and Balk, S. P. (2001a). A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol* 167, 5531-5534.
- Exley, M. A., Bigley, N. J., Cheng, O., Tahir, S. M., Smiley, S. T., Carter, Q. L., Stills, H. F., Grusby, M. J., Koezuka, Y., Taniguchi, M., and Balk, S. P. (2001b). CD1d-reactive T-cell activation leads to amelioration of disease caused by diabetogenic encephalomyocarditis virus. *J Leukoc Biol* 69, 713-718.
- Falasca, L., Bergamini, A., Serafino, A., Balabaud, C., and Dini, L. (1996). Human Kupffer cell recognition and phagocytosis of apoptotic peripheral blood lymphocytes. *Exp Cell Res* 224, 152-162.
- Falcone, M., Yeung, B., Tucker, L., Rodriguez, E., and Sarvetnick, N. (1999). A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 190, 963-972.
- Faunce, D. E., Sonoda, K. H., and Stein-Streilein, J. (2001). MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J Immunol* 166, 313-321.
- Faunce, D. E., and Stein-Streilein, J. (2002). NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J Immunol* 169, 31-38.

- Ferran, C., Sheehan, K., Dy, M., Schreiber, R., Merite, S., Landais, P., Noel, L.-H., Grau, G., Bluestone, J. A., Bach, J.-F., and Chatenoud, L. (1990). Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient *in vivo* T cell activation. *Eur J Immunol* 20, 509-515.
- Ferran, C., Dy, M., Sheehan, K., Schreiber, R., Grau, G., Bluestone, J. A., Bach, J.-F., and Chatenoud, L. (1991). Cascade modulation by anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody of interferon-g, interleukin 3 and interleukin 6 release after triggering of the CD3/T cell receptor activation pathway. *Eur J Immunol* 21, 2349-2353.
- Ferreira, A., Schofield, L., Enea, V., Schellekens, H., van der Meide, P., Collins, W. E., Nussenzweig, R. S., and Nussenzweig, V. (1986). Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. *Science* 232, 881-884.
- Fleming, K. A. (1999). The anatomy of the normal liver and the hepatic lymphocytes. In: T lymphocytes in the liver: immunobiology, pathology, and host defense, I. N. Crispe, ed. (New York, Wiley - Liss), 1 - 13.
- Flesch, I. E., Wandersee, A., and Kaufmann, S. H. (1997). IL-4 secretion by CD4+ NK1+ T cells induces monocyte chemoattractant protein-1 in early listeriosis. *J Immunol* 159, 7-10.
- Fonteneau, J. F., Larsson, M., and Bhardwaj, N. (2002). Interactions between dead cells and dendritic cells in the induction of antiviral CTL responses. *Curr Opin Immunol* 14, 471-477.
- Fowlkes, B. J., Kruisbeek, A. M., Ton-That, H., Weston, M. A., Coligan, J. E., Schwartz, R. H., and Pardoll, D. M. (1987). A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329, 251-254.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., *et al.* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034.
- Funahuchi, M., Yu, H., Sugiyama, M., Ikoma, S., Ohno, M., Kinoshita, K., Hamada, K., and Kanamaru, A. (1999). Increased interleukin-4 production by NK T cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 92, 197-202.
- Gapin, L., Matsuda, J. L., Surh, C. D., and Kronenberg, M. (2001). NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2, 971-978.
- Garboczi, D. N., Utz, U., Ghosh, P., Seth, A., Kim, J., VanTienhoven, E. A. E., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996). Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-ab with an antigenic tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J Immunol* 157, 5403-5410.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
- Gausling, R., Trollmo, C., and Hafler, D. A. (2001). Decreases in interleukin-4 secretion by invariant CD4(-)CD8(-)V alpha 24J alpha Q T cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Immunol* 98, 11-17.
- Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 287-299.
- Germain, R. N. (2001). The art of the probable: System control in the adaptive immune system. *Science* 293, 240-245.
- Gett, A. V., and Hodgkin, P. D. (1998). Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9488-9493.
- Gett, A. V., and Hodgkin, P. D. (2000). A cellular calculus for signal integration by T cells. *Nature Immunology* 1, 239-244.
- Godfrey, D. I., Hammond, K. J., Poulton, L. D., Smyth, M. J., and Baxter, A. G. (2000). NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21, 573-583.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., and Osborne, B. A. (2000). *Kuby Immunology*, 4th Edition edn (New York, W.H. Freeman and Company).
- Gombert, J. M., Herbelin, A., Tancrede-Bohin, E., Dy, M., Carnaud, C., and Bach, J. F. (1996a). Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26, 2989-2998.
- Gombert, J. M., Tancrede-Bohin, E., Hameg, A., Leite-de-Moraes, M. C., Vicari, A., Bach, J. F., and Herbelin, A. (1996b). IL-7 reverses NK1+ T cell-defective IL-4 production in the non-obese diabetic mouse. *Int Immunol* 8, 1751-1758.
- Gonzalez, A., Andre-Schmutz, I., Carnaud, C., Mathis, D., and Benoist, C. (2001). Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes. *Nat Immunol* 2, 1117-1125.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., de Oliveira, C., Tomaska, M., Hong, S., Bruna-Romero, O., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bendelac, A., Van Kaer, L., Koezuka, Y., and Tsuji, M. (2000). alpha-galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8461-8466.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Van Kaer, L., Bergmann, C. C., Wilson, J. M., Schmiege, J., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y., and Tsuji, M. (2002). Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med* 195, 617-624.
- Gorczynski, R. M. (1992). Immunosuppression induced by hepatic portal venous immunization spares reactivity in IL-4 producing T lymphocytes. *Immunol Lett* 33, 67-77.

