

**Arbeitsgruppenleiterin**

PD Dr. med. Katja Klugewitz  
CC13  
Gastroenterologie/Infektiologie/Rheumatologie  
Charité Campus Benjamin Franklin  
Hindenburgdamm 30  
12203 Berlin  
Telefon: 030-8445-4026  
Telefax:030-8445-4017  
E-Mail: [katja.klugewitz@charite.de](mailto:katja.klugewitz@charite.de)

**Genutzte Räume**

Karl-Landsteiner-Haus, 3.OG  
Raum-Nr. 312, 316, 323

**Mitarbeiter/innen**

Dipl. Biochem. Katrin Neumann  
Dipl. Biol. Nils Kruse  
Dipl. Biol. Christine Rudolph  
Dipl. Biochem. Katherine Schultheis  
Stud. Med. Enver Tahir  
Stud. Med. Ruth Seikowski  
Stud. Bioinf. Katrin Hinz

**Forschungsfelder****1) Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Lebersinus-endothelzellen**

Lebersinusendothelzellen (LSEC) sind nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) der Leber, die konstitutiv MHC-II und kostimulatorische Moleküle exprimieren. In diesem Projekt konnten wir zeigen, dass die antigenabhängige Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Reaktivierung von Th1-Zellen durch LSEC die Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert, die daraufhin in das Darmgewebe und das darmassoziierte lymphatische Gewebe migrieren. Die Induktion des Darm-*Homing*phänotyps erfolgt in Abhängigkeit von Retinolsäure. LSEC exprimieren spezifische Enzyme, die Retinaldehydhydrogenasen, mit denen sie das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin A zu Retinolsäure metabolisieren und damit die Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren. LSEC-depletierte Leber-APC waren nicht in der Lage, einen Darm-*Homing*phänotyp bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren. Weiterführend wird untersucht, ob die Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch LSEC für die Induktion des Darm-*Homing*phänotyps notwendig ist, oder ob eine Aktivierung durch andere Leber-APC bei gleichzeitiger Bereitstellung von Retinolsäure durch LSEC ebenfalls zur Migration von in der Leber-aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Darm führt.

**2) Induktion CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> regulatorischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Lebersinus-endothelzellen**

In einem Modell der Knochenmarkstransplantation an der Maus konnten wir zeigen, dass LSEC in Abwesenheit professioneller APC in der Lage sind, naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen antigenabhängig zu *primen*. Dieses *priming* induziert jedoch keine Expression pro- oder anti-inflammatorischer Effektorzytokine durch LSEC-aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Stattdessen differenzieren die Zellen zu CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> regulatorischen T-Zellen (T<sub>LSEC</sub>). T<sub>LSEC</sub> supprimieren die Proliferation naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* und in einem Modell der T-Zell-vermittelten Autoimmunhepatitis den Verlauf der Pathogenese *in vivo*. In weiterführenden Versuchen wurde der Frage nachgegangen, über welche Mechanismen die Suppression der Autoimmunhepatitis durch T<sub>LSEC</sub> erfolgt. Die Induktion der Autoimmunhepatitis in

diesem Mausmodell wird durch CD8<sup>+</sup> T Zellen vermittelt. Dahingehend wurde gezeigt, dass T<sub>LSEC</sub> die Aktivierung, Proliferation und Expression von Effektormolekülen von CD8<sup>+</sup> T Zellen *in vitro* inhibieren. Da T<sub>LSEC</sub> darmspezifische *Homing*rezeptoren exprimieren und in das Darmgewebe und die mesenterialen Lymphknoten migrieren, wird aktuell am Mausmodell der Transfercolitis untersucht, ob T<sub>LSEC</sub> den Verlauf einer entzündlichen Darmerkrankung beeinflussen können.

Wir gehen zudem der Frage nach, wie die regulatorische Funktion der T<sub>LSEC</sub> vermittelt wird. Erste Ergebnisse legen nahe, dass der regulatorische Effekt Zell-Zellkontaktabhängig ist, aber weder IL-10 noch TGFβ involviert sind. Darüber hinaus klären wir, durch welche Mechanismen LSEC nicht-klassische regulatorische T-Zellen induzieren.

### Eigene Publikationen zum Thema

- 1) Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, Kühl, A., Loddenkemper, C., U., Zeitz, M., Hamann, A., **Klugewitz, K.** (2009) Priming of CD4<sup>+</sup> T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25<sup>low</sup> forkhead box protein3<sup>-</sup> regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. **Hepatology** 50:1904-1913.
- 2) **Klugewitz K.**, Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P.A., Hamann A. and Crispe I. N. (2002) Immunomodulatory effects of the liver: Deletion of activated CD4<sup>+</sup> effector cells and suppression of IFNγ-producing cells after intravenous protein immunization. **J Immunol** 169:2407-13.
- 3) Blumenthal-Barby, F., Eulenburg, K., Schrage, A., Zeitz, M., Hamann, A., **Klugewitz, K.** (2008) *In vivo* modulation of antigen-experienced cells in response to high-dose oral antigen: deletion but no evidence for alterations in the cytokine phenotype. **Int Immunol** 20(7):893-900.
- 4) Blumenthal-Barby, F., Schrage, A.; Eulenburg, K., Zeitz, M., Hamann, A., **Klugewitz, K.** (2008) Sustained delayed-type hypersensitivity reaction after *in vivo* priming but successful induction of unresponsiveness after adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> effector T cells. **Cell Immunol** 253(1-2):110-5.

