

Aufnahme und Prozessierung PMAOD-umhüllter Nanopartikel in Leber-sinusoidale Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Carlotta Sophie Corban
aus
Mannheim

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Jörg Heeren

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Christoph Schramm, Prof. Peter Bannas, Prof.
Maike Frye

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Christoph Schramm

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Peter Bannas

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Jörg Heeren

Datum der mündlichen Prüfung: 10.10.2025

A Inhaltsverzeichnis

A Inhaltsverzeichnis.....	I
B Abbildungsverzeichnis	IV
C Tabellenverzeichnis.....	VI
D Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Aufgaben, Versorgung und Zellmorphologie der Leber	1
1.1.1 Blutzufuhr und Aufgaben der Leber.....	1
1.1.2 Morphologie leberresidenter Zellen und deren histologische Anordnung	2
1.1.3 Immunologische Funktion der Leber	2
1.2 Leber-sinusoidale Endothelzellen	4
1.2.1 Morphologie und Zellaufbau	4
1.2.2 Rezeptorprofil	5
1.2.3 Immunologische Funktionen der LSECs	8
1.3 LSEC-vermittelte Induktion Antigen-spezifischer Immuntoleranz	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Auflistung der Chemikalien, Kits und Geräte	16
2.2 Haltung und Beschreibung der verwendeten Materialien	18
2.2.1 Zucht und Haltung der Tiere.....	18
2.2.2 Beschreibung der verwendeten Mauslinien.....	18
2.2.3 Nachweis der GFP-Färbung in NuTRAP-VECad-CreERT2 Mäusen	18
2.2.4 Nachweis der GFP-markierten Ribosomen der NuTRAP-VECad- CreERT2- Tiere	19
2.3 Beschreibung der verwendeten Nanopartikel	19
2.4 Fluoreszenz Messung in LSECs	21
2.4.1 Nanopartikelinjektion und Inkubation.....	21
2.4.2 Organentnahme.....	21

2.4.3	Zellseparation	21
2.4.4	Isolation CD146-positiver Zellen mittels MACS	22
2.4.5	Fluoreszenzmessung im TECAN-Fluoreszenzreader	23
2.4.6	DNA-Präparation	23
2.4.7	DNA-Konzentrationsmessung	23
2.4.8	Berechnung der Fluoreszenz	24
2.5	Durchflusszytometrie.....	25
2.5.1	Zellfärbung.....	25
2.5.2	<i>Gating</i> -Strategie	25
2.6	Molekularbiologische Analyse	26
2.6.1	RNA-Extraktion und Quantifizierung.....	26
2.6.2	Synthese von cDNA	27
2.6.3	Quantitative TaqMan [®] <i>RealTime</i> -PCR	27
2.7	RNA-Isolation nach dem NuTRAP-Verfahren	29
2.7.1	Isolation GFP-markierter Ribosomen	29
2.7.2	RNA-Extraktion.....	30
2.8	Statistik.....	31
2.8.1	Beschreibende Statistik	31
2.8.2	Inferenzstatistik.....	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Expressionsanalyse isolierter CD146-positiver Leberzellen	33
3.2	Analyse der Nanopartikelaufnahme in Rezeptor-Knockout Mausmodellen mittels Fluoreszenzmessung isolierter Leber Sinusoid Endothelzellen	35
3.2.1	Bedeutung des CD36-Oberflächenprotein für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln	35
3.2.2	Bedeutung des SR-B1 Rezeptors für die Aufnahme von PMAOD- umhüllten Nanopartikeln.....	36
3.2.3	Bedeutung der Stabilin-1/2 Rezeptoren für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln	37
3.3	Untersuchung der intrazellulären Prozessierung und transkriptionellen Veränderungen innerhalb der LSECs nach Aufnahme autoreaktiver Peptide mittels PMAOD-umhüllten Nanopartikeln.....	41
3.3.1	Nachweis der GFP- Färbung der NuTRAP-VECad-CreERT2- Tiere	41
3.3.2	Charakterisierung isolierter endothelialer mRNA	42
3.3.3	Analyse LSEC-spezifischer mRNA nach Gabe von Peptid- gekoppelten und ungekoppelten Nanopartikeln	43

3.3.4	RNA-Sequenzierung endothelialer mRNA	45
3.4	Untersuchung des zeitlichen Einflusses der Peptid-Injektion auf die LSEC-spezifische Immunreaktion	54
3.5	Analyse der LSEC spezifischen Reaktion auf die Nanopartikel-vermittelte Peptidaufnahme im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell.....	59
3.5.1	Expressionsanalyse der Immuntoleranz-Markergene	60
3.5.2	Expressionsanalyse der Leukozyten Diapedese-Markergene	61
4	Diskussion	63
4.1	Relevanz des Stabilin-2 Rezeptors für die Aufnahme PMAOD-umhüllter Nanopartikel	64
4.2	Relevanz des Stabilin-2 Rezeptors für Etablierung von Immuntoleranz	66
4.3	Limitationen der vorliegenden Arbeit im Kontext der Partikelauswahl ...	67
4.4	Analyse der Toleranzinduktion durch Bestimmung des Translatomes ..	69
4.5	Kontextbezogene Abwägung der Wahl des Injektionszeitpunkt und der Injektionsmenge	73
4.6	Ausblick.....	75
5	Zusammenfassung.....	76
6	Summary	78
7	Literaturverzeichnis	80
8	Danksagung	90
9	Erklärung des Eigenanteils	91
10	Eidesstattliche Versicherung	92

B Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** | Immunologische Funktionen residenter non-parenchymaler Leberzellen.
- Abbildung 2** | Aufnahme fluoreszierender, PMAOD-umhüllter Nanopartikel in LSECs.
- Abbildung 3** | Schematische Darstellung des Therapieansatzes mittels Nanopartikel-vermittelter Peptidgabe.
- Abbildung 4** | Schematische Darstellung des Versuchsaufbau der LSEC-Fluoreszenzmessung
- Abbildung 5** | Expressionsmuster relevanter Marker-Gene in CD146-pos. Fraktion und CD146-neg. Fraktion
- Abbildung 6** | Normalisierte QuantumDot- Fluoreszenz in CD146-pos. Fraktion von Wildtyp und CD36-Knockout Mäusen
- Abbildung 7** | Normalisierte QuantumDot- Fluoreszenz in CD146-pos. Fraktion von Kontroll-Mäusen (cre-) und EndoSR-B1 Knockout-Mäusen (cre+)
- Abbildung 8** | Normalisierte QuantumDot-Fluoreszenz in CD146-pos. Fraktion von Kontroll-Mäusen und Stabilin-1/ Stabilin-2 Knockout-Mäusen.
- Abbildung 9** | Prozentualer Anteil an QuantumDot-positiven Zellen in den Leberzellpopulationen
- Abbildung 10** | GFP-markierte Ribosomen in Endothelzellen von NuTRAP-VECad-CreERT2 Mäusen
- Abbildung 11** | Expressionsmuster relevanter Marker-Gene in *input* und anti-GFP *pulldown*
- Abbildung 12** | Schematische Darstellung des Versuchsaufbau und Injektionsschema zur Beurteilung der mRNA-Antwort nach Nanopartikel-Peptid Gabe.
- Abbildung 13** | Clusterdiagramm der exprimierten mRNA in Gruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x, OVA-PMAOD-NP 2x.
- Abbildung 14** | Vulkanplot der exprimierten mRNA im Vergleich Gruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x, OVA-PMAOD-NP 2x.
- Abbildung 15** | Normalisierter *foldchange* der Leukozyten-Diapedese und Immuntoleranz Markergene.

- Abbildung 16 |** Expressionsmuster der mittels RNA-Sequenzierung ausgewählten Markergene in den Versuchsgruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x, OVA-PMAOD-NP 2x.
- Abbildung 17 |** *GeneOntology Enrichment*-Analyse der exprimierten mRNA in Gruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x, OVA-PMAOD-NP 2x.
- Abbildung 18 |** Injektionsschema zur Beurteilung der Relevanz des zeitlichen Einflusses auf die intrazellulären Veränderungen in LSECs.
- Abbildung 19 |** Expressionsmuster der Markergene bei variierendem Injektionszeitpunkt der Nanopartikel, einmalige Injektion.
- Abbildung 20 |** Expressionsmuster der Zielgene bei variierendem Injektionszeitpunkt der Nanopartikel, zweizeitige Injektion.
- Abbildung 21 |** Versuchsaufbau zum Vergleich der intrazellulären LSEC-Antwort von wildtyp- und Stabilin-2 Knockout- Mäusen
- Abbildung 22 |** Expressionsmuster der Immuntoleranz-Markergene in Kontrollgruppe und Stabilin-2 Knockout-Gruppe.
- Abbildung 23 |** Expressionsmuster der Leukozyten-Diapedese-Markergene in Kontrollgruppe und Stabilin-2 Knockout-Gruppe.

C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 | Materialien- und Geräteliste

Tabelle 2 | Auflistung der verwendeten Nanopartikel

Tabelle 3 | Auflistung der FACS-Antikörper

Tabelle 4 | Syntheseprotokoll der cDNA im *Thermocycler*

Tabelle 5 | Auflistung der untersuchten Gene

Tabelle 6 | Zusammensetzung der TRAP-IP Pufferlösungen

D Abkürzungsverzeichnis

AGE *Advanced Glycation Endproduct*

ANOVA *Analysis of variance* (Varianzanalyse)

APC *Antigen-presenting cell* (Antigenpräsentierende Zelle)

ApoA1 Apolipoprotein A1

ApoB Apolipoprotein B

bzw beziehungsweise

CCL 2 CC-Chemokin-Ligand 2

CCL 3 CC-Chemokin-Ligand 3

CCL 4 CC-Chemokin-Ligand 4

CCL 5 CC-Chemokin-Ligand 5

CCL 7 CC-Chemokin-Ligand 7

CD105 *Cluster of differentiation 105*

CD11b *Cluster of differentiation 11b*

CD146 *Cluster of differentiation 146*

CD25 *Cluster of differentiation 25*

CD31 *Cluster of differentiation 31*

CD36 *Cluster of differentiation 36*

CD4 *Cluster of differentiation 4*

CD44 *Cluster of differentiation 44*

CD54 *Cluster of differentiation 54*

CD68 *Cluster of differentiation 68*

CD69 *Cluster of differentiation 69*

CD8 *Cluster of differentiation 8*

CD80/86 *Cluster of differentiation 80/86*

cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

Cre *causes recombination or cyclization recombinase*

Ct *cycle threshold*

CTLA-4 *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*

CV *central vein (Zentralvene)*

CXCL 10 *chemokine (C-X-C motif) ligand 10*

CXCL 11 *chemokine (C-X-C motif) ligand 11*

CXCL 16 *chemokine (C-X-C motif) ligand 16*

CXCL 9 *chemokine (C-X-C motif) ligand 9*

DAMPs *Damage-associated molecular Patterns*

DMEM *Dulbecco's modified Eagle medium*

DNA *Desoxyribonucleinsäure*

EMR-1 *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*

Endo *Endothelial*

ERT2 *estrogen-receptor 2 (Östrogenrezeptor 2)*

FACS *fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)*

FcγRIIb *Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b*

FDA *Federal Drug Association*

FoxP3 *Forkhead-Box-Protein P3*

GFP *Grün fluoreszierendes Protein*

GO-Analyse *GeneOntology Enrichment Analyse*

GOI *Gene of interest*

HA *Hepatische Arterie*

HDL *high density lipoprotein*

HSV 1 *Herpes simplex virus 1*

ICAM- 1 *Intercellular adhesion molecule 1*

Ig G *Immunglobulin G*

IL- 17 *Interleukin 17*

IL- 18 *Interleukin 18*

IL-10 *Interleukin 10*

IL-12 *Interleukin 12*

IL-4 *Interleukin 4*

IL1rn *Interleukin 1 Rezeptor-Antagonist*

INF-γ *Interferon- gamma*

KC Kupffer-Zelle

ko *Knockout*

LAG3 Lymphozytenaktivierungsgen 3

LDL *low density lipoprotein*

loxP *locus of X-over of P1*, 34 Basenpaar-langes DNA-Stück

LSEC *Liver sinusoidal endothelial cell* (Leber sinusoidale Endothelzelle)

MACS *Magnetic activated cell sorting*

MBP *Myelin Basic-Protein*

MCAM *melanoma cell adhesion molecule*

mem *memory*

MRC-1 Mannose-Rezeptor C-Typ 1

mRNA *messenger* Ribonukleinsäure

MSR-1 Makrophagen spezifischer Rezeptor- 1

norm. *normalised*

NP Nanopartikel

NuTRAP *Nuclear tagging and Translating Ribosome Affinity Purification*

OVA I Ovalbumin I

p-wert Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert

PacO *PacificOrange*

PAMPs *Pathogen-associated molecular Patterns*

PBS *Phosphate buffered saline* (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PCR *Polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)

PD-1 *programmed cell death protein 1*

PECAM-1 *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*

PFA Paraformaldehyd

PGE2 Prostaglandinrezeptor E2

PLGA *Poly(lactid-co-glycolid)*

PMAOD *Poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)*

Ptger4 *Prostaglandin E Receptor 4*

p.a pro analysi

PV *Portal vein* (Portalvene)

QD *QuantumDot*

qRT-PCR quantitative *Real-time* Polymerasekettenreaktion

R² Bestimmtheitsmaß

mRNA *messenger* Ribonukleinsäure

SEM *standard error of the mean* (Standardfehler des Mittelwerts)