- Gorczynski, R. M. (1994). Adoptive transfer of unresponsiveness to allogeneic skin grafts with hepatic gamma delta + T cells. *Immunology* 81, 27-35.
- Gorczynski, R. M. (1995). Regulation of IFN-gamma and IL-10 synthesis in vivo, as well as continuous antigen exposure, is associated with tolerance to murine skin allografts. *Cell Immunol* 160, 224-231.
- Gorczynski, R. M., Chan, Z., Chung, S., Cohen, Z., Levy, G., Sullivan, B., and Fu, X. M. (1994). Prolongation of rat small bowel or renal allograft survival by pretransplant transfusion and/or by varying the route of allograft venous drainage. *Transplantation* 58, 816-820.
- Gorczynski, R. M., Hozumi, N., Wolf, S., and Chen, Z. (1995). Interleukin 12 in combination with anti-interleukin 10 reverses graft prolongation after portal venous immunization. *Transplantation* 60, 1337-1341.
- Gorczynski, R. M., Chen, Z., Hoang, Y., and Rossi-Bergman, B. (1996). A subset of gamma delta T-cell receptor-positive cells produce T-helper type-2 cytokines and regulate mouse skin graft rejection following portal venous pretransplant preimmunization. *Immunology* 87, 381-389.
- Gorczynski, R. M., Chen, Z., Zeng, H., and Fu, X. M. (1998). A role for persisting antigen, antigen presentation, and ICAM-1 in increased renal graft survival after oral or portal vein donor-specific immunization. *Transplantation* 66, 339-349.
- Gotsman, I., Jurim, O., Trop, S., and Ilan, Y. (2000). Effect of peripheral immune tolerance on liver-associated lymphocytes expressing NK1.1. *Transplant Proc* 32, 749-750.
- Greenwald, R. J., Latchman, Y. E., and Sharpe, A. H. (2002). Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 14, 391-396.
- Gregory, S. H., Barczynski, L. K., and Wing, E. J. (1992). Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol* 51, 421-424.
- Grewal, I. S., and Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16, 111-135.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Grubor-Bauk, B., Simmons, A., Mayrhofer, G., and Speck, P. G. (2003). Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* 170, 1430-1434.
- Guermonez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.
- Guery, J. C., Galbiati, F., Smiroldo, S., and Adorini, L. (1996). Selective development of T helper (Th)2 cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and beta(2)-microglobulin-deficient BALB/c mice. *J Exp Med* 183, 485-497.
- Guidotti, L. G., Matzke, B., Schaller, H., and Chisari, F. V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 69, 6158-6169.
- Guidotti, L. G., Ishikawa, T., Hobbs, M. V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F. V. (1996a). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4, 25-36.
- Guidotti, L. G., and Chisari, F. V. (1996b). To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 8, 478-483.
- Guidotti, L. G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., and Chisari, F. V. (1999a). Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 284, 825-829.
- Guidotti, L. G., Borrow, P., Brown, A., McClary, H., Koch, R., and Chisari, F. V. (1999b). Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *J Exp Med* 189, 1555-1564.
- Guidotti, L. G., and Chisari, F. V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19, 65-91.
- Guidotti, L. G., Morris, A., Mendez, H., Koch, R., Silverman, R. H., Williams, B. R., and Chisari, F. V. (2002). Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 76, 2617-2621.
- Guimezanes, A., Barrett-Wilt, G. A., Gulden-Thompson, P., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., Schmitt-Verhulst, A. M., and Engelhardt, V. H. (2001). Identification of endogenous peptides recognized by in vivo or in vitro generated alloreactive cytotoxic T lymphocytes: distinct characteristics correlated with CD8 dependence. *Eur J Immunol* 31, 421-432.
- Gumperz, J. E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Cardell, S., Brenner, M. B., and Behar, S. M. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12, 211-221.
- Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T., and Brenner, M. B. (2002). Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195, 625-636.
- Hafner, M., Zawatzky, R., Hirtreiter, C., Buurman, W. A., Echtenacher, B., Hehlmann, T., and Mannel, D. N. (2001). Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN. *Cancer Res* 61, 5523-5528.
- Hameg, A., Apostolou, I., Leite-De-Moraes, M., Gombert, J. M., Garcia, C., Koezuka, Y., Bach, J. F., and Herbelin, A. (2000). A subset of NKT cells that lacks the NK1.1 marker, expresses CD1d molecules, and autopresents the alpha-galactosylceramide antigen. *J Immunol* 165, 4917-4926.

- Hammond, K. J., Poulton, L. D., Palmisano, L. J., Silveira, P. A., Godfrey, D. I., and Baxter, A. G. (1998). alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187, 1047-1056.
- Hammond, K. J., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., Randle-Barrett, E., Nakayama, T., Taniguchi, M., Smyth, M. J., van Driel, I. R., Scollay, R., Baxter, A. G., and Godfrey, D. I. (1999). NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol* 29, 3768-3781.
- Hammond, K. J., Pellicci, D. G., Poulton, L. D., Naidenko, O. V., Scalzo, A. A., Baxter, A. G., and Godfrey, D. I. (2001). CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol* 167, 1164-1173.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harder, R., Uhlig, H., Kashan, A., Schütt, B., Duijvestijn, A., Butcher, E. C., Thiele, H.-G., and Hamann, A. (1991). Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cells lines: Novel mechanisms mediating basal binding, and alpha-4-integrin-dependent cytokine-induced adhesion. *Experimental Cell Research* 197, 259-267.
- Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S., and Kumagai, K. (1995). Cytotoxic NK1.1 Ag+ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J Immunol* 154, 4333-4340.
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Van Kaer, L., Saiki, I., and Okumura, K. (2001a). Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol* 166, 6012-6018.
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Saiki, I., and Okumura, K. (2001b). Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 31, 1720-1727.
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Smyth, M. J., Van Kaer, L., Okumura, K., and Saiki, I. (2002). IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood* 100, 1728-1733.
- Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E., and Shires, J. (2001). Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2, 997-1003.
- Hänninen, A., Martinez, N. R., Davey, G. M., Heath, W. R., and Harrison, L. C. (2002). Transient blockade of CD40 ligand dissociates pathogenic from protective mucosal immunity. *J Clin Invest* 109, 261-267.
- Heath, W. R., Carbone, F. R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S., and Miller, J. F. (1995). Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells. *Eur J Immunol* 25, 1617-1623.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-134.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hernandez, J., Aung, S., Marquardt, K., and Sherman, L. A. (2002). Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens. *J Exp Med* 196, 323-333.
- Hirsch, R., Eckhaus, M., Auchincloss Jr., H., Sachs, D. H., and Bluestone, J. A. (1988). Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. *J Immunol* 140, 3766-3772.
- Hirsch, R., Bluestone, J. A., DeNenno, L., and Gress, R. E. (1990). Anti-CD3 F(ab')₂ fragments are immunosuppressive in vivo without evoking either the strong humoral response or morbidity associated with whole mAb. *Transplantation* 49, 1117-1123.
- Hirsch, R., Bluestone, J. A., Bare, C. V., and Gress, R. E. (1991). Advantages of F(ab')₂ fragments of anti-CD3 monoclonal antibody as compared to whole antibody as immunosuppressive agents in mice. *Transplant Proc* 23, 270-271.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. B. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Homann, D., Teyton, L., and Oldstone, M. B. A. (2001). Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nature Medicine* 7, 913-919.
- Hong, S., Wilson, M. T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O. V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D. C., Wei, J., et al. (2001). The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 7, 1052-1056.
- Hua, C., Boyer, C., Guimezanes, A., Albert, F., and Schmitt-Verhulst, A. M. (1986). Analysis of T cell activation requirements with the use of alloantigens or an anti-clonotypic monoclonal antibody. *J Immunol* 136, 1927-1936.
- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I. N. (1994a). The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1, 741-749.
- Huang, L., Sye, K., and Crispe, I. N. (1994b). Proliferation and apoptosis of B220+CD4-CD8-TCR alpha beta intermediate T cells in the liver of normal adult mice: implication for lpr pathogenesis. *Int Immunol* 6, 533-540.