### 3) *Cross-Talk* verschiedener hepatischer APC-Populationen

In einem ergänzenden Projekt etablieren wir Isolationsmethoden für verschiedene APC-Populationen der Leber, um letztlich die Bedeutung der einzelnen Subpopulationen für das *priming* und den Phänotyp von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen. Darüber hinaus wollen wir prüfen, ob verschiedene APC-Populationen miteinander oder sogar mit antigenerfahrenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Sinne eines *cross-talks* interagieren und welche funktionellen Konsequenzen dies hat.

### 4) Chemokinpräsentation durch Lebersinusendothelzellen: ein potentielles therapeutisches *Target* für hepatische Entzündungen?

In diesem Projekt konnten wir zeigen, dass LSEC basolateral homöostatische und inflammatorische Chemokine aufnehmen und diese apikal zur Verfügung stellen, was zu einer verstärkten chemokinabhängigen Transmigration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch das Lebersinusendothel *in vitro* führt. An der Internalisierung und Transzytose von Chemokinen durch LSEC sind Chemokinrezeptoren, wie der CXCR4, und Clathrin-*coated* Vesikel beteiligt. Die Glykosaminoglykane Heparan- und Chondroitinsulfat spielen bei der apikalen Immobilisierung der Chemokine durch LSEC eine Rolle. Darüber hinaus haben wir untersucht, welche Bedeutung die endotheliale Chemokinbereitstellung *in vivo* für den Verlauf einer hepatischen Entzündung hat und ob sich hieraus therapeutische Zielstrukturen ableiten lassen. Die Gabe eines Inhibitors der endothelialen Chemokinaufnahme und Transzytose *in vitro* suppressierte den Verlauf einer Concanavalin A-induzierten Autoimmunhepatitis und resultierte in einer verminderten chemokinabhängigen Rekrutierung aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen in das Lebergewebe.

### Eigene Publikationen zum Thema

- 1) Schrage, A., Loddenkemper, C., Erben, U., Lauer, U., Hausdorf, G., Jungblut, P.R., Johnson, J., Knolle, P.A., Zeitz, M., Hamann, A., **Klugewitz, K.** (2008) Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. **Histochem Cell Biol** 129(4):441-51.
- 2) Schrage, A., Wechsung, K., Neumann, K., Schumann, M., Schulzke, J.D., Engelhardt, B., Zeitz, M., Hamann, A., **Klugewitz, K.** (2008) Enhanced T cell transmigration across murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines. **Hepatology** 48(4):1262-72.

### 5) Antigenabhängige Adhäsion, Transmigration und Rekrutierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die Leber

Dieses Projekt befasst sich mit der antigenabhängigen Rekrutierung verschiedener CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen in die Leber. In diesem Zusammenhang wurde im *in-vitro*-Modell der Frage nachgegangen, ob T-Zellen antigenabhängig an Lebersinusendothelzellen adhäreren, welchen Einfluss das auf die Transmigration über das Endothel hat und inwieweit Transmigration sogar zur Modulation der T-Zellfunktion beiträgt. Dahingehend wurde gezeigt, dass die Antigenpräsentation durch zytokinaktivierte LSEC zu einer verstärkten Adhäsion und Transmigration von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch das Lebersinusendothel führt.

### Eigene Publikationen zum Thema

- 1) **Klugewitz, K.**, Topp, S.A., Dahmen, U., Kaiser, T., Sommer, S., Kury, E. and Hamann, A. (2002) Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into the murine liver. **Hepatology** 35:568-78.
- 2) **Klugewitz, K.**, Adams, D.H., Emoto, M., Eulenburg, K., Hamann, A. (2004) The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? **Trends Immunol** 25:590-94.
- 3) Bertolino, P., Schrage, A., Bowen, D.G., **Klugewitz, K.**, Ghani, S., Eulenburg, K., Holz, L., Hogg, N., McCaughan, G.W., Hamann, A. (2005) Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8<sup>+</sup> T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice. **Hepatology** 42(5):1063-71.

### Multi-User-Geräte und Techniken

- Durchflusszytometer FACSCanto II, Zellsortierungsgerät AutoMACS, Real-Time PCR System StepOnePlus™
- Herstellung knochenmarkstransplantierte Mäuse, Modell der Concanavalin A-induzierten Autoimmunhepatitis, Modell der Transfercolitis
- Transmigrationsassay, Adhäsionsassay, TaqMan<sup>®</sup>-*real-time*-PCR
- MACS-basierte *ex-vivo*-Isolation von Endothelzellen

### Drittmittelprojekte (im RCIS durchgeführt):

- SFB 633 „Induktion und Modulation T-Zell-vermittelter Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt“  
Teilprojekt A8 „Die Leber als Organ des mukosalen Immunsystems: Aktivierung und antigenabhängige Rekrutierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen bei oraler Antigenaufnahme“
- Integriertes Graduiertenkolleg SFB 633 IMMUCO
- DFG-Einzelbeihilfe „Chemokinvermittelte Transmigration durch das Sinusendothel der Leber: molekulare Mechanismen und therapeutische Zielstrukturen bei hepatischer Entzündung“