Sfrp5 *secreted frizzled protein 5*

SPARC *Secreted protein acidic and rich in cysteine*

SPIO *Super paramagnetic iron oxide particle*

SR-B *Scavenger receptor* der Klasse B

SRB1 *Scavenger-Rezeptor B1*

Stab1 Stabilin-1

Stab2 Stabilin-2

Tbp TATA-Bindeprotein

TGF- β *Transforming growth factor β*

TH0 *T helper cell 0*

TH1 *T helper cell 1*

TH17 *T helper cell 17*

TH2 *T helper cell 2*

Tol *tolerance*

TRAP-IP *Translating Ribosome Affinity Purification-* Immunpräzipitation

Treg regulatorische T- Zelle

VAP -1 *vascular adhesion protein 1*

VCAM- 1 *Vascular cell adhesion protein 1*

VeCadher5 Vaskuläres endotheliales Cadherin 5

Vs versus

Wt Wildtyp

36b4 *acidic ribosomal phosphoprotein P0*

1 Einleitung

1.1 Aufgaben, Versorgung und Zellmorphologie der Leber

1.1.1 Blutzufuhr und Aufgaben der Leber

Die Leber erfüllt im Körper eine Vielzahl von Funktionen. Einerseits dient die Leber der Reinigung des Blutes von Giftstoffen und Abfallprodukten. Außerdem werden in der Leber Gallensäuren und wichtige Bluteiweißstoffe, wie zum Beispiel Albumin, produziert. Die Leber spielt außerdem eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel. (Häussinger and Löffler 2014) Eine weitere relevante Funktion der Leber ist die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems und die Vermittlung von immunologischer Toleranz gegen ungefährliche Bestandteile aus dem Blut. (Horst et al. 2016)

Durch die Leber fließen pro Minute circa 30 % des gesamten Blutvolumens des Körpers. (Sheth and Bankey 2001) Dabei wird das Organ von zwei verschiedenen Blutquellen gespeist. Circa 70 % des Blutes erreicht die Leber über die *Vena portae*, welches die Organe des Verdauungsorgans dräniert. Dieses Blut ist angereichert mit mikrobiellen Peptiden, Mikronährstoffen, Gallensäuren und Stoffwechselhormonen wie Insulin und Glukagon. Die anderen 30 % der Blutzufuhr entstammen aus der *Arteria hepatica propria*, worüber das Leberparenchym mit Sauerstoff versorgt wird. Das durch die Leber fließende Blut ist dementsprechend gemischt arteriell-venös und wird nach Passieren des Organs in die untere Hohlvene abgeleitet. (Poisson et al. 2017)

Eine zentrale Rolle der Leber ist es, Toleranz gegen unschädliche Nahrungsbestandteile, Bakterienbestandteile des Mikrobioms und harmlosen Antigenen zu etablieren und gleichzeitig eine adäquate Immunreaktion hervorzurufen, wenn es zu einem Angriff durch ein schädliches Pathogen oder Toxin kommt. Die Zellen der Leber müssen dafür eine Unterscheidung zwischen harmlosen und gefährlichen Molekülen vornehmen und eine dementsprechend passende Immunreaktion auslösen. Nötig hierfür ist das Zusammenspiel von parenchymalen Leberzellen, residenten Leukozyten und zirkulierenden Lymphozyten. (Racanelli and Rehermann 2006)

1.1.2 Morphologie leberresidenter Zellen und deren histologische Anordnung

Hepatocyten, 60-80 % der Zellen aus der Leber, bilden das Leberparenchym. (Racanelli and Rehermann 2006) Die restlichen Zellen der Leber sind vor allem Endothelzellen, leberresidente Makrophagen, sogenannte Kupffer-Zellen, biliäre Zellen, Sternzellen und residente Lymphozyten. Die Zellen sind mikroskopisch in 1-2 mm große Leberlobuli (=‘Leberläppchen’) angeordnet. Zwischen diesen Leberläppchen befindet sich das periportale Feld, in dem kleine Äste der *V.portae*, der *A.hepatica* und des Gallengangs in der sogenannten Glisson-Trias verlaufen. In der Mitte dreier Leberläppchen befindet sich die Zentralvene. Das arterielle Blut aus der *A. hepatica* und das venöse Blut aus der *V. portae* mischt sich in den Sinusoiden, welche zwischen den Hepatozyten von periportalem Feld zur Zentralvene verlaufen. Über die Zentralvene wird das Blut dann in größere Gefäße und schließlich in die untere Hohlvene abgeleitet.

Die Sinusoide werden von einer einzelnen Reihe von Endothelzellen ausgekleidet. (Racanelli and Rehermann 2006) Zwischen den Sinusoiden und den Hepatozyten befindet sich der Disse-Raum, in dem Sternzellen und Ausläufer von Kupffer-Zellen liegen. Direkt dahinter befinden sich die Parenchym-bildenden Hepatozyten. Durch eine starke Fenestrierung des Sinusoid-begrenzenden Endothels haben die Hepatozyten und Leukozyten im Disse-Raum ständigen Kontakt zu den im Blut transportierten Antigenen und Peptiden, außerdem können Lymphozyten den Disse-Raum durch Extravasation leicht erreichen. (Wisse 1970) Die Leber-sinusoidalen Endothelzellen bilden somit die Schnittstelle zwischen intra- und extrahepatischem Raum. (Poisson et al. 2017)

Im Folgenden soll die Rolle der einzelnen Leberzellen für das Immunsystem und die Etablierung des tolerogenen Milieus erläutert werden.

1.1.3 Immunologische Funktion der Leber

Wie Racanelli und Rehermann in ihrem Review aus dem Jahr 2006 beschrieben haben, macht es die besondere Anatomie und Anordnung der Zellen in der Leber möglich, viele Lymphozyten anzulocken und zu aktivieren. Dies sorgt für die besondere Stellung der Leber im systemischen Immunsystem und hilft bei der Fähigkeit, antigenspezifische Toleranz zu etablieren. Die tolerogene Immunantwort, die von der Leber gegen viele harmlose Moleküle aus dem Gastrointestinaltrakt

vermittelt wird, wirkt systemisch im gesamten Organismus und nicht nur begrenzt in der Leber.

Die Etablierung einer antigen-spezifischen Toleranz gegen bestimmte Nährstoffbestandteile, mikrobielle Peptide von harmlosen Bakterien des Mikrobioms und potenziell allergenen Stoffen aus dem Darm ist essenziell und lebensnotwendig. Ohne eine solche Toleranzentwicklung wäre Nahrungsaufnahme ohne sofortige Immunreaktion gar nicht möglich. (Thomson and Knolle 2010) Die Leber sorgt unter physiologischen Bedingungen für eine Homöostase: Niedrige Konzentrationen von bakteriellen Bestandteilen führen zu Immuntoleranz, bei hohen Konzentrationen von Pathogenen kann aber schnell eine adäquate Immunreaktion ausgelöst werden, die die Infektion bzw. den Erreger bekämpft. (Jenne and Kubes 2013) Für die Herstellung dieser Toleranz ist das Zusammenspiel von residenten Antigen-präsentierenden Zellen der Leber (im folgenden APCs genannt) und zirkulierenden Lymphozyten notwendig. Die wichtigsten APCs der Leber stellen Kupffer-Zellen, dendritische Zellen und die Sinusoid-aukskleidenden Zellen, so genannte Leber-sinusoidale Endothelzellen (im Folgenden LSECs genannt), dar. Diese Zellen können Antigene, welche in die Sinusoide angespült werden, oder von infizierten Hepatozyten freigesetzt werden, aufnehmen und prozessieren. (Racanelli and Rehermann 2006)

Kupffer-Zellen, welche circa 20 % der non-parenchymalen Leberzellen ausmachen (Mackay 2002), phagozytieren große Mikroorganismen und Zelltrümmer und entfernen Endotoxine aus der Zirkulation. (DeLeve and Maretti-Mira 2017) Die hohe Phagozytoseaktivität der Kupffer-Zellen wird vor allem über den Mannoserezeptor (MRC-1) (Gazi and Martinez-Pomares 2009) und den Makrophagen-Scavenger-Rezeptor (MSR-1) vermittelt (Dunne et al. 1994). Wichtige Marker der Kupffer-Zellen stellen F4/80 (EMR-1), CD68 und CD11b dar. (Nguyen-Lefebvre and Horuzsko 2015)

Ein weiterer Zelltyp, der in der Leber hauptsächlich für die Prozessierung und Präsentation von Antigenen zuständig ist, sind dendritische Zellen. Durch die ständige Expression von anti-inflammatorischen IL-10 und TGF- β durch LSECs und Kupffer-Zellen finden sich in der Leber hauptsächlich unreife, ruhende dendritische Zellen (Khanna et al. 2000; Buelens et al. 1997) Diese unreifen dendritischen Zellen inhibieren die Proliferation und Cytokin-Ausschüttung von infiltrierenden Lymphozyten durch die Expression von anti-inflammatorischem CTLA-4 und PD-1 und tragen so dem tolerogenen Lebermilieu bei. (Probst et al.

2005) Auch LSECs tragen zur Aufrechterhaltung des Leber-Toleranz Effekts bei; dieser Zelltyp soll im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

1.2 Leber-sinusoidale Endothelzellen

1.2.1 Morphologie und Zellaufbau

LSECs machen circa 15-20 % der Endothel-auskleidenden Zellen und 3 % der Gesamt-Leberzellen aus. (Maslak, Gregorius, and Chlopicki 2015) LSECs spielen eine zentrale Rolle in der Hämostase, Thrombostase, dem Transport von Stoffwechselprodukten, in Inflammation, Angiogenese und Immuntoleranz. (Chiu and Chien 2011) Zuerst beschrieben wurden die besonderen strukturellen Eigenschaften der Zelle im Jahr 1970 von de Wisse (Wisse 1970), in einer Arbeit, in der das Leberparenchym mittels Elektronenmikroskopie untersucht wurde.

LSECs sind zwar Endothelzellen, besitzen aber im Gegensatz zu anderen Endothelzellen keine Basalmembran und kein Diaphragma. Außerdem, wie von de Wisse 1970 beschrieben, besitzen LSECs sogenannte *Fenestrae* - offene Poren mit einem Durchmesser von 150-175 nm. *Fenestrae* machen circa 6-8 % der Zelloberfläche von LSECs aus. (Wisse et al. 1985)

Über Diffusion durch die *Fenestrae* können Stoffe das Endothelium passieren, ohne endosomale und lysosomale Kompartimente der LSECs zu passieren. Da die *Fenestrae* durch ihre definierte Größe nur kleinere Partikel passieren lassen, wirken die Poren als dynamischer Filter, indem sie nur kleine Moleküle und Peptide passieren lassen. So spielen die *Fenestrae* auch eine wichtige Rolle im Lipoproteinstoffwechsel. Der Verlust dieser LSEC-Filterfunktion über die *Fenestrae* spielt in diesem Kontext eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose, da dadurch vermehrt Lipoproteine im Blutkreislauf zirkulieren. (Wisse et al. 1985; Fraser, Bosanquet, and Day 1978)

Neben der hohen Durchlässigkeit der LSECs durch die *Fenestrae* beschreibt Smedsrod in seinem Review von 2009 LSECs als diejenigen Zellen mit einer der höchsten Endozytosekapazität im gesamten Körper. (Smedsrød et al. 2009) LSECs können Stoffe durch Endozytose aufnehmen, aber auch mittels Transzytose durch das Endothel direkt in den Disse-Raum schleusen. (Irie and Tavassoli 1991; Simionescu and Simionescu 1988). Die hohe Endozytoseaktivität wird durch die große Anzahl an *clathrin-coated-Vesikeln* und lysosomalen Vakuolen im Perikaryon aufgezeigt. (Wisse 1970; Kjekken et al. 2001; Wisse 1972) Drei wichtige Klassen von Endozytose-Rezeptoren werden von LSECs exprimiert: der Mannose-Rezeptor (MRC-1), *Scavenger*-Rezeptoren und der FcγRIIb-

Rezeptor. (Smedsrød et al. 2009; Sorensen et al. 2012). Die spezifischen Funktionen dieser Rezeptoren werden im Kapitel 1.2.2. erläutert.

Die Endozytose durch LSECs vermittelt - im Gegensatz zur Phagocytose durch die Kupffer-Zellen und anderen Monocyten - eher die Aufnahme von kleinen Makromolekülen und Partikeln. (Sorensen et al. 2012) Dieser Unterschied zwischen Kupffer-Zellen und LSECs ist ein wichtiges Merkmal und kann zur spezifischen Ansteuerung einer der Zelltypen genutzt werden.

1.2.2 Rezeptorprofil

Die hohe Endozytoseaktivität der LSECs setzt voraus, dass es eine hohe Anzahl an Rezeptoren auf der Oberfläche der LSECs geben muss, die die unterschiedlichen Substrate aufnehmen. So dient das sinusoidale Endothel auch als molekulare ‚Müllabfuhr‘, die Zellbestandteile und ausgediente Proteine aus der Zirkulation mittels Endozytose entfernt. In mehreren Reviews wurde die Expression der Endozytose-Rezeptoren und zugehörigen Substraten, die auf LSECs zu finden sind, ausführlich beschrieben (Pandey, Nour, and Harris 2020; Bhandari et al. 2021). Im Folgenden werden die Funktionen der wichtigsten LSEC-Rezeptoren detaillierter dargestellt. Im Folgenden soll der Fokus auf die wichtigsten Rezeptoren - Stabilin-1 und Stabilin-2, MRC-1 und SR-B - gelegt werden.

1.2.2.1 Stabilin-1 und Stabilin-2

Die zwei *Scavenger*-Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2 spielen die wichtigste Rolle im Endozytose-Apparat der LSECs, hierbei soll vor allem Stabilin-2 unentbehrlich für die Endozytosefunktion der Zelle sein. (McCourt et al. 1999; Sorensen et al. 2012) Beide Rezeptoren sind auf LSECs konstitutiv exprimiert und vor allem mit den frühen Stadien des Endozytoseprozess, unabhängig vom Substrat, assoziiert. (Hansen et al. 2005)

Die Rezeptoren gehören zur Klasse der *Scavenger*-Rezeptoren H, unterscheiden sich jedoch in Ihrer Substratspezifität und Zellexpression. Beide Rezeptoren binden eine Reihe von unterschiedlichen Molekülen, wie zum Beispiel Heparin, oxidiertes LDL oder Phosphatidylserin. Eine genaue Aufzählung aller Substrate listet Bhandari in seinem Review aus dem Jahr 2020 auf.