- Hurwitz, A. A., Kwon, E. D., and van Elsas, A. (2000). Costimulatory wars: the tumor menace. *Curr Opin Immunol* 12, 589-596.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Iigo, Y., Suematsu, M., Higashida, T., Oheda, J., Matsumoto, K., Wakabayashi, Y., Ishimura, Y., Miyasaka, M., and Takashi, T. (1997). Constitutive expression of ICAM-1 in rat microvascular systems analyzed by laser confocal microscopy. *Am J Physiol* 273, H138-147.
- Ikarashi, Y., Mikami, R., Bendelac, A., Terme, M., Chaput, N., Terada, M., Tursz, T., Angevin, E., Lemonnier, F. A., Wakasugi, H., and Zitvogel, L. (2001). Dendritic cell maturation overrides H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon gamma production. *J Exp Med* 194, 1179-1186.
- Ikehara, Y., Yasunami, Y., Kodama, S., Maki, T., Nakano, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Ikeda, S. (2000). CD4(+) V α 14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J Clin Invest* 105, 1761-1767.
- Illes, Z., Kondo, T., Newcombe, J., Oka, N., Tabira, T., and Yamamura, T. (2000). Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 164, 4375-4381.
- Ishihara, S., Nieda, M., Kitayama, J., Osada, T., Yabe, T., Ishikawa, Y., Nagawa, H., Muto, T., and Juji, T. (1999). CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur J Immunol* 29, 2406-2413.
- Ishihara, S., Nieda, M., Kitayama, J., Osada, T., Yabe, T., Kikuchi, A., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Tadokoro, K., Nagawa, H., and Juji, T. (2000). Alpha-glycosylceramides enhance the antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes obtained from cancer patients by activating CD3-CD56+ NK cells in vitro. *J Immunol* 165, 1659-1664.
- Ishikawa, H., Hisaeda, H., Taniguchi, M., Nakayama, T., Sakai, T., Maekawa, Y., Nakano, Y., Zhang, M., Zhang, T., Nishitani, M., *et al.* (2000). CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int Immunol* 12, 1267-1274.
- Ishimitsu, R., Yajima, T., Nishimura, H., Kawauchi, H., and Yoshikai, Y. (2003). NKT cells are dispensable in the induction of oral tolerance but are indispensable in the abrogation of oral tolerance by prostaglandin E. *Eur J Immunol* 33, 183-193.
- Jahng, A. W., Maricic, I., Pedersen, B., Burdin, N., Naidenko, O., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Kumar, V. (2001). Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 194, 1789-1799.
- Jameson, S. C., Hogquist, K. A., and Bevan, M. J. (1994). Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 369, 750-752.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13, 11-16.
- Janeway, C. A., Jr. (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7461-7468.
- Jayawardena-Wolf, J., Benlagha, K., Chiu, Y. H., Mehr, R., and Bendelac, A. (2001). CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity* 15, 897-908.
- Kakimi, K., Guidotti, L. G., Koezuka, Y., and Chisari, F. V. (2000). Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 192, 921-930.
- Kamada, N., Davies, H. S., and Roser, B. (1981). Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* 292, 840-842.
- Kambayashi, T., Assarsson, E., Michaelsson, J., Berglund, P., Diehl, A. D., Chambers, B. J., and Ljunggren, H. G. (2000). Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice. *J Immunol* 165, 4964-4969.
- Kamei, T., Callery, M. P., and Flye, M. W. (1990). Kupffer cell blockade prevents induction of portal venous tolerance in rat cardiac allograft transplantation. *J Surg Res* 48, 393-396.
- Kariv, I., Hardy, R. R., and Hayakawa, K. (1994). Altered major histocompatibility complex restriction in the NK1.1+Ly-6Chi autoreactive CD4+ T cell subset from class II-deficient mice. *J Exp Med* 180, 2419-2424.
- Kast, M. W., Bluestone, J. A., Heemskerck, M. H. M., Spaargaren, J., Voordouw, A., Ellenhorn, J. D. I., and Melief, C. J. M. (1990). Treatment with monoclonal anti-CD3 antibody protects against lethal sendai virus infection by induction of natural killer cells. *J Immunol* 145, 2254-2259.
- Kawamura, T., Kawachi, Y., Moroda, T., Weerasinghe, A., Iiai, T., Seki, S., Tazawa, Y., Takada, G., and Abo, T. (1996). Cytotoxic activity against tumour cells mediated by intermediate TCR cells in the liver and spleen. *Immunology* 89, 68-75.
- Kawamura, T., Takeda, K., Mendiratta, S. K., Kawamura, H., Van Kaer, L., Yagita, H., Abo, T., and Okumura, K. (1998). Critical role of NK1+ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J Immunol* 160, 16-19.

- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., *et al.* (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., *et al.* (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5690-5693.
- Kawano, T., Nakayama, T., Kamada, N., Kaneko, Y., Harada, M., Ogura, N., Akutsu, Y., Motohashi, S., Iizasa, T., Endo, H., *et al.* (1999). Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res* 59, 5102-5105.
- Ke, Y., and Kapp, J. A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* 184, 1179-1184.
- Kedl, R. M., and Mescher, M. F. (1998). Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 161, 674-683.
- Kempka, G., and Kolb-Bachofen, V. (1988). Binding, uptake, and transcytosis of ligands for mannose-specific receptors in rat liver: an electron microscopic study. *Exp Cell Res* 176, 38-48.
- Kenai, H., Matsuzaki, G., Lin, T., Yoshida, H., and Nomoto, K. (1995). Precursor cells to CD3-intermediate (CD3int) liver mononuclear cells in the adult liver: further evidence for the extrathymic development of CD3int liver mononuclear cells. *Eur J Immunol* 25, 3365-3369.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 239-257.
- Kikly, K., and Dennert, G. (1992). Evidence for extrathymic development of TNK cells. NK1+ CD3+ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice. *J Immunol* 149, 403-412.
- Kimura, K., Kakimi, K., Wieland, S., Guidotti, L. G., and Chisari, F. V. (2002). Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 76, 10702-10707.
- Kirchgessner, H., Dietrich, J., Scherer, J., Isomäki, P., Korinek, V., Hilgert, I., Bruyns, E., Leo, A., Cope, A. P., and Schraven, B. (2001). The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR zeta-chain. *J Exp Med* 193, 1269-1283.
- Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Nishimura, S., Ohta, A., Ohmi, Y., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., *et al.* (1999). The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189, 1121-1128.
- Klein, L., and Kyewski, B. (2000). "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med* 78, 483-494.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Gerken, G. (1995a). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 22, 226-229.
- Knolle, P., Lohr, H., Treichel, U., Dienes, H. P., Lohse, A., Schlaack, J., and Gerken, G. (1995b). Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Z Gastroenterol* 33, 613-620.
- Knolle, P. A., Uhrig, A., Protzer, U., Trippler, M., Duchmann, R., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Gerken, G. (1998). Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* 27, 93-99.
- Knolle, P. A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A. W. (1999). Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116, 1428-1440.
- Knolle, P. A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174, 21-34.
- Knolle, P. A., and Limmer, A. (2003). Role and function of liver sinusoidal endothelial cells. In: *Liver Immunology*, M. E. Gershwin, J. M. Vierling, and M. P. Manns, eds. (Philadelphia, PA, Hanley & Belfus, Inc.), 59 - 72.
- Kojo, S., Adachi, Y., Keino, H., Taniguchi, M., and Sumida, T. (2001). Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 44, 1127-1138.
- Koo, G. C., Dumont, F. J., Tutt, M., Hackett, J., Jr., and Kumar, V. (1986). The NK-1.1(-) mouse: a model to study differentiation of murine NK cells. *J Immunol* 137, 3742-3747.
- Krammer, P. H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71, 163-210.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Kronenberg, M., and Gapin, L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2, 557-568.
- Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T., and Ogawa, M. (1997). A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 185, 777-784.
- Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., Ten, S., Sanz, M., Exley, M., Wilson, B., *et al.* (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109, 131-140.
- Kurlander, R. J., Ellison, D. M., and Hall, J. (1984). The blockade of Fc receptor-mediated clearance of immune complexes *in vivo* by a monoclonal antibody (2.4G2) directed against Fc receptors on murine leukocytes. *J Immunol* 133, 855-862.

- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997a). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* *186*, 239-245.
- Kurts, C., Carbone, F. R., Barnden, M., Blanas, E., Allison, J., Heath, W. R., and Miller, J. F. (1997b). CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* *186*, 2057-2062.
- Kweon, M. N., Fujihashi, K., VanCott, J. L., Higuchi, K., Yamamoto, M., McGhee, J. R., and Kiyono, H. (1998). Lack of orally induced systemic unresponsiveness in IFN-gamma knockout mice. *J Immunol* *160*, 1687-1693.
- Kweon, M. N., Fujihashi, K., Wakatsuki, Y., Koga, T., Yamamoto, M., McGhee, J. R., and Kiyono, H. (1999). Mucosally induced systemic T cell unresponsiveness to ovalbumin requires CD40 ligand-CD40 interactions. *J Immunol* *162*, 1904-1909.
- Kweon, M. N., and Kiyono, H. (2002). CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest* *109*, 171-173.
- Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., and Klein, L. (2002). Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol* *23*, 364-371.
- Lacour, M., Rudolph, U., Schlesier, M., and Peter, H. H. (1990). Type II collagen-specific human T cell lines established from healthy donors. *Eur J Immunol* *20*, 931-934; Corrigenda: Lacour, M., Rudolph, U., Schlesier, M., and Peter, H. H. (1991). *Eur J Immunol* *21*, 1092.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 680-685.
- Lalor, P. F., Shields, P., Grant, A., and Adams, D. H. (2002). Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* *80*, 52-64.
- Lalor, P. F., Edwards, S., McNab, G., Salmi, M., Jalkanen, S., and Adams, D. H. (2002). Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* *169*, 983-992.
- Lan, F., Zeng, D., Higuchi, M., Huie, P., Higgins, J. P., and Strober, S. (2001). Predominance of NK1.1+TCR alpha beta+ or DX5+TCR alpha beta+ T cells in mice conditioned with fractionated lymphoid irradiation protects against graft-versus-host disease: "natural suppressor" cells. *J Immunol* *167*, 2087-2096.
- Lantz, O., and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* *180*, 1097-1106.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* *290*, 92-97.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* *12*, 92-98.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001). The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* *13*, 291-298.
- Legendre, V., Boyer, C., Gunder, S., Arnold, B., Hammerling, G., and Schmitt-Verhulst, A. M. (1999). Selection of phenotypically distinct NK1.1+ T cells upon antigen expression in the thymus or in the liver. *Eur J Immunol* *29*, 2330-2343.
- Lehuen, A., Lantz, O., Beaudoin, L., Laloux, V., Carnaud, C., Bendelac, A., Bach, J. F., and Monteiro, R. C. (1998). Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* *188*, 1831-1839.
- Leite-De-Moraes, M. C., Hameg, A., Arnould, A., Machavoine, F., Koezuka, Y., Schneider, E., Herbelin, A., and Dy, M. (1999). A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol* *163*, 5871-5876.
- Leite-De-Moraes, M. C., Hameg, A., Pacilio, M., Koezuka, Y., Taniguchi, M., Van Kaer, L., Schneider, E., Dy, M., and Herbelin, A. (2001). IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol* *166*, 945-951.
- Leo, O., Foo, M., Sachs, D. H., Samelson, L. E., and Bluestone, J. A. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 1374-1378.
- Liang, L., and Sha, W. C. (2002). The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses. *Curr Opin Immunol* *14*, 384-390.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P. A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* *6*, 1348-1354.
- Lipscomb, M. F., and Masten, B. J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* *82*, 97-130.
- Lohse, A. W., Knolle, P. A., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G., and Meyer Zum Buschenfelde, K. H. (1996). Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* *110*, 1175-1181.
- Long, E. O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* *17*, 875-904.

- Löhning, M., Hutloff, A., Kallinich, T., Mages, H. W., Bonhagen, K., Radbruch, A., Hamelmann, E., and Kroczek, R. A. (2003). Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* *197*, 181-193.
- MacPhee, P. J., Schmidt, E. E., and Groom, A. C. (1992). Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* *263*, G17-23.
- MacPhee, P. J., Schmidt, E. E., and Groom, A. C. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* *269*, G692-698.
- Maeda, T., Keino, H., Asahara, H., Taniguchi, M., Nishioka, K., and Sumida, T. (1999). Decreased TCR AV24AJ18⁺ double-negative T cells in rheumatoid synovium. *Rheumatology (Oxford)* *38*, 186-188.
- Magnusson, S., and Berg, T. (1989). Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells. *Biochem J* *257*, 651-656.
- Maher, J. K., and Kronenberg, M. (1997). The role of CD1 molecules in immune responses to infection. *Curr Opin Immunol* *9*, 456-461.
- Makino, Y., Yamagata, N., Sasho, T., Adachi, Y., Kanno, R., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1993). Extrathymic development of V alpha 14-positive T cells. *J Exp Med* *177*, 1399-1408.
- Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., and Taniguchi, M. (1995). Predominant expression of invariant V alpha 14⁺ TCR alpha chain in NK1.1⁺ T cell populations. *Int Immunol* *7*, 1157-1161.
- Makino, Y., Kanno, R., Koseki, H., and Taniguchi, M. (1996). Development of Valpha4⁺ NK T cells in the early stages of embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6516-6520.
- Maldonado-Lopez, R., and Moser, M. (2001). Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* *13*, 275-282.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., and Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* *13*, 315-322.
- Mannoor, M. K., Weerasinghe, A., Halder, R. C., Reza, S., Morshed, M., Ariyasinghe, A., Watanabe, H., Sekikawa, H., and Abo, T. (2001). Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1(+) and NK1.1(-) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. *Cell Immunol* *211*, 96-104.
- Margenthaler, J. A., Landeros, K., Kataoka, M., and Flye, M. W. (2002). CD1-dependent natural killer (NK1.1(+)) T cells are required for oral and portal venous tolerance induction. *J Surg Res* *104*, 29-35.
- Mars, L. T., Laloux, V., Goude, K., Desbois, S., Saoudi, A., Van Kaer, L., Lassmann, H., Herbelin, A., Lehuen, A., and Liblau, R. S. (2002). Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* *168*, 6007-6011.
- Marshall, D. R., Turner, S. J., Belz, G. T., Wingo, S., Andreansky, S., Sangster, M. Y., Riberdy, J. M., Liu, T., Tan, M., and Doherty, P. C. (2001). Measuring the diaspora for virus-specific CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6313-6318.
- Masopust, D., Vezyz, V., Marzo, A. L., and Lefrancois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* *291*, 2413-2417.
- Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C. R., Koezuka, Y., and Kronenberg, M. (2000). Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* *192*, 741-754.
- Matsuda, J. L., Gapin, L., Fazilleau, N., Warren, K., Naidenko, O. V., and Kronenberg, M. (2001). Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12636-12641.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S., and Uehara, Y. (1996). A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* *183*, 1865-1878.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* *12*, 991-1045.
- May, A. G., Bauer, S., Leddy, J. P., Panner, B., Vaughan, J., and Russell, P. S. (1969). Survival of allografts after hepatic portal venous administration of specific transplantation antigen. *Ann Surg* *170*, 824-832.
- McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., *et al.* (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* *165*, 5035-5040.
- McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* *409*, 102-105.
- McCuskey, R. S., McCuskey, P. A., Urbaschek, R., and Urbaschek, B. (1987). Kupffer cell function in host defense. *Rev Infect Dis* *9 Suppl 5*, S616-619.
- McMahon, C. W., and Raulet, D. H. (2001). Expression and function of NK cell receptors in CD8⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* *13*, 465-470.
- McMahon, C. W., Zajac, A. J., Jamieson, A. M., Corral, L., Hammer, G. E., Ahmed, R., and Raulet, D. H. (2002). Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells. *J Immunol* *169*, 1444-1452.

- McNab, G., Reeves, J. L., Salmi, M., Hubscher, S., Jalkanen, S., and Adams, D. H. (1996). Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium. *Gastroenterology* *110*, 522-528.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* *8*, 452-456.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* *296*, 298-300.
- Mehal, W. Z., Juedes, A. E., and Crispe, I. N. (1999). Selective retention of activated CD8⁺ T cells by the normal liver. *J Immunol* *163*, 3202-3210.
- Mehal, W. Z., Azzaroli, F., and Crispe, I. N. (2001a). Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T cell apoptosis. *J Immunol* *167*, 667-673.
- Mehal, W. Z., Azzaroli, F., and Crispe, I. N. (2001b). Immunology of the healthy liver: old questions and new insights. *Gastroenterology* *120*, 250-260.
- Mellman, I., and Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* *106*, 255-258.
- Mendiratta, S. K., Martin, W. D., Hong, S., Boesteanu, A., Joyce, S., and Van Kaer, L. (1997). CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* *6*, 469-477.
- Metelitsa, L. S., Naidenko, O. V., Kant, A., Wu, H. W., Loza, M. J., Perussia, B., Kronenberg, M., and Seeger, R. C. (2001). Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol* *167*, 3114-3122.
- Meuer, S. C., Hodgson, J. C., Hussey, R. E., Protentis, J. P., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L. (1983). Antigen-like effects of monoclonal antibodies directed at receptors on human T cell clones. *J Exp Med* *158*, 988-993.
- Meuer, S. C., Hussey, R. E., Cantrell, D. A., Hodgson, J. C., Schlossman, S. F., Smith, K., and Reinherz, E. L. (1984). Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 1509-1513.
- Miyamoto, K., Miyake, S., and Yamamura, T. (2001). A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* *413*, 531-534.
- Molano, A., Park, S. H., Chiu, Y. H., Nosseir, S., Bendelac, A., and Tsuji, M. (2000). Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. *J Immunol* *164*, 5005-5009.
- Moodycliffe, A. M., Nghiem, D., Clydesdale, G., and Ullrich, S. E. (2000). Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nat Immunol* *1*, 521-525.
- Morita, M., Motoki, K., Akimoto, K., Natori, T., Sakai, T., Sawa, E., Yamaji, K., Koezuka, Y., Kobayashi, E., and Fukushima, H. (1995). Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem* *38*, 2176-2187.
- Mosmann, T. R., and Fong, T. A. T. (1989). Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods* *116*, 151-158.
- Moulder, J. W. (1985). Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* *49*, 298-337.
- Mueller, S. N., Jones, C. M., Smith, C. M., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2002). Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J Exp Med* *195*, 651-656.
- Munthe, L. A., Blichfeldt, E., Sollien, A., Dembic, Z., and Bogen, B. (1996). T cells with two Tcrbeta chains and reactivity to both MHC/idiotypic peptide and superantigen. *Cell Immunol* *170*, 283-290.
- Murphy, K. M., and Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* *2*, 933-944.
- Nagane, Y., Utsugisawa, K., Obara, D., and Tohgi, H. (2001). NKT-associated markers and perforin in hyperplastic thymuses from patients with Myasthenia gravis. *Muscle Nerve* *24*, 1359-1364.
- Naiki, Y., Nishimura, H., Kawano, T., Tanaka, Y., Itohara, S., Taniguchi, M., and Yoshikai, Y. (1999). Regulatory role of peritoneal NK1.1⁺ alpha beta T cells in IL-12 production during Salmonella infection. *J Immunol* *163*, 2057-2063.
- Nakagawa, R., Motoki, K., Ueno, H., Iijima, R., Nakamura, H., Kobayashi, E., Shimosaka, A., and Koezuka, Y. (1998a). Treatment of hepatic metastasis of the colon26 adenocarcinoma with an alpha-galactosylceramide, KRN7000. *Cancer Res* *58*, 1202-1207.
- Nakagawa, R., Motoki, K., Nakamura, H., Ueno, H., Iijima, R., Yamauchi, A., Tsuyuki, S., Inamoto, T., and Koezuka, Y. (1998b). Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with EL-4 hepatic metastasis and its cytokine production. *Oncol Res* *10*, 561-568.
- Nakagawa, R., Nagafune, I., Tazunoki, Y., Ehara, H., Tomura, H., Iijima, R., Motoki, K., Kamishohara, M., and Seki, S. (2001). Mechanisms of the antimetastatic effect in the liver and of the hepatocyte injury induced by alpha-galactosylceramide in mice. *J Immunol* *166*, 6578-6584.

- Nakamura, E., Kubota, H., Sato, M., Sugie, T., Yoshida, O., and Minato, N. (1997). Involvement of NK1+ CD4- CD8- alphabeta T cells and endogenous IL-4 in non-MHC-restricted rejection of embryonal carcinoma in genetically resistant mice. *J Immunol* *158*, 5338-5348.
- Nakano, Y., Monden, M., Valdivia, L. A., Gotoh, M., Tono, T., and Mori, T. (1992). Permanent acceptance of liver allografts by intraportal injection of donor spleen cells in rats. *Surgery* *111*, 668-676.
- Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R. A., and Margulies, D. H. (2002). Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* *20*, 853-885.
- Naumov, Y. N., Bahjat, K. S., Gausling, R., Abraham, R., Exley, M. A., Koezuka, Y., Balk, S. B., Strominger, J. L., Clare-Salzer, M., and Wilson, S. B. (2001). Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13838-13843.
- Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., *et al.* (2000). The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* *12*, 987-994.
- Norris, S., Collins, C., Doherty, D. G., Smith, F., McEntee, G., Traynor, O., Nolan, N., Hegarty, J., and O'Farrelly, C. (1998). Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* *28*, 84-90.
- Nossal, G. J. V. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*, 229-239.
- O'Farrelly, C., and Crispe, I. N. (1999). Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system. *Immunol Today* *20*, 394-398.
- Ogasawara, K., Takeda, K., Hashimoto, W., Satoh, M., Okuyama, R., Yanai, N., Obinata, M., Kumagai, K., Takada, H., Hiraide, H., and Seki, S. (1998). Involvement of NK1+ T cells and their IFN-gamma production in the generalized Shwartzman reaction. *J Immunol* *160*, 3522-3527.
- Ohteki, T., Okuyama, R., Seki, S., Abo, T., Sugiura, K., Kusumi, A., Ohmori, T., Watanabe, H., and Kumagai, K. (1992). Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J Immunol* *149*, 1562-1570.
- Ohteki, T., Wilson, A., Verbeek, S., MacDonald, H. R., and Clevers, H. (1996). Selectively impaired development of intestinal T cell receptor gamma delta+ cells and liver CD4+ NK1+ T cell receptor alpha beta+ cells in T cell factor-1-deficient mice. *Eur J Immunol* *26*, 351-355.
- Ohteki, T., Ho, S., Suzuki, H., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1997). Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* *159*, 5931-5935.
- Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis - I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 321.
- Ortho Multicenter Transplant Study Group (1985). A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N Engl J Med* *313*, 337-342.
- Ota, K., Matsui, M., Milford, E. L., Mackin, G. A., Weiner, H. L., and Hafler, D. A. (1990). T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* *346*, 183-187.
- Padovan, E., Giachino, C., Cella, M., Vallitutti, S., Acuto, O., and Lanzavecchia, A. (1995). Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor b chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J Exp Med* *181*, 1587-1591.
- Pal, E., Tabira, T., Kawano, T., Taniguchi, M., Miyake, S., and Yamamura, T. (2001). Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V alpha 14 NK T cells. *J Immunol* *166*, 662-668.
- Park, S. H., Weiss, A., Benlagha, K., Kyin, T., Teyton, L., and Bendelac, A. (2001). The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J Exp Med* *193*, 893-904.
- Park, S., Murray, D., John, B., and Crispe, I. N. (2002). Biology and significance of T-cell apoptosis in the liver. *Immunol Cell Biol* *80*, 74-83.
- Pellicci, D. G., Hammond, K. J., Uldrich, A. P., Baxter, A. G., Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2002). A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* *195*, 835-844.
- Perez, R. V., Swanson, C., Morgan, M., Erickson, K., Hubbard, N. E., and German, J. B. (1997). Portal venous transfusion up-regulates Kupffer cell cyclooxygenase activity: a mechanism of immunosuppression in organ transplantation. *Transplantation* *64*, 135-139.
- Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., and Baum, L. G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* *378*, 736-739.
- Perillo, N. L., Marcus, M. E., and Baum, L. G. (1998). Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* *76*, 402-412.
- Pied, S., Roland, J., Louise, A., Voegtle, D., Souldard, V., Mazier, D., and Cazenave, P. A. (2000). Liver CD4-CD8-NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. *J Immunol* *164*, 1463-1469.
- Porcelli, S. A., and Modlin, R. L. (1999). The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* *17*, 297-329.