Es liegen einige Unterschiede in der Substratspezifität der beiden Rezeptoren vor: Stabilin-1 bindet im Gegensatz zu Stabilin-2 kein Hyaluron. (Politz et al. 2002;

Prevo et al. 2004) Anders als Stabilin-1 bindet Stabilin-2 kein SPARC (Kzhyshkowska et al. 2006), hat aber eine höhere Affinität zu AGE-Proteinen. (Tamura et al. 2003; Hansen et al. 2005) Besonders Stabilin-2 spielt als Marker für LSECs eine wichtige Rolle, da der Rezeptor zwar auch auf anderen sinsuoidalen Endothelzellen aus Lymphknoten, Milz und Knochenmark exprimiert ist, in der Leber jedoch ausschließlich auf LSECs exprimiert wird. (McCourt et al. 1999; Politz et al. 2002; Falkowski et al. 2003; Martens et al. 2006; Bhandari et al. 2020) Stabilin-1 wird in der Leber nicht nur von LSECs, sondern auch von M2-phänotypischen Makrophagen exprimiert. (Politz et al. 2002)

Die Rolle der beiden Stabiline wurde in mehreren Arbeiten mit entsprechenden knockout Mausmodellen untersucht. Hierbei wiesen Einzel-Knockout-Mäuse für Stabilin-1 oder Stabilin-2 einen normalen Phänotyp auf, während der Stabilin-1 / Stabilin-2 Doppel-Knockout zu einer verringerten Lebensdauer, verminderten Fortpflanzungsrate und schwerer glomerulärer Fibrose führte. Die Lebern der doppel-Knockout Mäuse zeigten jedoch nur eine geringe periportale Fibrose. (Schledzewski et al. 2011) Dies lässt darauf schließen, dass die beiden *Scavenger*-Rezeptoren in Ihrer Kombination wichtig für die Aufrechterhaltung von normaler Organfunktion sind, aber die endozytotische Aktivität bei Ausfall eines Rezeptors von dem jeweils anderen Stabilin-Rezeptor übernommen werden kann.

1.2.2.2 MRC-1

Der Mannose-Rezeptor, ein Mitglied der Familie der Typ-C-Lektine, ist ebenso exprimiert auf LSECs. In der Leber wird der Rezeptor auch auf Kupffer-Zellen exprimiert und findet sich zusätzlich in mehreren anderen Organen, wie zum Beispiel Niere und Milz. (Linehan et al. 1999; Linehan et al. 2005; McGreal, Martinez-Pomares, and Gordon 2004) Der Rezeptor bindet mehrere Pathogene, unter anderem *Candida albicans* und *Leishmania donovani* (Stahl and Ezekowitz 1998; Gordon 2002; Allavena et al. 2004) sowie Viruspartikel, wie zum Beispiel HSV1 und *Influenza*. (Milone and Fitzgerald-Bocarsly 1998; Reading, Miller, and Anders 2000)

Auf LSECs ist der Rezeptor hauptsächlich für die Aufnahme von denaturiertem Kollagen zuständig und trägt damit zur Beseitigung von Abfallprodukten aus dem Blutkreislauf bei. (Malovic et al. 2007)

1.2.2.3 FcγRIIb

Der FcγRIIb Rezeptor findet sich, neben der Expression auf hämatopoetischen Zellen, ausschließlich auf LSECs. In einigen Studien wurde der Rezeptor deswegen auch als Marker für LSECs verwendet. Der Rezeptor nimmt kleine IgG-Immunkomplexe auf und spielt damit eine essenzielle Rolle, um die Anhäufung von Immunglobulinen im Kreislauf zu verhindern und damit der Entstehung von Immunkomplexkrankheiten entgegenzuwirken. (Mousavi et al. 2007)

1.2.2.4 MSR-1

Der Makrophagen-Scavenger Rezeptor, auch MSR-1, ist ein weiterer Rezeptor aus der Klasse der Fressrezeptoren. Auf Phagozyten wird er in hohem Maße exprimiert, jedoch wurde schon 1983 gezeigt, dass dieser auch auf LSECs exprimiert wird. (Nagelkerke, Barto, and van Berkel 1983) Der Rezeptor ist an der Aufnahme von unterschiedlichen Substraten, unter anderem LDL, AGE-Produkten und bakteriellen Zellwandbeständen, beteiligt. (Kunjathoor et al. 2002; Araki et al. 1995; Dunne et al. 1994) Auf LSECs vermittelt der Rezeptor hauptsächlich die Aufnahme von modifiziertem, z.B. acetylierten, LDL. (Nagelkerke, Barto, and van Berkel 1983)

1.2.2.5 SR-B

Zu der Klasse der *Scavenger*-Rezeptoren B gehören zwei Isoformen: der SR-B1 Rezeptor sowie CD36. Neben der hohen Expression von SR-B1 in androgenen Organen wie Ovarien, Hoden und Nebennierenrinde, wird SR-B1 in der Leber unter anderem auch von LSECs exprimiert. Der SR-B1 Rezeptor ist hauptsächlich für die selektive Aufnahme von Cholesterin aus HDL zuständig. (Acton et al. 1996; Ganesan et al. 2016) CD36 wird ebenfalls auf LSECs exprimiert und auch HDL-Partikel werden über CD36 in die Leber aufgenommen. (Malerød et al. 2002) Im Organismus spielen die SR-B Rezeptoren eine wichtige Rolle im Lipoprotein- und Energiestoffwechsel, jedoch ist unklar, welche Rolle die spezifische Expression von SR-B und CD36 auf LSECs hat. (Pandey, Nour, and Harris 2020)

1.2.2.6 Weitere LSEC-Marker

Einen Marker zu identifizieren, der in der Leber spezifisch LSECs markiert, stellt eine große Herausforderung dar. LSECs exprimieren eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren, viele von ihnen sind Mitglied der Familie der *Scavenger*-Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden jedoch oft ebenso auf vielen

anderen Zelltypen exprimiert. In der Leber stellen vor allem die Kupffer-Zellen einen Zelltyp dar, der ein ähnliches Rezeptorprofil wie LSECs aufweist. Zur spezifischen Isolation von LSECs aus einer Lebereinzelsuspension werden unterschiedliche Oberflächenmarker in Betracht gezogen, die LSECs mit hoher Spezifität von anderen Zellen unterscheiden sollen. Lauria DeLeve fasst in ihrem Review von 2017 zusammen, welche Marker hierfür in Betracht gezogen werden können:

CD31 (PECAM-1) ist ein Marker, der auf einigen LSECs exprimiert wird, die wenig fenestriert sind und sich in der Nähe der Zentralvene befinden. (DeLeve and Maretti-Mira 2017) Die Expression von CD31 auf voll ausgereiften, fenestrierten LSECs unter physiologischen Bedingungen wurde jedoch widerlegt. (DeLeve et al. 2004) CD146 (MCAM) ist ein Oberflächenmarker, der in der Leber von Endothelzellen, vaskulären Perizyten und hepatischen Sternzellen exprimiert wird. (Strauss et al. 2017) CD146 wird auf den Endothelien mehrerer Organe in hohem Maße exprimiert und gilt daher als sehr guter Angriffspunkt für immunomagnetische Isolationsverfahren. (Schrage, Loddenkemper, et al. 2008) Magnetische Antikörper gegen CD146 werden als *LSEC-specific beads* vermarktet und wurden schon in mehreren Studien zur Isolation von LSECs sowie anschließender Kultivierung der Zellen genutzt. Als weitere Marker gelten ebenso ICAM-1 und CD105, beide Marker werden jedoch nicht konstant auf allen LSECs exprimiert. (DeLeve and Maretti-Mira 2017)

1.2.3 Immunologische Funktionen der LSECs

Wie in Kapitel 1.1.3 (‘Immunologische Funktion der Leber’) erwähnt, spielen auch LSECs eine essenzielle Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Toleranz und Immunreaktion in der Leber. LSECs sind hierbei hauptsächlich für die Vermittlung von Toleranz zuständig. Anders als andere residente APCs der Leber zeigen LSECs eine sehr geringe Plastizität auf und sind in ihrem Phänotyp sehr resilient. Auch in Anwesenheit von externen inflammatorischen Stimuli vermitteln sie dadurch konstant immunologische Toleranz. (Gottwick, Carambia, and Herkel 2022)

Im Folgenden sollen die wichtigsten Funktionen und Attribute der LSECs dargestellt werden, um ihre Rolle im Immunsystem zu erläutern.

1.2.3.1 Angeborenes Immunsystem

Ein wichtige Funktion der LSECs ist, wie in 1.2.2.3 erwähnt, die Beseitigung von kleinen IgG-Immunkomplexen aus der Zirukaltion. Hierfür exprimieren LSECs den Fc γ RIIb Rezeptor auf Ihrer Oberfläche. (Ganesan et al. 2012; Mousavi et al. 2007) Als eine der wichtigsten hepatischen *Scavenger*-Zellen, ausgestattet mit unterschiedlichsten endozytischen Rezeptoren wie dem Mannose-Rezeptor, den *Scavenger*-Rezeptoren und Fc γ RIIb, gelten LSECs als genauso effizient in Aufnahme und Präsentation von Antigenen wie dendritische Zellen. (Schurich et al. 2010). Zusätzlich exprimieren LSECs mehrere *Pattern-recognition receptors*, (PRRs) sowie *Toll-like receptors*, die PAMPs, DAMPs und bakterielle Lipolpoysaccharide erkennen. (Areschoug and Gordon 2009; Gazi and Martinez-Pomares 2009; Martin-Armas et al. 2006; Uhrig et al. 2005; Wu et al. 2010) Durch die Expression dieser vielfältigen Rezeptoren stellen LSECs eine zentrale Rolle in der Präsentation von unterschiedlichen Antigenen in der Leber dar, welche eine wichtige Funktion des angeborenes Immunsystems ausmacht.

1.2.3.2 Leukozytendiapedese

Es ist bekannt, dass LSECs dauerhaft CD54, ICAM-1, VCAM-1 und *vascular-adhesion protein-1* (VAP-1) sowie CD44 und Hyaluron exprimieren, und somit dauerhaft zur Leukozytenrekrutierung in der Leber beitragen. (Knolle and Limmer 2003; Wong et al. 1997) Neben Adhäsionsmolekülen werden auch unterschiedliche Chemokine von LSECs produziert und ausgeschüttet, so zum Beispiel CXCL 16. (Geissmann et al. 2005) CXCL 16 führt zum Anlocken von T-Effektor Zellen, *Natural-Killer Cells* und *Natural-Killer T-cells* in die Sinusoide. (Heydtmann et al. 2005; Stegmann et al. 2016; Geissmann et al. 2005) Neben der eigenen Produktion von Chemokinen nehmen LSECs aber auch Chemokine, ausgeschüttet von benachbarten Zellen, durch Transzytose auf und exprimieren diese dann an der Zelloberfläche. (Middleton et al. 2002; Schrage, Loddenkemper, et al. 2008; Schrage, Wechsung, et al. 2008; Neumann et al. 2015) CXCL 9-11, wichtig für die Rekrutierung und Transmigration von T-Zellen, werden über solchen Prozess internalisiert und exprimiert. (Curbishley et al. 2005)

1.2.3.3 Adaptives Immunsystem

Neben der Funktion als APC und der ständigen Anlockung von Leukozyten in die Sinusoide können LSECs aber auch direkt mit CD4- und CD8- positiven Lymphozyten interagieren und das *Priming* dieser Lymphozyten in Richtung eines

tolerogenen Phänotyps beeinflussen. LSECs exprimieren unter physiologischen Bedingungen, durch das ständige Vorhandensein von anti-inflammatorischem IL-10 in den Sinusoiden, nur niedrige Level von MHC-II, dem costimulierenden CD80/86 sowie MSR-1. (Knolle et al. 1998; Lohse et al. 1996) Des Weiteren exprimieren LSECs anti-inflammatorische costimulierende Rezeptoren wie *programmed death-1* (PD-1). (Diehl et al. 2008) LSECs exprimieren also unter physiologischen Bedingungen wenige aktivierende costimulierende Marker und viele anti-inflammatorische Marker.

LSECs können CD4-positive T-Zellen zur Cytokinstimulation und Proliferation anregen. Durch das Fehlen von inflammatorischem IL-12, INF- β oder IL-18 erlangen diese aktivierten T-Zellen keine Th1 Effektor-Funktion, sondern werden zu IL-4 und IL-10 produzierenden CD4-positiven T-Zellen mit einem Th0-Phänotyp. Diese Zellen sind zwar keine klassischen regulatorischen T-Zellen, weisen aber trotzdem immunsuppressive Aktivitäten auf. Dies stellt einen Zelltyp dar, mit der LSECs die inflammatorische Aktivität in der Leber unterdrücken. (Knolle, Germann, et al. 1999; Knolle, Schmitt, et al. 1999; Kruse et al. 2009)

Durch die Expression von IL-10 und dem PD-1 Signalweg können LSECs auch aktivierte Th1- und Th17-Effektorzellen beeinflussen. Die Stimulation dieser T-Effektor Zellen durch LSECs führt zu einer verringerten Expression von proinflammatorischem INF- γ und IL-17. Die Proliferation der Zellen ist hierdurch jedoch nicht beeinträchtigt. (Carambia et al. 2013) Des Weiteren fördern LSECs die Proliferation von anti-inflammatorischen, IL-4 produzierenden Th2-Zellen. (Klugewitz et al. 2002) LSECs nehmen so Einfluss auf Differenzierung und Cytokinausschüttung mehrerer Subtypen von CD4-positiven T-Zellen und *primen* die Zellen in Richtung eines tolerogenen Phänotyps.