- Prigozy, T. I., Naidenko, O., Qasba, P., Elewaut, D., Brossay, L., Khurana, A., Natori, T., Koezuka, Y., Kulkarni, A., and Kronenberg, M. (2001). Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science* 291, 664-667.
- Pruvot, F. R., Navarro, F., Janin, A., Labalette, M., Masy, E., Lecomte-Houcke, M., Gambiez, L., Copin, M. C., and Dessaint, J. P. (1995). Characterization, quantification, and localization of passenger T lymphocytes and NK cells in human liver before transplantation. *Transpl Int* 8, 273-279.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22, 41-47.
- Reis e Sousa, C., and Germain, R. N. (1995). Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 182, 841-851.
- Reiter, I., Krammer, B., and Schwamberger, G. (1999). Cutting Edge: Differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophages antitumor activities. *J Immunol* 163, 1730-1732.
- Renno, T., Hahne, M., Tschopp, J., and MacDonald, H. R. (1996). Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* 183, 431-437.
- Rieder, H., Ramadori, G., Allmann, K. H., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1990). Prostanoid release of cultured liver sinusoidal endothelial cells in response to endotoxin and tumor necrosis factor. Comparison with umbilical vein endothelial cells. *J Hepatol* 11, 359-366.
- Rieder, H., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Ramadori, G. (1992). Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. Filtration, endocytosis, synthetic capacities and intercellular communication. *J Hepatol* 15, 237-250.
- Robinson, D. S., and O'Garra, A. (2002). Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* 16, 755-758.
- Rock, K. L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-921.
- Rock, K. L. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17, 131-137.
- Roh, M. S., Wang, L., Oyedeji, C., LeRoux, M. E., Curley, S. A., Pollock, R. E., and Klostergaard, J. (1990). Human Kupffer cells are cytotoxic against human colon adenocarcinoma. *Surgery* 108, 400-404; discussion 404-405.
- Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1996). *Immunology*, Vol 4 (London, Mosby).
- Roland, C. R., Mangino, M. J., Duffy, B. F., and Flye, M. W. (1993). Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation* 55, 1151-1158.
- Romero, J. F., Eberl, G., MacDonald, H. R., and Corradin, G. (2001). CD1d-restricted NK T cells are dispensable for specific antibody responses and protective immunity against liver stage malaria infection in mice. *Parasite Immunol* 23, 267-269.
- Rosette, C., Werlen, G., Daniels, M. A., Holman, P. O., Alam, S. M., Travers, P. J., Gascoigne, N. R., Palmer, E., and Jameson, S. C. (2001). The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: a revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* 15, 59-70.
- Rubinstein, D., Roska, A. K., and Lipsky, P. E. (1987). Antigen presentation by liver sinusoidal lining cells after antigen exposure in vivo. *J Immunol* 138, 1377-1382.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Vol 2nd (New York).
- Samoilova, E. B., Horton, J. L., Zhang, H., Khoury, S. J., Weiner, H. L., and Chen, Y. (1998). CTLA-4 is required for the induction of high dose oral tolerance. *Int Immunol* 10, 491-498.
- Sant'Angelo, D. B., Cresswell, P., Janeway, C. A., Jr., and Denzin, L. K. (2001). Maintenance of TCR clonality in T cells expressing genes for two TCR heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6824-6829.
- Sanz, M.-J., Marinova-Mutafchieva, L., Green, P., Lobb, R. R., Feldman, M., and Nourshargh, S. (1998). IL-4-induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on endogenous TNF- α and α_4 integrin/VCAM-1 adhesion pathways. *J Immunol* 160, 5637-5645.
- Sato, K., Ohtsuka, K., Hasegawa, K., Yamagiwa, S., Watanabe, H., Asakura, H., and Abo, T. (1995). Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J Exp Med* 182, 759-767.
- Saubermann, L. J., Beck, P., De Jong, Y. P., Pitman, R. S., Ryan, M. S., Kim, H. S., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., Hagen, S. J., *et al.* (2000). Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 119, 119-128.
- Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Schellekens, H., Nussenzweig, R., and Nussenzweig, V. (1987). Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330, 664-666.
- Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., Campbell, A. S., Fraser-Reid, B., Grusby, M. J., and Tachado, S. D. (1999). CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* 283, 225-229.
- Schönrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A. M., Malissen, B., Hämmerling, G. J., and Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65, 293-304.

- Schraven, B., Marie-Cardine, A., Hubener, C., Bruyns, E., and Ding, I. (1999). Integration of receptor-mediated signals in T cells by transmembrane adaptor proteins. *Immunol Today* 20, 431-434.
- Schwartz, G. A., and Summers, A. (1980). Gangliosylceramide is a T cell differentiation antigen associated with natural cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 124, 1691-1694.
- Scoazec, J. Y., and Feldmann, G. (1991). In situ immunophenotyping study of endothelial cells of the human hepatic sinusoid: results and functional implications. *Hepatology* 14, 789-797.
- Scoazec, J. Y., and Feldmann, G. (1994). The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 20, 296-300.
- Seino, K. I., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., *et al.* (2001). Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2577-2581.
- Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., and Hiraide, H. (2000). The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 174, 35-46.
- Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q. S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T. L., Gombert, J. M., *et al.* (2001). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 7, 1057-1062.
- Shi, F. D., Flodstrom, M., Balasa, B., Kim, S. H., Van Gunst, K., Strominger, J. L., Wilson, S. B., and Sarvetnick, N. (2001). Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6777-6782.
- Shimamura, M., Ohteki, T., Launois, P., Garcia, A. M., and MacDonald, H. R. (1997). Thymus-independent generation of NK1+ T cells in vitro from fetal liver precursors. *J Immunol* 158, 3682-3689.
- Shimamura, M., Huang, Y. Y., Suda, Y., Kusumoto, S., Sato, K., Grusby, M. J., Sato, H., Nakayama, T., and Taniguchi, M. (1999). Positive selection of NKT cells by CD1(+), CD11c(+) non-lymphoid cells residing in the extrathymic organs. *Eur J Immunol* 29, 3962-3970.
- Shires, J., Theodoridis, E., and Hayday, A. C. (2001). Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity* 15, 419-434.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K. L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398, 77-80.
- Singh, N., Hong, S., Scherer, D. C., Serizawa, I., Burdin, N., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (1999). Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol* 163, 2373-2377.
- Singh, A. K., Wilson, M. T., Hong, S., Olivares-Villagomez, D., Du, C., Stanic, A. K., Joyce, S., Sriram, S., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 194, 1801-1811.
- Sköld, M., Faizunnessa, N. N., Wang, C. R., and Cardell, S. (2000). CD1d-specific NK1.1+ T cells with a transgenic variant TCR. *J Immunol* 165, 168-174.
- Slifka, M. K., Pagarigan, R. R., and Whitton, J. L. (2000). NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *J Immunol* 164, 2009-2015.
- Smedsrod, B., Pertoft, H., Gustafson, S., and Laurent, T. C. (1990). Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J* 266, 313-327.
- Smiley, S. T., Kaplan, M. H., and Grusby, M. J. (1997). Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 275, 977-979.
- Smith, J. A., Tso, J. Y., Clark, M. R., Cole, M. S., and Bluestone, J. A. (1997). Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J Exp Med* 185, 1413-1422.
- Smith, K. M., Eaton, A. D., Finlayson, L. M., and Garside, P. (2000). Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 162, S175-178.
- Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2000a). NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol* 1, 459-460.
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., MacGregor, D., Godfrey, D. I., and Trapani, J. A. (2000b). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192, 755-760.
- Smyth, M. J., Taniguchi, M., and Street, S. E. (2000c). The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* 165, 2665-2670.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrout, R. H., Sedger, L. M., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001a). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193, 661-670.
- Smyth, M. J., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2001b). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 13, 459-463.
- Smyth, M. J., Crowe, N. Y., Pellicci, D. G., Kyriassoudis, K., Kelly, J. M., Takeda, K., Yagita, H., and Godfrey, D. I. (2002a). Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 99, 1259-1266.

- Smyth, M. J., Crowe, N. Y., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., and Godfrey, D. I. (2002b). NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* *14*, 165-171.
- Soda, R., and Tavassoli, M. (1984). Liver endothelium and not hepatocytes or Kupffer cells have transferrin receptors. *Blood* *63*, 270-276.
- Sonoda, K. H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., and Stein-Streilein, J. (1999). CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* *190*, 1215-1226.
- Sonoda, K. H., Faunce, D. E., Taniguchi, M., Exley, M., Balk, S., and Stein-Streilein, J. (2001). NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* *166*, 42-50.
- Sonoda, K. H., Taniguchi, M., and Stein-Streilein, J. (2002a). Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *J Immunol* *168*, 2028-2034.
- Sonoda, K. H., and Stein-Streilein, J. (2002b). CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J Immunol* *32*, 848-857.
- Sotomayor, E. M., Borrello, I., Tubb, E., Rattis, F.-M., Bien, H., Lu, Z., Fein, S., Schoenberger, S., and Levitsky, H. I. (1999). Conversion of tumor-specific CD4⁺ T-cells tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. *Nature Medicine* *5*, 780-787.
- Spada, F. M., Koezuka, Y., and Porcelli, S. A. (1998). CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* *188*, 1529-1534.
- Sprent, J., and Tough, D. F. (2001a). T cell death and memory. *Science* *293*, 245-248.
- Sprent, J., and Surh, C. D. (2001b). Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* *13*, 248-254.
- Sprent, J., and Kishimoto, H. (2001c). The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *356*, 609-616.
- Sprent, J., and Surh, C. D. (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol* *20*, 551-579.
- Sriwatanawongsa, V., Davies, H. S., and Calne, R. Y. (1995). The essential roles of parenchymal tissues and passenger leukocytes in the tolerance induced by liver grafting in rats. *Nat Med* *1*, 428-432.
- Staerz, U. D., Karasuyama, H., and Garner, A. M. (1987). Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* *329*, 449-451.
- Stang, E., Kindberg, G. M., Berg, T., and Roos, N. (1990). Endocytosis mediated by the mannose receptor in liver endothelial cells. An immunocytochemical study. *Eur J Cell Biol* *52*, 67-76.
- Steffan, A. M., Gendrault, J. L., McCuskey, R. S., McCuskey, P. A., and Kirn, A. (1986). Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* *6*, 830-836.
- Stein, K. E., Schwarting, G. A., and Marcus, D. M. (1978). Glycolipid markers of murine lymphocyte subpopulations. *J Immunol* *120*, 676-679.
- Stein-Streilein, J., Sonoda, K. H., Faunce, D., and Zhang-Hoover, J. (2000). Regulation of adaptive immune responses by innate cells expressing NK markers and antigen-transporting macrophages. *J Leukoc Biol* *67*, 488-494.
- Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* *159*, 4772-4780.
- Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., and Mellman, I. (1999). Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* *60*, 562-567.
- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* *191*, 411-416.
- Streilein, J. W. (1993). Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol* *5*, 428-432.
- Strobel, S., and Mowat, A. M. (1998). Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* *19*, 173-181.
- Sumida, T., Sakamoto, A., Murata, H., Makino, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., Nishioka, K., Iwamoto, I., and Taniguchi, M. (1995). Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med* *182*, 1163-1168.
- Sumida, T., Maeda, T., Taniguchi, M., Nishioka, K., and Stohl, W. (1998). TCR AV24 gene expression in double negative T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* *7*, 565-568.
- Sykes, M. (1990). Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ and alpha beta TCR⁺NK1.1⁺ cells. *J Immunol* *145*, 3209-3215.
- Sykes, M., Hoyles, K. A., Romick, M. L., and Sachs, D. H. (1990). In vitro and in vivo analysis of bone marrow-derived CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, NK1.1⁺ cell lines. *Cell Immunol* *129*, 478-493.
- Tafuri, A., Shahinian, A., Bladt, F., Yoshinaga, S. K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L. M., Bouchard, D., Chan, V. S., Duncan, G., *et al.* (2001). ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* *409*, 105-109.