Darüber hinaus können LSECs mit hoher Effizienz naive CD4 T-Zellen zu CD25+Foxp3+-regulatorischen Zellen primen. Hierfür benötigen sie das costimulierende Molekül TGF- β . LSECs gelten als einzige non-parenchymale Leberzelle, die zirkulierendes TGF- β binden können. (Carambia et al. 2014) LSECs sind genauso effektiv in der Etablierung von CD8 T-Zell spezifischer Toleranz. LSECs präsentieren Antigene, aufgenommen durch Endozytose, über die sogenannte *cross-presentation* den naiven, CD8-positiven T-Zellen. Dies führt zur Etablierung von tolerogenen CD8-positiven T-Zellen. (Diehl et al. 2008; Limmer et al. 2000) Des Weiteren induzieren LSECs die Proliferation zu CD8-positiven *memory T-cells*, welche unter physiologischen Bedingungen quieszent

verbleiben und starke Aktivierungssignale zur Aktivierung benötigen. (Böttcher et al. 2014; Dudek et al. 2022)

Wie in der Abbildung 1 zusammengefasst, können LSECs sowohl naive CD4-positive als auch Th1- und Th2- Effektor-Zellen zu einem tolerogenen Phänotyp *primen*. Zusätzlich können LSECs auch CD8-positive T-Zellen zu einem tolerogenen Phänotyp umwandeln. Die Interaktion von zirkulierenden Lymphozyten mit LSECs führt also, im Gegensatz zur Interaktion mit anderen APCs wie zum Beispiel dendritischen Zellen, zu einer eher immunsuppressiven Antwort.

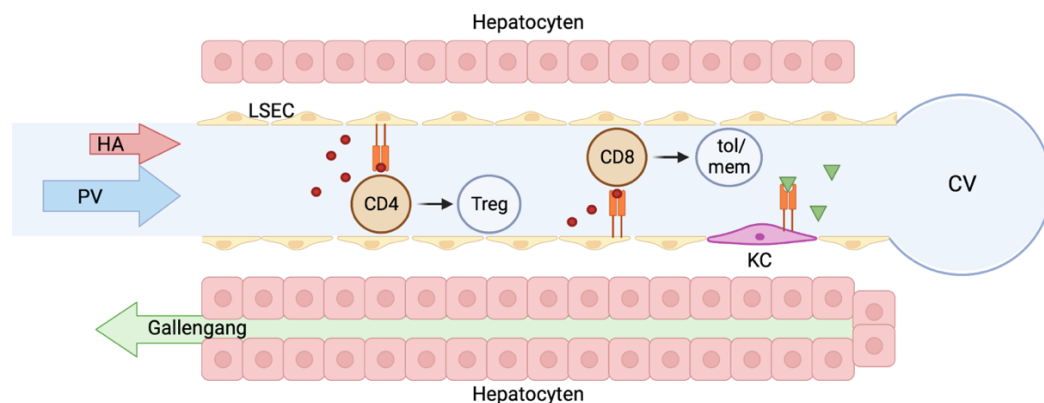


Abb.1: Immunologische Funktionen residenter non-parenchymaler Leberzellen.

Abbildung adaptiert nach Gottwick et al. 2022, erstellt mit BioRender. Die arterielle Blutversorgung der Leber erfolgt über die hepatische Arterie (HA), das venöse Blut des Gastrointestinaltrakts erreicht die Leber über die Portalvene (PV). Leber-sinusoidale Endothelzellen (LSECs) können die Reifung von naiven CD4+ T-Zellen zu Foxp3+ regulatorischen T-Zellen induzieren. Außerdem agieren LSECs mit CD8+ T-Zellen und induzieren einen tolerogenen Phänotyp derselben. Auch Kupfer-Zellen (KCs) phagozytieren Moleküle aus den Sinusoiden. Das gemischt arteriell-venöse Blut fließt aus den Sinusoiden in die Zentralvene (CV) und von dort gesammelt in die untere Hohlvene.

1.3 LSEC-vermittelte Induktion Antigen-spezifischer Immuntoleranz

Die Fähigkeit der LSECs, Lymphozyten in Richtung eines tolerogenen Phänotyps zu modulieren, wird als Ansatzpunkt zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen untersucht. Autoimmunerkrankungen entstehen durch eine proinflammatorische Immunreaktion gegen Autoantigene, die das Immunsystem fälschlicherweise als fremd und gefährlich erkennt. Dies führt zum Angriff und der Zerstörung von körpereigenen Strukturen. Es sind mehr als 80 unterschiedliche Autoimmunerkrankungen bekannt; hierbei werden zwischen T- und B-Zell vermittelten Krankheitsbildern unterschieden. (Davidson and Diamond 2001; "Progress in autoimmune diseases research." 2005) Als Behandlungsoptionen

stehen heutzutage Immunsuppressiva zur Verfügung, die an mehreren Stellen des Immunsystems eingreifen und die Proliferation und Ausbreitung von B- oder T-Zellen systemisch unterdrücken. Diese Medikamente greifen vor allem in Syntheseschritte der DNA-Produktion ein. Hierbei entstehen eine Reihe von Nebenwirkungen, die die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken und die Verträglichkeit der Präparate erschweren. (Kellner 2011)

Die Etablierung von immunologischer Toleranz, die spezifisch auf ein autoreaktives Antigen abzielt, würde die Unterdrückung des Immunsystems auf systemischer Ebene verzichtbar machen und dem Patienten unangenehme Nebenwirkungen ersparen. Eine aussichtsvolle Therapiestrategie stellt in diesem Kontext ein Ansatz aus dem Feld der Nanomedizin dar. Hierbei sollen kleine Nanopartikel und Nanomaterialien verwendet werden, um Eingriffe in das Immunsystem und in die Krankheitsprogression von Autoimmunerkrankungen durchzuführen. Nanopartikel weisen eine Größe von wenigen Nanometern auf. Diese kleinen Nano- oder Mikropartikel werden verwendet, um Antigene oder andere Moleküle mit hoher Kapazität in den Organismus zu transportieren. Es sind unterschiedliche Partikel bekannt, die ihre Fracht durch ihre spezifische Umhüllung zu ganz bestimmten Zelltypen transportieren können. (Siafaka et al. 2016; Doll et al. 2013) Hierbei spielen vor allem Nanopartikel eine Rolle, die aufgrund ihrer spezifischen chemischen Eigenschaften im Organismus nachverfolgt werden können. Zwei wichtige Vertreter dieser Partikel stellen QuantumDots und SPIOs dar. (Bargheer et al. 2015) QuantumDots weisen eine Eigenfluoreszenz mit einem für den Partikel spezifischen Emissionsmaximum auf und können so mittels Fluoreszenzmessung in Biomaterialien nachgewiesen werden. SPIOs, so genannte superparamagnetische Eisenoxid-Partikel, sind magnetisch und können so mittels Magnetresonanz-Scanner in Biomaterialien nachgewiesen werden. (Wei et al. 2017) (Freund et al. 2012) Da die Nanopartikel nach der Synthese als hydrophobe Partikel vorliegen, müssen sie mit einer hydrophilen Ummantelung versehen werden, um in das hydrophile Blutplasma appliziert werden zu können. (Shtykova et al. 2008)

Carambia et al. haben 2015 herausgefunden, dass Nanopartikel, umhüllt mit dem hydrophilen amphiphilen Polymer (*poly(maleic acid-alt-1-octadecene)* - im Folgenden abgekürzt als PMAOD), mit hoher Selektivität in LSECs aufgenommen werden. (Carambia et al. 2015) Somit dienen diese PMAOD-Nanopartikel als selektiver Transportvehikel für LSECs, so dass Moleküle, die gekoppelt an den Nanopartikel injiziert werden, spezifisch von den LSECs endozytiert werden. Die

selektive Aufnahme der Nanopartikel wurde in einer weiteren Publikation von Carambia et al. aus dem Jahr 2021 anschaulich dargestellt. Abbildung 2 zeigt eine Darstellung aus der Publikation. Die Aufnahme fluoreszierender Nanopartikel - sogenannter QuantumDots - in die Leber wurde mittels intravitaler Mikroskopie untersucht und dargestellt.

Die folgende Abbildung 2 zeigt, dass sich die fluoreszierenden Nanopartikel mit hoher Spezifität an die LSECs binden und internalisiert werden, wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus der Publikation von Heine et al. demonstriert haben. (Heine et al. 2014)

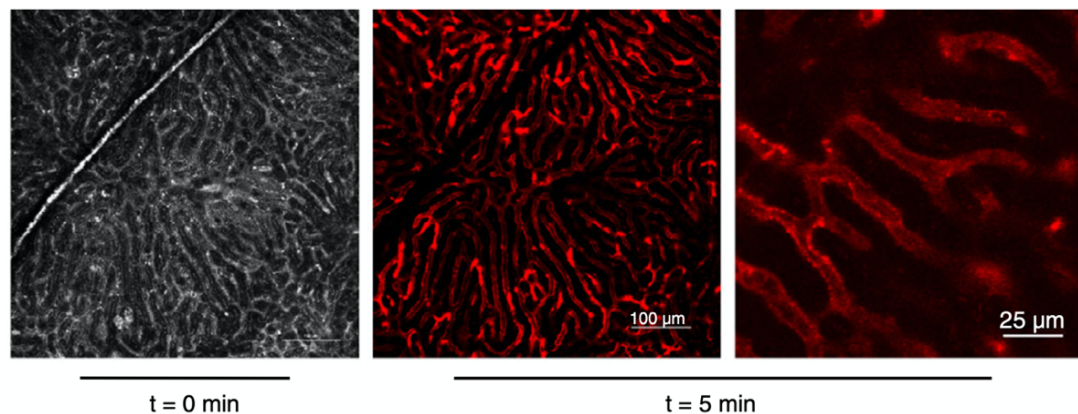


Abb.2: Aufnahme fluoreszierender, PMAOD-umhüllter Nanopartikel in Leber-sinusoidale Endothelzellen der Leber.

Darstellung mittels intravitaler Fluoreszenz-Mikroskopie. Bildquelle: Carambia et al. 2021

Mithilfe dieser Nanotransporter wurde gezeigt, dass LSECs antigenspezifische Toleranz gegen ein transportiertes Autoantigen vermitteln können. In der Arbeit von Carambia et al. aus dem Jahr 2015 wurde dieses Prinzip am Krankheitsbild der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis im Mausmodell dargestellt. Abbildung 3 bildet eine schematische Darstellung des Therapieansatzes ab. Nach Krankheitsinduktion mit einem autoreaktiven *Myelin Basic Protein* (MBP)-Peptid wurden die Mäuse mit PMAOD-umhüllten Nanopartikeln, an welche dasselbe MBP-Peptid gekoppelt war, behandelt. LSECs nahmen das MBP-Peptid mithilfe des PMAOD-umhüllten *Nanocarriers* auf. Über die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die LSECs wurde eine tolerogene Immunantwort gegen das MBP-Peptid vermittelt, was sich klinisch in der Verbesserung der Enzephalitis-Symptomatik der Mäuse äußerte. Die Arbeit aus dem Jahr 2015 zeigt einen Antigen-spezifischen Ansatz, CD4- T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankungen zu behandeln. (Carambia et al. 2015) Eine weitere, im Jahr 2021 erschienene Arbeit

von Carambia et al. zeigt außerdem, dass die LSEC-vermittelte Induktion von antigenspezifischer Toleranz nicht nur zur Behandlung CD4- T-Zell vermittelter Autoimmunerkrankungen, sondern auch zur Behandlung CD8- T-Zell vermittelter Autoimmunerkrankungen genutzt werden kann und eine Behandlungsmöglichkeit zumindest im Mausmodell darstellt. (Carambia et al. 2021) In ersten klinischen *Trials* wird die Etablierung von antigenspezifischer Toleranz über Nanopartikel, die spezifisch LSECs erreichen sollen, untersucht. ("*Topas Therapeutics Announces First Patient Enrolled in Phase 1 Trial with TPM203 in Pemphigus Vulgaris*" 2019)

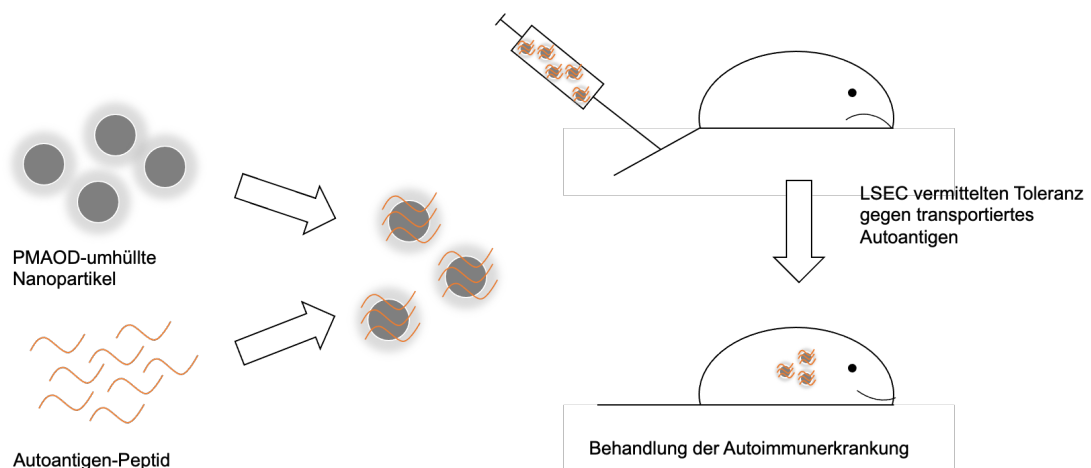


Abb.3: Schematische Darstellung des Therapieansatzes mittels Nanopartikel-vermittelter Peptidgabe

Durch die Umhüllung mit PMAOD werden peptidbeladene Nanopartikel nach intravenöser Applikation von LSECs endozytiert. LSECs vermitteln daraufhin Toleranz gegen das transportierte Peptid. Mithilfe der LSEC-induzierten immunologischen Toleranz konnte die EAE-Progression im Mausmodell aufgehalten werden. Bild adaptiert nach Carambia et al. 2015

1.4 Zielsetzung der Arbeit

LSECs weisen eine sehr geringe immunologische Plastizität auf und können Toleranz auch bei exogenen inflammatorischen Stimuli vermitteln. (Gottwick, Carambia, and Herkel 2022) LSECs stellen daher einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur antigenspezifischen Behandlung von Autoimmunerkrankungen dar, da sie verlässlich und unabhängig Toleranz vermitteln. Damit dieser aussichtsvolle Therapieansatz funktioniert, ist es essenziell, einen Nanotransporter zu synthetisieren, der mit hoher Spezifität in LSECs aufgenommen wird. Mittels QD- und SPIO-markierter Nanopartikel konnte gezeigt werden, dass kleine PMAOD-umhüllte Nanopartikel mit hoher Spezifität in das Endothelium der Sinusoide aufgenommen werden. Bislang ist jedoch nicht bekannt, über welchen

Rezeptor die Endozytose des Partikels in die LSECs erfolgt. *Erstes Ziel dieser Arbeit* war es deshalb, die Aufnahmemechanismen PMAOD-umhüllter Nanopartikel zu untersuchen und einen möglichen Rezeptor zu identifizieren, über den diese Partikel endozytiert werden.