- Takahashi, M., Ogasawara, K., Takeda, K., Hashimoto, W., Sakihara, H., Kumagai, K., Anzai, R., Satoh, M., and Seki, S. (1996). LPS induces NK1.1+ alpha beta T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. *J Immunol* *156*, 2436-2442.
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., and Ravetch, J. V. (1994). FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* *76*, 519-529.
- Takeda, K., Seki, S., Ogasawara, K., Anzai, R., Hashimoto, W., Sugiura, K., Takahashi, M., Satoh, M., and Kumagai, K. (1996). Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J Immunol* *156*, 3366-3373.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Atsuta, M., Hong, S., Van Kaer, L., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *Int Immunol* *12*, 909-914.
- Tamada, K., Harada, M., Abe, K., Li, T., Tada, H., Onoe, Y., and Nomoto, K. (1997). Immunosuppressive activity of cloned natural killer (NK1.1+) T cells established from murine tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* *158*, 4846-4854.
- Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., and Wakao, H. (2003). The regulatory role of V{alpha}14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* *21*, 483-513.
- Tavassoli, M., Kishimoto, T., Soda, R., Kataoka, M., and Harjes, K. (1986). Liver endothelium mediates the uptake of iron-transferrin complex by hepatocytes. *Exp Cell Res* *165*, 369-379.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., and Berzofsky, J. A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* *1*, 515-520.
- Thomson, A. W., Drakes, M. L., Zahorchak, A. F., O'Connell, P. J., Steptoe, R. J., Qian, S., and Lu, L. (1999). Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* *66*, 322-330.
- Tilloy, F., Di Santo, J. P., Bendelac, A., and Lantz, O. (1999). Thymic dependence of invariant V alpha 14+ natural killer-T cell development. *Eur J Immunol* *29*, 3313-3318.
- Tomura, M., Yu, W. G., Ahn, H. J., Yamashita, M., Yang, Y. F., Ono, S., Hamaoka, T., Kawano, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y., and Fujiwara, H. (1999). A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol* *163*, 93-101.
- Toura, I., Kawano, T., Akutsu, Y., Nakayama, T., Ochiai, T., and Taniguchi, M. (1999). Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol* *163*, 2387-2391.
- Trop, S., Samsonov, D., Gotsman, I., Alper, R., Diment, J., and Ilan, Y. (1999). Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology* *29*, 746-755.
- Tsukahara, A., Seki, S., Iiai, T., Moroda, T., Watanabe, H., Suzuki, S., Tada, T., Hiraide, H., Hatakeyama, K., and Abo, T. (1997). Mouse liver T cells: their change with aging and in comparison with peripheral T cells. *Hepatology* *26*, 301-309.
- Uhrig, A. (1999) Regulation der Interaktion von sinusoidalen Endothelzellen der Leber mit Leukozyten - Bedeutung für die lokale Immunantwort in der Leber, Dsiseration, Johannes - Gutenberg Universität, Mainz.
- Ukkonen, P., Lewis, V., Marsh, M., Helenius, A., and Mellman, I. (1986). Transport of macrophage Fc receptors and Fc receptor-bound ligands to lysosomes. *J Exp Med* *163*, 952-971.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* *375*, 148-151.
- Valitutti, S., and Lanzavecchia, A. (1997). Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunology Today* *18*, 299-303.
- Van Bleek, G. M., and Nathenson, S. G. (1990). Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature* *348*, 213-216.
- van Dommelen, S. L., Tabarias, H. A., Smyth, M. J., and Degli-Esposti, M. A. (2003). Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J Virol* *77*, 1877-1884.
- van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off. *Science* *280*, 243-248.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. P. M. (1995). A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserin expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 39-51.
- Vicari, A. P., and Zlotnik, A. (1996). Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. *Immunol Today* *17*, 71-76.
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104-106.
- Voet, D., and Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*, Vol 2 (New York, John Wiley & Sons, Inc.).
- Von Boehmer, H. (1995). Control of T-cell development by the pre-T and alpha beta T-cell receptor. *Ann N Y Acad Sci* *766*, 52-61.

- von der Weid, T., Beebe, A. M., Roopenian, D. C., and Coffman, R. L. (1996). Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *J Immunol* *157*, 4421-4427.
- Vossen, A. C. T. M., Tibbe, G. J. M., Kroos, M. J., van de Winkel, J. G. J., Benner, R., and Savelkoul, H. F. J. (1995). Fc receptor binding of anti-CD3 monoclonal antibodies is not essential for immunosuppression, but triggers cytokine-related side effects. *Eur J Immunol* *25*, 1492-1496.
- Wang, B., Geng, Y. B., and Wang, C. R. (2001). CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* *194*, 313-320.
- Watanabe, H., Miyaji, C., Kawachi, Y., Iiai, T., Ohtsuka, K., Iwanaga, T., Takahashi-Iwanaga, H., and Abo, T. (1995). Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1+ T cells in various immune organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* *155*, 2972-2983.
- Watts, T. H., and DeBenedette, M. A. (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* *11*, 286-293.
- Weerasinghe, A., Sekikawa, H., Watanabe, H., Mannoor, K., Morshed, S. R., Halder, R. C., Kawamura, T., Kosaka, T., Miyaji, C., Kawamura, H., *et al.* (2001). Association of intermediate T cell receptor cells, mainly their NK1.1(-) subset, with protection from malaria. *Cell Immunol* *207*, 28-35.
- Wilson, S. B., Kent, S. C., Patton, K. T., Orban, T., Jackson, R. A., Exley, M., Porcelli, S., Schatz, D. A., Atkinson, M. A., Balk, S. P., *et al.* (1998). Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* *391*, 177-181.
- Winwood, P. J., and Arthur, M. J. (1993). Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis* *13*, 50-59.
- Wisse, E., De Zanger, R. B., Charels, K., Van Der Smissen, P., and McCuskey, R. S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* *5*, 683-692.
- Wong, J., Johnston, B., Lee, S. S., Bullard, D. C., Smith, C. W., Beaudet, A. L., and Kubes, P. (1997). A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* *99*, 2782-2790.
- Yang, R., Liu, Q., Grosfeld, J. L., and Pescovitz, M. D. (1994). Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg* *29*, 1145-1148.
- Yoshimoto, T., and Paul, W. E. (1994). CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* *179*, 1285-1295.
- Yoshimoto, T., Bendelac, A., Watson, C., Hu-Li, J., and Paul, W. E. (1995a). Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* *270*, 1845-1847.
- Yoshimoto, T., Bendelac, A., Hu-Li, J., and Paul, W. E. (1995b). Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11931-11934.
- Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., *et al.* (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* *402*, 827-832.
- Zeng, Z., Castano, A. R., Segelke, B. W., Stura, E. A., Peterson, P. A., and Wilson, I. A. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* *277*, 339-345.
- Zeng, D., Dick, M., Cheng, L., Amano, M., Dejbakhsh-Jones, S., Huie, P., Sibley, R., and Strober, S. (1998). Subsets of transgenic T cells that recognize CD1 induce or prevent murine lupus: role of cytokines. *J Exp Med* *187*, 525-536.
- Zeng, D., Lewis, D., Dejbakhsh-Jones, S., Lan, F., Garcia-Ojeda, M., Sibley, R., and Strober, S. (1999a). Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *J Exp Med* *189*, 1073-1081.
- Zeng, D., Gazit, G., Dejbakhsh-Jones, S., Balk, S. P., Snapper, S., Taniguchi, M., and Strober, S. (1999b). Heterogeneity of NK1.1+ T cells in the bone marrow: divergence from the thymus. *J Immunol* *163*, 5338-5345.
- Zeng, D., Lee, M. K., Tung, J., Brendolan, A., and Strober, S. (2000). Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *J Immunol* *164*, 5000-5004.
- Zhang, Y., Rogers, K. H., and Lewis, D. B. (1996). Beta 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses. *J Exp Med* *184*, 1507-1512.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* *8*, 591-599.
- Zimmermann, C., Prevost-Blondel, A., Blaser, C., and Pircher, H. (1999). Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur J Immunol* *29*, 284-290.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- G. Wingender, A. Limmer, J.E. Gessner, M. Kronenberg, P.A. Knolle: Cross-linking of α -CD3 β antibodies by Fc γ RII-receptors on liver endothelial cells leads to preferential NKT cell depletion in the liver, Posterpräsentation, Jahrestagung der „Deutsche Gesellschaft für Immunologie“ (Dgfi), 2000, Dresden.
- G. Wingender, A. Hutloff, R.A. Kroczeck, A. Limmer, P.A. Knolle: CD8⁺ T cell tolerance induced by liver endothelial cells involves ICOS/ICOS-L interaction and NKT cells, Posterpräsentation, Keystone Symposium „Dendritic Cells: Interfaces with Immunobiology and Medicine (J7)“, 03. - 08.3.2003-04-27, Keystone, Colorado, USA.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig verfasst habe. Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

(Gerhard Wingender)

Bonn, 27.4.2003

„Nach dem Spiel, ist vor dem Spiel.“
(Sepp Herberger)