Durch die Behandlung mit den Peptid- gekoppelten Nanopartikeln kommt es zur Induktion antigenspezifischer, regulatorischer T-Zellen. In den Arbeiten von Carambia et al. aus dem Jahr 2015 und 2021 wird der Effekt, der die Behandlung mit den Nanopartikeln auf diese T-Zellen hat, wie folgt dargestellt: Mittels transgener T-Zellen wird die Aktivierung regulatorischer T-Zellen nach der Stimulation der LSECs aufgezeigt. Unklar bleiben jedoch die genauen Mechanismen innerhalb der Leber-sinusoidalen Endothelzellen nach Aufnahme Peptid-gekoppelter Nanopartikel. *Zweite Fragestellung dieser Arbeit* war deshalb die Untersuchung der genauen Veränderungen durch die Aufnahme der Nanopartikel in die LSECs. Es galt herauszufinden, welche transkriptionellen und translationalen Veränderungen innerhalb der Zellen geschehen, um ein besseres Verständnis über die LSEC-vermittelte Toleranzinduktion zu erlangen. Für weitere Untersuchungen der Toleranzinduktion durch LSECs ist es wichtig, genauer zu erfahren, welche Mechanismen bei der Aufnahme und Prozessierung der Partikel abläuft. Besonders im Hinblick auf die mögliche Anwendung am Menschen ist die weitere Erforschung dieses Behandlungsansatzes essenziell. Zu der Frage nach dem genauen Mechanismus der LSEC-induzierten Toleranz gehört einerseits die Frage nach der Rolle der Menge an applizierten Partikeln und Peptiden und andererseits der Rolle des genauen Applikationszeitpunkts der Partikel im Hinblick auf die intrazelluläre Antwort der LSECs. Als *dritte Fragestellung dieser Arbeit* soll deshalb die Relevanz der applizierten Partikelmenge sowie des Applikationszeitpunkts untersucht werden. Ziel dieser Studien sollte es sein, den Zeitpunkt zu definieren, bei dem eine maximale Reaktion auf die Nanopartikel-vermittelte Peptidgabe in LSECs hervorgerufen wird.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die im Rahmen der Promotion verwendeten Materialien aufgelistet und die genauen Abläufe der Versuche erläutert. Im Rahmen der Beschreibung der einzelnen Versuchsabläufe werden die verwendeten Mauslinien sowie die eingesetzten Nanopartikel erläutert. Außerdem finden sich in diesem Kapitel die Protokolle der Extraktion der Nucleinsäuren aus den Geweben sowie die Beschreibung der Isolation endothelialer mRNA. Zuletzt werden die Methoden, die für die molekularbiologischen Analysen genutzt wurden erläutert sowie auch die angewandten Verfahren zur statistischen Datenanalyse aufgezeigt.

2.1 Auflistung der Chemikalien, Kits und Geräte

In der folgenden Tabelle sind alle Chemikalien, Kits, Tiernahrung, Geräte und die verwendete Computersoftware aufgelistet, die im Rahmen dieser Promotion in Anspruch genommen wurden. Angegeben werden außerdem die Hersteller sowie Artikelidentifizierungsnummern:

Tabelle 1: Material- und Geräteliste.

Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte mit der zugehörigen Serien- bzw. Katalognummer sowie sonstigen Herstellerangaben.

Reagenzien	Hersteller	Identifizierung
Chemikalien		
TaqMan® <i>Universal Master Mix II</i>	ThermoFischer Scientific	Cat# 4440043
Chloroform <i>for analysis</i>	Merck	Cat# 1.02445
TRIzol™ LS Reagenz	ThermoFischer Scientific	Cat# 10296010
Tamoxifen	Sigma	Cat# T5648
HEPES	Sigma	Cat# H0887
Magnesiumchlorid	Millipore	Cat# 814733
Kaliumchlorid	Merck	Cat# P9541
NP-40	Millipore	Cat# 92016
Cycloheximid	Sigma	Cat# 01810
Sodium heparin		
Dithiothreitol (DTT)	Biomedicals	Cat#27565-41-9
RNasin	Promega	Cat#N2515
<i>Rabbit Polyclonal anti-GFP</i>	abcam	Cat# ab290
DMEM (1x)+ GlutaMax	gibco	Cat#31966-021
DNase	Roche	Cat# 04536282001
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	SIAL63689- 100ML-F
Kollagenase A	Roche	10103586001
EDTA	Sigma	Cat# 317810

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma	Cat# 05470
Aqua dest.	B.Braun	Cat# 0082479E
ETOH 96% p.a.	Merck	Cat# 1.00983
Formaldehyde Solution 37%	Sigma	Cat# 1.04002
CD146 (LSEC) <i>microbeads</i>	Milteny biotec	Cat# 130-092-007
Mannitol 15%	Bereitgestellt von topas	N/A
PBS	Gibco	Cat# 11503387
2-Propanol p.a.	Roth	Cat# 0080.1
<i>SolvableTM</i>	Perkin Elmer	Cat# 6NE9100
<i>Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche	Cat# COEDTAF-RO
<i>Pacific OrangeTM Succinimidyl Ester, Triethylammonium Salt</i>	ThermoFischer Scientific	Cat#P30253

Verwendete Kits

Protein G <i>Dynabeads</i>	ThermoFischer Scientific	Cat# 10003D
Invitrogen TM Quant-iT TM dsDNA Assay Kit	ThermoFischer Scientific	Cat# 10164582
Dneasy Micro Kit	QIAGEN	Cat# 69504
RNeasy Micro Kit	QIAGEN	Cat# 74004
NucleoSpin [®] RNA/Protein Kit	MACHEREY-NAGEL	Cat# 740933.50
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	ThermoFischer Scientific	Cat# 4374967

Maushaltung

<i>Chow Diet</i> Pelletform	Altromin	Cat# 1324
-----------------------------	----------	-----------

Geräte

QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System	ThermoFischer Scientific
T3 <i>Thermocycler</i>	BioMetra
<i>TissueLyzer</i>	Qiagen
Konfokales Mikroskop A1R	Nikon
TECAN Infinite [®] 200 Pro	TECAN
gentleMACS TM <i>Dissociator</i>	Milteny biotec
MACS [®] Multistand	Milteny biotec
Nanophotometer	Implen
Heraeus Megafuge 16 R	ThermoFischer Scientific
Rotana TRC Zentrifuge	Hettich
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	ThermoFischer Scientific

Software

NIS-Elements AR <i>software</i>	Nikon
---------------------------------	-------

2.2 Haltung und Beschreibung der verwendeten Materialien

2.2.1 Zucht und Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in der UKE-Forschungstierhaltung gezüchtet und gehalten. Alle Tiere wurden bei einer konstanten Temperatur von 22° Celsius mit einem Hell-Dunkel Rhythmus von zwölf Stunden gehalten. Alle Mäuse erhielten die „Chow-Diät“ in Pelletform, deren metabolisierbare Energie aus 11 % Fett, 24 % Protein und 65 % Kohlenhydraten besteht. Zusätzlich enthält diese Diät u.a. Ballaststoffe, Rohasche, Mineralien und Vitamine (genaue Zusammensetzung siehe <https://altromin.com/products/standarddiets/rats/1320>) bestand. Den Mäusen stand durchgehend Wasser zur Verfügung.

2.2.2 Beschreibung der verwendeten Mauslinien

Um den Rezeptor, der für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln in LSECs verantwortlich ist, zu untersuchen, wurde mit mehreren Mauslinien gearbeitet. Es wurden CD36-Knockout Mäuse sowie Stabilin-1 und Stabilin-2 Knockout- Mäuse verwendet. Diese drei Mauslinien wiesen den Rezeptor-Knockout systemisch, also auf jeder Zelle, auf. Zur Untersuchung der Relevanz des SR-B1 Rezeptors wurde mit dem sogenannten EndoSRB1- Knockout-Mausmodell gearbeitet. Diese Mäuse weisen einen Endothel-spezifischen SR-B1-Knockout auf, der durch Verwendung eines Cre/loxP-Systems unter Einfluss eines VECdh5-Promoters erzeugt wird (SR-B1-flox VECdh5-cre ERT). Die Cre/loxP-Rekombination wird erst nach Gabe von Tamoxifen induziert. Der Genotyp wurde für jede Maus aus einer Schwanzprobe mittels quantitativer *realtime*-PCR (siehe Kapitel 2.6) nachgewiesen.

2.2.3 Nachweis der GFP-Färbung in NuTRAP-VECad-CreERT2 Mäusen

Zur Untersuchung der endothelialen mRNA der Leber-sinusoidalen Endothelzellen wurden die endothelialen Ribosomen aus Lebergewebe von NuTRAP-VECad-CreERT2- Mäusen isoliert.

Die NuTRAP- (*Nuclear tagging and ribosome affinity purification*) Mauslinie ermöglicht durch eine Kombination der TRAP- (*translating ribosome affinity purification*) und der INTACT-Methode (*isolation of nuclei tagged in specific cell types*) die Isolation von Ribosomen sowie Zellkernen eines spezifischen Zelltyps. Im NuTRAP-Mausmodell wird ein fluoreszierendes GFP-Molekül an ein Ribosom eines spezifischen Zelltyps gekoppelt. Durch nachfolgende Immunpräzipitation können so Ribosome eines spezifischen Zelltyps isoliert werden.

Durch Kreuzung der NuTRAP-Mauslinie mit einer endothelspezifischen Cre-Linie (VECad), wobei die Cre-Rekombinase Aktivität aufgrund der Fusion mit dem ERT2-Rezeptor durch Tamoxifengabe induzierbar ist, kann auch die GFP-Produktion spezifisch in Endothelzellen der Maus durch Tamoxifengabe induziert werden. So werden durch die Isolation von Ribosomen aus Lebergewebe mittels TRAP-Immunpräzipitation hauptsächlich die Ribosomen aus den endothelbildenden Leber- sinusoidalen Endothelzellen extrahiert.

2.2.4 Nachweis der GFP-markierten Ribosomen der NuTRAP-VECad-CreERT2- Tiere

Um die GFP-markierten Ribosomen in der Leber der NuTRAP-Tiere nachzuweisen, wurde die Produktion des GFPs durch dreimalige Tamoxifengabe (7, 2 und 1 Tag vor Organentnahme) induziert. Die Mäuse erhielten pro Gabe je 0,2 mg Tamoxifen gelöst in 100 µL Sonnenblumenöl per Gavage. Am Tag der Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, Leber und inguinale weißes Fettgewebe wurden herausgenommen und in 4% PFA in PBS fixiert. Die GFP-Fluoreszenz wurden mit einem Konfokalmikroskop mit Resonanzscanner (NikonAR1®) dargestellt. Hierbei wurde das Gewebe mit 475nm angeregt, das *Excitation*maximum des GFP liegt bei 509nm.

2.3 Beschreibung der verwendeten Nanopartikel

In den Versuchen wurden Nanopartikel, bereitgestellt von der Firma topas therapeutics GmbH®, genutzt. Diese Partikel wurden auch von Carambia et al. für die erwähnten Arbeiten aus dem Jahr 2015 und 2021 eingesetzt. Die verwendeten Nanopartikel sind kleine Partikel, umhüllt mit einem amphiphilen hydrophilen Polymer, dem sogenannten PMAOD (poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)). Eine genaue Beschreibung des amphiphilen Polymers sowie die Anleitung zur Herstellung der PMAOD-Umhüllung beschreibt Shtykowa et al. in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2008. (Shtykova et al. 2008) Die genutzten Nanopartikel besaßen alle eine identische Umhüllung. Es wurden zwei unterschiedliche Arten von Nanopartikel-Kernen genutzt. Für die Untersuchung der Aufnahme der Partikel in die unterschiedlichen Knockout-Mauslinien wurde mit sogenannten QuantumDots, umhüllt mit dem PMAOD-Polymer, gearbeitet. Diese Partikel weisen fluoreszierende Eigenschaften auf und wurden in der Vergangenheit genutzt, um die Verteilung von Stoffwechselprodukten im Körper zu untersuchen. (Bargheer et

al. 2015) Die hier genutzten QuantumDots wurden mittels Fluoreszenzmessgerät bei 488 nm angeregt, die Fluoreszenz wurde dann bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

Für die weiteren Experimente wurden sogenannte SPIOs verwendet: SPIOs (*Super paramagnetic iron oxide nanoparticles*) weisen magnetische Qualitäten auf und können mittels Magnetresonanzmessung im Körper detektiert werden. Die von der Firma *topas therapeutics GmbH*[®] produzierten PMAOD-umhüllten SPIOs werden im Folgenden PMAOD-Nanopartikel genannt. Zur Peptidbeladung wurde an die mit PMAOD-umhüllten SPIOs das OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid (OVA I) gekoppelt; diese so Peptid-gekoppelten Partikel werden im Folgenden OVA-PMAOD-Nanopartikel genannt. Im Folgenden wird die Abkürzung „NP“ in mehreren Abbildungen für das Wort Nanopartikel verwendet.

Alle Partikel wurden von der Firma *topas therapeutics GmbH*[®] hergestellt und für die Versuche bereitgestellt. Die Lagerung überschritt niemals 7 Tage, und die Partikel wurden durchgängig bei 4°C gelagert. Um die Fluoreszenz in LSECs nach Nanopartikel-Aufnahme zu messen, wurden den Tieren je 100 µl QuantumDots (2,5 mg/ml) intravenös injiziert, die stets in PBS verdünnt wurden. Für die verwendeten PMAOD-Nanopartikel und OVA-PMAOD-Nanopartikel wurden ebenfalls je 100 µl einer 2,5 mg/ml -Lösung intravenös injiziert. Als Puffer wurde für diese Partikel eine 15-prozentige Mannitol-Lösung genutzt, die ebenfalls von *topas therapeutics GmbH*[®] produziert wurde. Tabelle 2 listet alle verwendeten Partikel mit den zugehörigen Konzentrationen der Injektionen auf:

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Nanopartikel.

Die genannten Nanopartikel wurden im Rahmen dieser Promotion in unterschiedlichen Versuchen appliziert. Zur Injektion wurde jeweils die angegebene Partikel- sowie Peptidkonzentration genutzt. Alle Partikel wurden von der Firma *topas therapeutics GmbH*[®] hergestellt und mit PMAOD ummantelt.

Partikelbezeichnung	Umhüllung	Trägermedium	Partikel-konzentration	Peptid-konzentration
QuantumDots (ungekoppelte QuantumDots)	PMAOD	PBS	2,5 mg/ml	
PMAOD-NP (ungekoppelte SPIOs)	PMAOD	Mannitol 15%	2,5 mg/ml	
OVA-PMAOD-NP (SPIO-OVA I)	PMAOD	Mannitol 15%	2,5 mg/ml	0,32 mg/ml

2.4 Fluoreszenz Messung in LSECs

Um die QuantumDot-Fluoreszenz in LSECs zu messen, wurden den Tieren die Partikel injiziert und nach Versuchsschema die Partikel-Eigenfluoreszenz in Lebersinuosidalen Endothelzellen mittels TECAN® Fluoreszenz-Messgerät abgelesen. Im Folgenden wird der genaue Versuchsablauf beschrieben.

2.4.1 Nanopartikelinjektion und Inkubation

Den Tieren wurden die vorbereiteten Partikel sechzig Minuten vor der Organentnahme intravenös injiziert. Die Partikel wurden direkt vor der Injektion in PBS verdünnt und durch einen 0,22 µm Filter gefiltert. Jedes Tier erhielt eine Dosis von 2,5 mg QuantumDots, gelöst in 100 µl PBS.

2.4.2 Organentnahme

Nach sechzig Minuten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte die Perfusion der Leber über die Pfortader mit 37°C warmen Lysepuffer. Für den Lysepuffer wurden 37,5 ml DMEM (1x)+ GlutaMax mit 3,75 mg DNase und 26,25 mg Kollagenase versetzt. Nach der Perfusion wurde die Leber herausgenommen und nach Entfernung der Gallenblase mit frischem PBS gespült. Danach erfolgte die Gewebezerkleinerung mit dem gentleMACS-*Dissociator*. Jede Leber wurde in ein C-*Tube*, gefüllt mit 4,4 ml Lyse-Puffer und bei 37°C warmgestellt, überführt. Danach wurde das Leber-Zerkleinerungs-Programm 1 (m_liver_01.02) mit dem gentleMACS-*Dissociator* durchgeführt. Der Gewebeextrakt wurde anschließend unter Rotation und bei 37°C für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Leber-Zerkleinerungs-Programm 2 (m_liver_02.02) mittels gentleMACS-*Dissociator* durchgeführt. Alle weiteren Untersuchungsschritte wurden nun auf Eis gekühlt durchgeführt.

2.4.3 Zellseparation

Um aus dem Gewebeextrakt eine Einzelzellsuspension herzustellen, erfolgte zuerst eine doppelte Filterung: Der Gewebeextrakt wurde durch ein Zellsieb der Größe 100 µm gefiltert und anschließend noch einmal durch ein Zellsieb der Größe 40 µm. Für die weiteren Schritte wurde mit eiskühlem MACS-Puffer gearbeitet (0,5 % BSA und 2mM EDTA in PBS).

Um restliche Zellen aufzufangen, wurde das *C-Tube* noch einmal mit 5 ml MACS-Puffer gespült und wiederum gefiltert; auch die Siebe wurden mit 10 ml MACS-Puffer gespült. Die gefilterten Zellsuspensionen wurden in 50ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die Zellsuspensionen wurden mit MACS-Puffer auf 30 ml aufgefüllt und in einer 4°C kühlen Zentrifuge bei 17 g für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt, im überbleibenden Pellet wurden die Hepatozyten erwartet. Das Hepatozyten-Pellet wurde in 400 ml MACS-Puffer resuspendiert und für weitere Untersuchungsschritte auf Eis gelagert.

2.4.4 Isolation CD146-positiver Zellen mittels MACS

Für die Isolation der CD146-positiven Zellen aus der Leberzellsuspension wurde das *Magnetic activated cell sorting*[®] der Firma Milteny Biotec mit abgewandeltem Protokoll durchgeführt:

Die MACS-Säulen wurden mit 3 ml MACS-Puffer angefeuchtet. Der Überstand aus 2.4.3 wurde noch einmal durch ein 30 µm-Zellsieb gefiltert. Nach der Filterung wurde die Zellsuspension mittels Zentrifugation pelletiert (800 g, 7 min). Im Anschluss an die Pelletierung wurde der Überstand abgesaugt und das Volumen des Pellets bestimmt. Die magnetischen CD146 (LSEC) *microbeads* wurden im Verhältnis von 1:9 zum Pellet hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. Danach erfolgte eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis.

Nach der der Inkubation erfolgte eine Waschung um ungebundene *microBeads* von der Zellsuspension zu trennen. Hierfür wurden die Pellets mit 1 ml MACS-Puffer verdünnt und bei 800 g für 7 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgte das Absaugen des Überstands, das Zellpellet wurde noch einmal in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Unter die MACS-Säulen wurden 25 ml Reaktionsgefäße zum Auffangen des sogenannten *Flow-through* gestellt. Die Zellsuspension wurde durch die MACS-Säulen geleitet, danach wurden die Säulen dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült. In der aufgefangenen Lösung, dem *Flow-through* wurden die CD146-negativen Zellen erwartet.

Zur Ablösung der CD146-positiven Zellen von den MACS-Säulen wurde die Säule von dem Magnet entfernt und die Zellen mit 5 ml MACS-Puffer aus der Säule in ein neues Reaktionsgefäß gespritzt. Beide Zellsuspensionen, der *Flow-through* und die CD146-positive Fraktion, wurden dann bei 800 g für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und in neue Reaktionsgefäße überführt.

2.4.5 Fluoreszenzmessung im TECAN-Fluoreszenzreader

Für die Fluoreszenzmessung in den Zellfraktionen wurden je 50 µl der Zellsuspensionen (Hepatozyten-Fraktion, *Flow-through* und CD146-positive Fraktion) in einen *well* einer 96-*well* Platte überführt. Nach Entfernung aller Luftblasen wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals mittels TECAN®-Reader ermittelt. Die Partikel wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm (Excitationmaximum) angeregt, die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

2.4.6 DNA-Präparation

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung in den Zellfraktionen wurde das DNA Isolations-Kit DNeasy® der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt: 100 µl der Zellsuspensionen wurde bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Es wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl des im Kit enthaltenen *AL-Buffers* hinzugegeben, danach wurde die Mischung durch Vortexen gut gemischt. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 56°C, rotierend.

Im Anschluss wurde der Suspension 200 µl 96% Ethanol p.a. hinzugefügt. Die Suspension wurde in die DNeasy *spin columns* überführt, welche in einem 2 ml Reaktionsgefäß steckten. Die *spin columns* wurden bei >6000 g für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der *Flow-through*, aufgefangen in 2 ml Reaktionsgefäßen, wurde verworfen. Es erfolgte ein zweizeitiges Waschen, zuerst mit 500 µl des im Kit enthaltenen *AW1-Buffers* (20.000 g für 3 Minuten und Raumtemperatur), danach mit 500 µl des im Kit enthaltenen *AW2-Buffers* (20.000 g für 3 Minuten und Raumtemperatur).

Nach dem Waschen wurden die *spin columns* in frische Reaktionsgefäße überführt. In die *spin columns* wurden nun 200 µl des mitgelieferten *AE-Buffer* hinzugefügt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei >6000 g für 1 Minute. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte dann mittels TECAN®-Fluoreszenzreader.

2.4.7 DNA-Konzentrationsmessung

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Quant-iT™ dsDNA *Broad-Range Assay Kit* verwendet. Das Quant-iT™ dsDNA BR-Reagenz wurde im Quant-iT dsDNA-Puffer 1:200 verdünnt. Für jede zu messende Probe wurden 200 µl dieses

Reagenz in ein Nöpfchen einer schwarzen 96-well Platte pipettiert. Anschließend wurde eine Standardreihe mit je 10 µl der im Kit befindlichen DNA-Standard Lösungen (0,5 ng/µL, 10 ng/µL, 20 ng/µL, 40 ng/µL, 60 ng/µL, 80 ng/µL und 100 ng/µL) in den ersten wells der Platte erstellt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden dann je 10 µl der isolierten DNA-Proben in die Wells pipettiert. Nach vorsichtigem Mixen wurde die Fluoreszenz mit den Standard-Fluorescein-Wellenlängen des Multireaders ermittelt und anhand dieser die DNA-Konzentration der Proben mithilfe der Standardgeraden berechnet.

2.4.8 Berechnung der Fluoreszenz

Nach Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität sowie der DNA-Konzentration in den Zellfraktionen wurde die Fluoreszenz-Intensität pro $0,1 \cdot 10^6$ Zellen berechnet. Hierfür wurde zuerst die Gesamtmenge an DNA in ng pro well bestimmt; unter der Annahme, dass jede Zelle 6 pg DNA besitzt, konnte so auf die Menge der Zellen im well rückgeschlossen werden. Mit der Zellmenge pro Well wurde zunächst die Fluoreszenz-Intensität pro Zelle, und anschließend pro $0,1 \cdot 10^6$ Zellen bestimmt. Um mehrere Versuchsdurchläufe miteinander vergleichen zu können, wurde die Fluoreszenz-Intensität der knockout Gruppen in einigen Versuchen auf die mittlere Fluoreszenz-Intensität der wildtyp-Mäuse normalisiert.

In den in Kapitel 3.2 beschriebenen Versuchen wurde dieser Methode genutzt, um die Nanopartikelaufnahme zwischen zwei Gruppen zu vergleichen. Abb. 4 stellt den Versuchsaufbau schematisch dar. Die Fluoreszenz pro $0,1 \cdot 10^6$ Zellen wurde zwischen Wildtyp- (Kontrolle) und Knockout-Gruppe verglichen, so konnte die Auswirkung eines Rezeptor-Knockouts auf die Nanopartikelaufnahme in LSECs quantitativ untersucht werden.

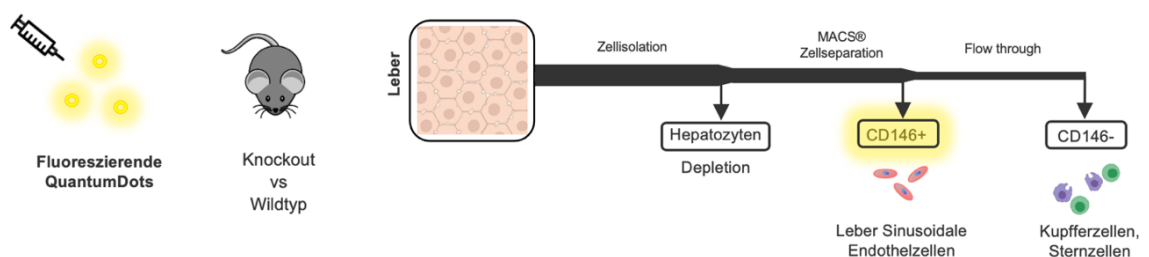


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der LSEC-Fluoreszenzmessung

Nach Injektion von je 100 µl QuantumDots wurden LSECs mittels MACS isoliert. Die Fluoreszenz der injizierten QuantumDots wurde in den LSEC-Zellfraktionen gemessen und zwischen Knockout- und wildtyp-Gruppe verglichen.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Zellfärbung

Nach Herstellung einer Lebereinzelsuspension (siehe 2.4.3) wurden Zellen mit Antikörpern beladen, um mittels Durchflusszytometrie die Fluoreszenz-Intensität in unterschiedlichen Zellpopulationen zu messen. Die folgende Tabelle listet die verwendeten Antikörper auf:

Tabelle 3: Auflistung der FACS-Antikörper.

Die gelisteten Antikörper wurden genutzt, um die Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie anzufärben. Angegeben ist neben dem Hersteller auch die Serien-Identifikationsnummer der einzelnen Antikörper.

Antikörper	Firma	Identifikation
CD146	Biolegend	Serial# 134713
CD45	Biolegend	Serial# 103128
F4/80	Biolegend	Serial# 123151
Ly6G	Biolegend	Serial# 127627
CD11b	Biolegend	Serial# 101212
CD11c	BD Bioscience	Serial# 553801
MHCII	BD Bioscience	Serial# 553552

Für die Messung wurden von jeder Einzelsuspension $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Zur Identifikation aller lebenden Zellen wurde der *Pacific-Orange* Farbstoff verwendet; dieser Farbstoff wurde in einer Verdünnung von 1:1000 den Zellen hinzugefügt. Die weiteren Antikörper wurden in den vom Hersteller empfohlenen Mengen zu den Proben hinzugefügt. Die Zellen wurden im Anschluss 20 Minuten lichtgeschützt und bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen. Hierfür wurden die Proben mit 1 ml PBS verdünnt und für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert, danach wurde der Überstand abgesaugt. Zum Fixieren der Zellen wurden diese dann in 4 % PFA in PBS für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift nach gleichem Prinzip.

2.5.2 Gating-Strategie

Die Durchführung der Durchflusszytometrie wurde von Cornelia Gottwick aus der Arbeitsgruppe von Dr. Johannes Herkel und Dr. Antonella Carambia aus der 1. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf übernommen. Die *Gating*-Strategie wurde aus dem Paper von Yu et al. aus dem Jahr 2019 übernommen. (Yu et al. 2019) Die anschließende Datenauswertung sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte mit GraphPadPrism9®.

2.6 Molekularbiologische Analyse

Für die Analyse der Genexpression in den Proben wurde die RNA aus den Zellfraktionen isoliert, diese wurde danach mittels Polymerasekettenreaktion in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte mittels TaqMan®-basierter quantitativer *realtime*-PCR die Messung der Expressionshöhe unterschiedlicher Marker.

2.6.1 RNA-Extraktion und Quantifizierung

Für die RNA-Präparation wurden 200 µl der CD146-positiven und CD146-negativen Zellfraktion und 100 µl der Hepatozyten-Zellfraktion mit 100 ml Trizol (TRIzolTM® Reagenz) versetzt. Bei Verwendung von Lebergewebe wurde ein reiskorngroßes Stück Leber ebenfalls mit 1000 µl Trizol versetzt. Die Lösungen wurden danach dreimal für drei Minuten im *Tissue Lyzer* lysiert. 300 µl Chloroform wurden hinzugegeben, die Proben wurden für 15 Sekunden gevortext und anschließend bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die bei der Zentrifugation entstandene wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Hinzugabe von 600 µl 70% Ethanol p.a. und vorsichtigem Mischen wurden die Lösungen in die im Kit enthaltenden NucleoSpin® RNA/Protein-Säulen gegeben. Die RNA-Präparation erfolgte mit dem Kit von Machery-Nagel nach verändertem Protokoll. Die Säulen wurden für 2 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. 350 µl MDB-Puffer aus dem Kit wurde auf die Säulen gegeben, danach erfolgte eine doppelte Zentrifugation (2 min, 13.000 rpm, Raumtemperatur), um die Membranen der Säulen vollständig zu trocknen. Um die im Kit enthaltende rDNase anzusetzen, wurden pro Probe 10µl rDNase mit 90µl *Reaction*-Puffer gemischt, davon wurde je 85 µl auf die Membranen gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten mehrere Waschschrte. 200 µl des im Kit enthaltenden RA2-Puffers wurde hinzugegeben und zentrifugiert (2 min, 13.000 rpm, Raumtemperatur). Nach Ausleerung des Unterteils erfolgte die Hinzugabe von 600 µl RA3 Puffer aus dem Kit und erneute Zentrifugation (2 min, 13.000rpm, Raumtemperatur). Danach wurden erneut 250 µl RA3-Puffer auf die Säulen gegeben, es erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten.

Zur Elution der RNA wurden die Säulen in ein Reaktionsgefäß gesetzt, auf die Membran wurden 20 µl RNase freies Wasser für die Zellfraktionen und 50 µl RNase-freies Wasser für die Leberwegebestücke hinzugegeben. Es erfolgte eine

1-minütige Inkubation mit anschließend 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Das RNase-freie Wasser, welches sich dann im Reaktionsgefäß befand, wurde erneut auf die Membran pipettiert und für weitere 10 Minuten inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, Raumtemperatur) wurde die Konzentration der RNA in den Proben mittels NanoDrop gemessen.

2.6.2 Synthese von cDNA

Die isolierte RNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion in cDNA umgeschrieben. Bei der aus Lebergewebe isolierten RNA sowie der Hepatozyten-Fraktion und der CD146-negativen Fraktion wurden je 400 µg cDNA umgeschrieben. Für die mittels TRAP-IP-isolierte mRNA sowie für die RNA aus der CD146-positiven Fraktion wurden jeweils 125 µg cDNA umgeschrieben.

Die RNA-Proben wurden verdünnt, und die entsprechende Menge an RNA für die gewünschte Menge an cDNA wurde in PCR-Röhrchen pipettiert. Es wurden 10 µl eines *Mastermix* (*Reverse Transcription Buffer*, dNTPs Mix, *Random Primers*, MultiScribe *Reverse Transcriptase* 50 U/µL, *Rnase Inhibitor* 20 U/µL) hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation von je 20 µL Reaktionsvolumen im T3 *Thermocycler*[®] (Biometra) nach dem in Tabelle 4 aufgeführten Protokoll.

Tabelle 4: Syntheseprotokoll der cDNA im *Thermocycler*

Zeit	Temperatur
10 Minuten	25°C
120 Minuten	37°C
5 Sekunden	85°C
	4°C

2.6.3 Quantitative TaqMan[®] *RealTime*-PCR

Um die mRNA-Transkripte in den Proben zu quantifizieren, wurde quantitative *realtime*-PCR mittels TaqMan qRT-PCR durchgeführt. Die cDNA wurde mit RNase freiem Wasser verdünnt (125 ng cDNA mit 80 µl im Verhältnis 1:5, 400 ng cDNA mit 220 µl im Verhältnis 1:12). Anschließend wurden pro Probe und zu messendem Gen je 4 µl der cDNA in einen *well* einer 96-*well* Platte gefüllt.

Zur Herstellung des für jedes zu messende Gen individuellen Mastermix wurde je 0,5 µl RNase freies Wasser, 0,5 µl des jeweiligen Taqman[®]-*Gene Expression Assay on Demand* mit 5 µl des TaqManUniversal Master Mix II[®] (ThermoFischer

Scientific) pro *well* angesetzt. Alle verwendeten Assays stammen vom Hersteller ThermoFischer Scientific.

Tabelle 5 listet alle zu messenden Gene und die entsprechenden *Assay-on-demand*-Kennzeichnungen auf.

Tabelle 5: Auflistung der untersuchten Gene

Assay on Demand	Kennzeichnung
tbp	Mm00446973_m1
36b4	Mm01974474_gH
Stabilin-1	Mm00460390_m1
Stabilin-2	Mm00454684_m1
PECAM-1	Mm01242584_m1
CXCL 9	Mm00434946_m1
CXCL 10	Mm00445235_m1
CXCL 16	Mm00469712_m1
MCAM	Mm00522397_m1
EMR-1	Mm00802530_m1
CD69	Mm01183378_m1
Il1rn	Mm00446186_m1
CD68	Mm03047343_m1
MSR-1	Mm00446214_m1
CD36	Mm00432403_m1
MRC-1	Mm01329362_m1
ITGAM-1	Mm00434455_m1
SR-B1	Mm00450234_m1
APOA1	Mm00437568_g1
APOB	Mm01545159_m1
Fgl-1	Mm01198706_m1
Ptger4	Mm00436053_m1
Sfrp5	Mm00490044_m1
CCL 2	Mm00441242_m1
CCL 3	Mm00441259_g1
CCL 4	Mm00443111_m1
CCL 5	Mm01302428_m1
CCL 7	Mm00443113_m1

Nach Hinzugabe von 6 µl Mastermix pro *well* wurde die Platte 2 Minute bei 800 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die TaqMan qRT-PCR wurde im QuantStudio 5 *Real-Time-PCR-System*[®] (ThermoFischer Scientific) durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Genexpression in den Proben wurde für jedes Experiment auch die Expression der *housekeeping*-Gene *tbp* und *36b4* gemessen. Die Normalisierung der Genexpression der Zielgene im Vergleich zu den *housekeeping* Genen erfolgte nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode.

2.7 RNA-Isolation nach dem NuTRAP-Verfahren

Zur Isolation der endothelialen mRNA wurde zuerst die GFP-Produktion in den NuTRAP-VECad-CreERT2-Tieren induziert. Hierfür erhielten die Tiere drei Dosen 0.2 mg Tamoxifen gelöst in 100 µL Sonnenblumenöl 7, 2 und 1 Tag vor der Organentnahme per Gavage.

2.7.1 Isolation GFP-markierter Ribosomen

Zur Isolation der mit GFP-markierten Ribosomen wurde die TRAP-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden je drei Puffer jeweils frisch in kleinen Mengen hergestellt. Die Zusammensetzung der Puffer wird in der folgenden Tabelle 6 dargestellt:

Tabelle 6: Zusammensetzung der TRAP-IP Pufferlösungen

	IP-Puffer	Low salt- Puffer	High salt- Puffer
	pH 7,5	pH 7,5	pH 7,5
HEPES	20 mM	20 mM	20 mM
MgCl ₂	15 mM	15 mM	15 mM
KCl	150 mM	150 mM	350 mM
NP-40	1%	1%	1%
Cycloheximid	100 µm/ml	100 µm/ml	100 µm/ml
DTT	1 mM	1 mM	1 mM
Sodium heparin	1 mg/ml	-	-
RNasin	0,2 units/µm	-	-
<i>Complete</i>	1 tablet	-	-
<i>EDTA-free</i>			
<i>protease inhibitor</i>			

Für jede RNA-Isolation wurde ein Leberstück mit einem Gewicht von 50-100 mg verwendet.

Die NuTRAP-Tiere wurden am Tag der Organentnahme mittels cervikaler Dislokation getötet, die Lebern wurden entnommen, mit PBS gespült und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das gefrorene Lebergewebe wurde dann in 1 ml IP-Puffer in einem *Dounce Homogenisator* zerkleinert. Die zerkleinerten Gewebemischungen wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert und 15

Minuten auf Eis inkubiert. In der Inkubationszeit erfolgte jede 5 Minuten eine Durchmischung der Proben mittels Vortex.

Nach der Inkubation wurden die Proben bei 13.000 g für 10 Minuten zentrifugiert, hierdurch erfolgt eine Auftrennung der Mischung in ein Pellet, ein Überstand und eine Fettschicht auf der Oberfläche. Die obere Fettschicht wurde vorsichtig abpipettiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Der Überstand wurde dann mit 1,5 µl anti-GFP (ab290) versetzt. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Proben, bei 4 Grad C° unter ständiger Rotation.

Pro Probe wurden 50 µl Protein G *Dynabeads* benutzt, diese wurden zweimal mit dem *LowSalt*-Puffer gewaschen. Hierfür wurden 50 µl der *Dynabeads* mit 1 ml *LowSalt*-Puffer gemischt und anschließend in einen Magnetständer überführt. Nach einigen Sekunden wurde der Puffer abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt, danach wurden die *Dynabeads* in 50µl *low Salt*-Puffer resuspendiert. Die *Dynabeads* wurden anschließend zu den Proben pipettiert und durch Invertieren gemischt. Es erfolgte eine weitere 30-minütige Inkubation bei 4 Grad °C unter ständiger Rotation.

Nach der Inkubation wurden die nicht gebundenen *Dynabeads* mit einem weiteren Waschschrift entfernt. Hierfür wurden die Lösungen mit 1 ml *HighSalt*-Puffer versetzt und in einen Magnetständer gesetzt. Nach kurzem Abwarten wurde der Puffer abgesaugt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die *Dynabeads* im Reaktionsgefäß belassen.

2.7.2 RNA-Extraktion

Nach der Präzipitation der Ribosomen wurde im nächsten Schritt die mRNA aus den Ribosomen präpariert. Hierfür wurde das Qiagen *Micro RNeasy extraction Kit* genutzt. Zur Entfernung der *Dynabeads* von den Ribosomen wurde pro Probe 350 µl des im Kit enthaltenden RLT-Puffer mit beta-Mercaptoethanol im Verhältnis 10µl beta-Mercaptoethanol : 1 ml RLT-Puffer vermengt. Die Proben wurden zur Durchmischung für 30 Sekunden gevortext, danach wurden die Proben wieder in einen Magnetständer gestellt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl 70% Ethanol p.a. versetzt. Die Proben wurden in die im Kit enthaltenden RNeasy MinElute *Columns* überführt und bei 8000G für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 350 µl des RW1-Puffers aus dem Kit in das Column gefüllt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 8000 g für 30 Sekunden, der Durchfluss wurde abermals verworfen.

Es wurden pro Probe 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer aus dem Kit gemischt und in die *SpinCollums* pipettiert. Anschließend wurden die Proben erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 350 µl RW1-Puffer in die *SpinCollums* pipettiert und die Proben bei 8000 g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die *Collums* wurden in neue Reaktionsgefäße transferiert, es wurden 500 µl RPE-Puffer in die *Columns* pipettiert und die *Tubes* erneut bei 8000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Wiederum wurden die *Columns* in frische Reaktionsgefäße überführt und mit geöffnetem Deckel bei 13000 g für 5 Minuten trocken zentrifugiert. Anschließend wurden die *Columns* dann in die endgültigen Reaktionsgefäße überführt, 10-20 µl destilliertes Wasser wurde in jedes *Column* pipettiert und für 1-5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 g bei Raumtemperatur. Im Durchfluss wurde nun die isolierte mRNA erwartet.

Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop® gemessen, für die RNA-Sequenzierung wurden je 10 ng der isolierten RNA verwendet, für die quantitative *Real-Time-PCR* mittels TaqMan® wurde die isolierte RNA zu cDNA umgeschrieben.

2.8 Statistik

2.8.1 Beschreibende Statistik

Zur ersten Analyse der Daten wurden Mittelwert ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) berechnet. Um die unterschiedlichen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurden die mittels quantitativer *Real-Time PCR* ermittelten Kopienanzahl der Gene auf die *housekeeping*-Gene *tbp* oder *36b4* normiert. Zur Darstellung der relativen Expressionsunterschiede, der sogenannten *fold-change* wurde für jeden gemessenen Marker die mittlere Expressionshöhen der behandelten Gruppen auf die mittlere Expressionshöhe der Kontrollgruppe normiert. Alle Daten sind folglich als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt, eine Ausnahme bilden die Grafiken, die den *fold-change* abbilden.

2.8.2 Inferenzstatistik

Die statistische Signifikanz wurde grundsätzlich mittels *Student's t-Test* berechnet. Eine Ausnahme bilden die Daten des Kapitels 3.2.2.1, hier wurde die statistische Signifikanz mit einem *2way-ANOVA (analysis of variance)* berechnet. Alle Tests wurden mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt. Bei $0.05 \leq p \leq 0.1$ wurde von einem Trend gesprochen. Gruppen, die mit einem doppelten Stern

gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant mit einem $p \leq 0,01$ von anderen Gruppen in den Versuchen. Gruppen, die mit einem einfachen Stern gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant mit einem $p \leq 0,05$ von anderen Gruppen in den Versuchen. Statistische Analysen wurden mit Microsoft Excel® und GraphPadPrism9® durchgeführt.

3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel stellt die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit durchgeführten Versuche dar. Zunächst wird der Isolationsprozess der Lebersinuosidalen Endothelzellen beschrieben und dargestellt. Im ersten Teil dieses Kapitels werden dann mehrere Versuche mit unterschiedlichen Knockout-Mausmodellen aufgeführt, die zum Ziel hatten, den Rezeptor, der für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln verantwortlich ist, zu identifizieren. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden durch die Sequenzierung endothelialer mRNA die intrazellulären Prozesse in LSECs ersichtlich gemacht. Des Weiteren wird die Relevanz des Injektionszeitpunkts der Peptid-gekoppelten Nanopartikel analysiert. Im letzten Teil dieser Arbeit wird in Anbetracht der Ergebnisse die Notwendigkeit des Stabilin-2 Rezeptors für die Etablierung LSEC-induzierter Immuntoleranz beurteilt.

3.1 Expressionsanalyse isolierter CD146-positiver Leberzellen

Um den spezifischen Aufnahmemechanismus und den dafür notwendigen Rezeptor für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln in LSECs zu untersuchen, wurde zuerst eine Methode etabliert, die LSECs mit einer hohen Spezifität aus Mauslebern isoliert. Hierfür stellte sich das *Magnetic activated cell sorting* mit CD146-magnetic beads als geeignetes Verfahren heraus. Der Marker CD146 (MCAM) markiert als Endothelzellmarker in der Leber hauptsächlich LSECs. (Strauss et al. 2017) Eine detaillierte Beschreibung des Isolationsverfahrens ist im Kapitel 2.4 vorzufinden.

Um zu bestimmen, welche Zellpopulationen sich in der CD146-positiven sowie CD146-negativen Fraktionen befinden, wurden beide Fraktionen mittels Genexpressionsanalyse auf ihr Rezeptorprofil untersucht. Hierfür wurde die RNA aus den Zellfraktionen isoliert und mittels TaqMan® qRT-PCR analysiert. Die Kopienzahl der Gene wurde durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet und auf das *housekeeping*-Gen 36b4 normiert. Abbildung 5 zeigt die Expressionsmuster in CD146-positiver und CD146-negativer Zellfraktion für unterschiedliche Markergene. Wichtige Marker für LSECs stellen die *Scavenger*-Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2 dar. In der CD146-positiven Fraktionen waren diese beiden Marker signifikant höher exprimiert als in der CD146-negativen Fraktion. Auch PECAM-1, ein Leukozytenadhäsionsmolekül, welches bekanntermaßen auf sinusoidalen

Endothelzellen exprimiert wird, war signifikant höher in der CD146-positiven Fraktion exprimiert. (Neubauer et al. 2000) Auch die Chemokine CXCL 10 und CXCL 16 waren in der CD146-positiven Fraktion im Gegensatz zu der CD146-negativen Fraktion signifikant erhöht.

Zusätzlich wurde die Expression mehrerer Leukozyten-spezifischer Markergene in den zwei Fraktionen untersucht. EMR-1, ein Makrophagen-spezifischer Rezeptor (Nguyen-Lefebvre and Horuzsko 2015) war in der CD146-negativen Fraktion signifikant höher exprimiert als in der CD146-positiven Fraktion. CD68 war zwar in der CD146-negativen Fraktion höher exprimiert, es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Fraktionen erreicht, sodass sich nur von einem Trend sprechen lässt. Es wurden ebenfalls Marker, die sowohl auf LSECs als auch auf Leukozyten exprimiert sind, auf ihre Expression in den Zellfraktionen untersucht. CD36 und MRC1 waren signifikant höher in der CD146-positiven Fraktion exprimiert. MSR-1 war im Gegensatz dazu in der CD146-negativen Fraktion höher als in der CD146-positiven Fraktion exprimiert.

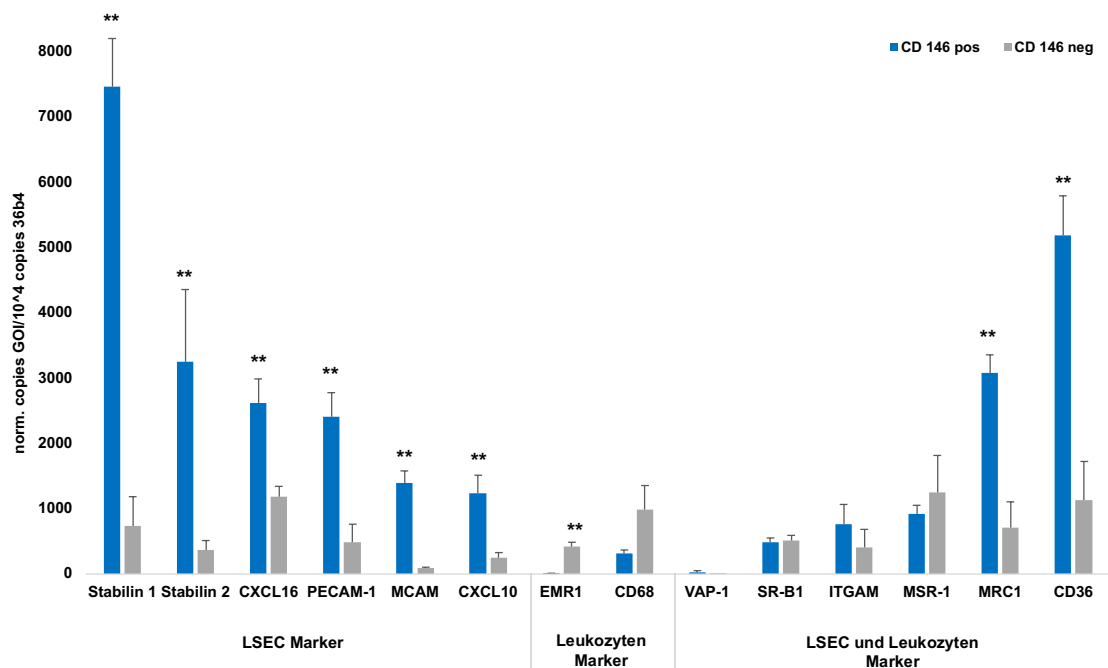


Abb. 5: Expressionsmuster relevanter Marker-Gene in CD146-pos. Zellfraktion und CD146-neg. Zellfraktion (n=6)

Die Leberzellen wurden mittels *Magnetic-activated cell-sorting* mit *CD146 magnetic-beads* in Fraktionen sortiert, die RNA wurde isoliert und die relevanten Gene wurden mittels TaqMan® qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind auf das *housekeeping* Gen *36b4* normalisiert.

Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

Zusammenfassend konnte somit eine Methode etabliert werden, mit der entsprechend der Genexpressionsprofile eine starke Anreicherung von LSECs erzielt wurde. Diese Technologie wurde genutzt, um die LSEC-spezifische Nanopartikel-Aufnahme zwischen verschiedenen Mausmodellen vergleichen zu können.

3.2 Analyse der Nanopartikelaufnahme in Rezeptor-Knockout Mausmodellen mittels Fluoreszenzmessung isolierter Leber Sinusoid Endothelzellen

Um den notwendigen Rezeptor für die Nanopartikelaufnahme zu identifizieren, wurde mit mehreren Knockout-Mausmodellen gearbeitet. Nach Analyse des Rezeptorprofils der CD146-positiven Fraktion wurden die *Scavenger*-Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2 als mögliche Kandidaten ausgewählt, da diese einerseits eine hohe Expressionsdichte auf den isolierten CD146-positiven Zellen aufweisen (siehe Abbildung 5), andererseits aus der Literatur bereits bekannt ist, dass diese Rezeptoren eine hohe Endozytose-Aktivität aufweisen. (Bhandari et al. 2021)

Auch die zwei Isoformen des HDL-Rezeptors, CD36 und SR-B1, wurden als mögliche Kandidaten für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln untersucht. Der HDL-Rezeptor wird nicht nur auf Hepatozyten, sondern auch auf LSECs in hoher Dichte exprimiert, wobei die Relevanz der LSEC-spezifischen Expression von SR-B in der Leber noch nicht vollständig erklärt ist. (Ganesan et al. 2016; Malerød et al. 2002) Die Bedeutung der Rezeptoren für die Nanopartikelaufnahme wurde mit den entsprechenden Knockout-Mausmodellen untersucht.

Es wurde vermutet, dass bei Fehlen des Rezeptors, der für die Aufnahme der Partikel notwendig ist, die Partikel nicht aufgenommen werden. Dies würde sich folglich in einer verminderten Intensität des Fluoreszenz-Signals, normiert auf $0,1 \times 10^6$ Zellen, zeigen. So kann durch die Messung und den Vergleich zwischen Wildtyp- und Knockout- Mäusen auf die Relevanz des zu untersuchenden Rezeptors rückgeschlossen werden.

3.2.1 Bedeutung des CD36-Oberflächenprotein für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln

Das Oberflächenprotein CD36, auch Thrombozytenglykoprotein 4 genannt, gehört zu der Gruppe der *Scavenger*-Rezeptoren und ist hoch exprimiert auf

Thrombozyten, Makrophagen, aber auch auf Endothelzellen nachzuweisen. (Strauss et al. 2017; Febbraio, Hajjar, and Silverstein 2001).

Die jeweilige Fluoreszenz-Intensität pro $0,1 \times 10^6$ Zellen der CD146-positiven Gruppe der Kontrollgruppe (Wildtyp-Mäuse) und der CD36 Knockout-Mäuse nach Injektion der PMAOD-umhüllten QuantumDots wurde miteinander verglichen. Die Fluoreszenz-Intensität der CD36 Knockout-Gruppe ist auf die Fluoreszenz-Intensität der Wildtyp-Kontrollgruppe normiert dargestellt, Abbildung 6 stellt die Fluoreszenz-Intensität im Gruppenvergleich dar.

In der CD36 Knockout-Gruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verringerte Fluoreszenz-Intensität in der LSEC-Zellfraktion ermittelt, jedoch ließ sich hier nur von einem Trend sprechen. Eine signifikante Reduktion der Nanopartikelaufnahme in CD146-positive Zellen wurde bei Fehlen von CD36 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe nicht beobachtet.

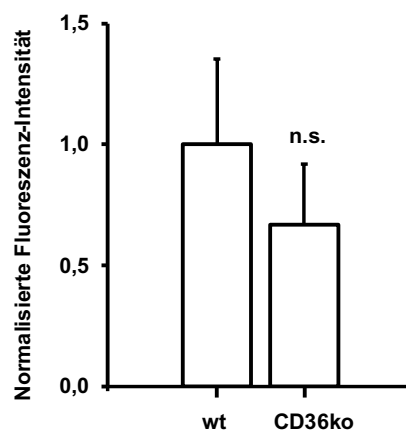


Abb. 6: Normalisierte QuantumDot-Fluoreszenz in CD146-pos. Fraktion von Wildtyp und CD36-Knockout Mäusen. (n=16)

Jeder Maus wurden 2,5 mg QuantumDots injiziert. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Lebern entnommen und die Zellen mittels MACS sortiert. Die Intensität des Fluoreszenz Signal in der CD146-pos. Fraktion wurde mittels TECAN®-Reader ermittelt. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

3.2.2 Bedeutung des SR-B1 Rezeptors für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln

SR-B1, eine Isoform des *Scavenger*-Rezeptors SR-B, vermittelt die Aufnahme von *high density lipoproteins* (HDL) in die Leber. Er wird in der Leber sowohl von Hepatozyten als auch in hohen Konzentrationen von sinusoidalen Endothelzellen exprimiert. (Ganesan et al. 2016) Um die Aufnahme von PMAOD-umhüllten QuantumDots bei fehlender SR-B1 Expression in LSECs zu untersuchen, wurde das EndoSRB1-Knockout-Mausmodell genutzt. Diese Mäuse weisen einen endothelspezifischen SR-B1 Knockout auf, der durch Verwendung eines Cre/loxP-

Systems unter Einfluss eines VECdh5-Promoters erzeugt wird (SR-B1-flox VECdh5-cre ERT).

In Abbildung 7 wird die die normalisierte Fluoreszenz-Intensität pro $0,1 \times 10^6$ Zellen von Kontrollgruppe (Cre-) und SR-B1-Knockout Gruppe (Cre+) nach intravenöser Applikation der QuantumDots dargestellt. Die Fluoreszenz-Intensität unterschied sich zwischen Kontrollgruppe (Cre-) und Knockout Gruppe (Cre+) nicht signifikant. In der Cre+ Gruppe wurde eine leichte Verringerung der Fluoreszenz-Intensität, und dementsprechend der Partikelaufnahme, beobachtet.

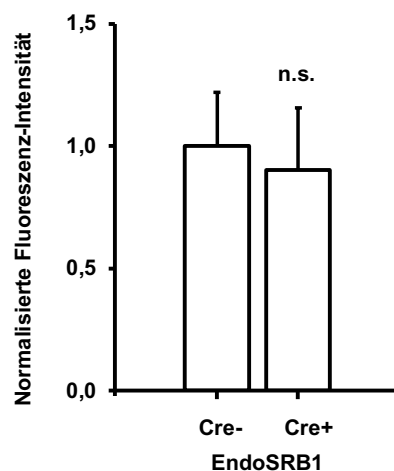


Abb. 7: Normalisierte QuantumDot-Fluoreszenz in CD146-pos. Fraktion von Kontroll-Mäusen (Cre-) und EndoSR-B1 knockout Mäusen (Cre+) nach Injektion von 2,5 mg Quantum Dots. (n=16) Jeder Maus wurden 2,5 mg QuantumDots injiziert. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Lebern entnommen und die Zellen mittels MACS sortiert. Die Intensität des Fluoreszenz Signal in der CD146-pos. Fraktion wurde mittels TECAN®-Reader ermittelt. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

3.2.3 Bedeutung der Stabilin-1/2 Rezeptoren für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln

3.2.3.1 Untersuchung der QuantumDot-Aufnahme mittels MACS

Die beiden *Scavenger*-Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2 sind große Transmembranproteine, die eine sehr hohe Expressionsdichte auf Leber-sinusoidalen Endothelzellen aufweisen. Sie zeichnen sich durch Ihre hohe Endozytoseaktivität aus. (Bhandari et al. 2021) Die Rolle der Stabiline für die Aufnahme von PMAOD-QuantumDots wurde mit Stabilin-1 sowie Stabilin-2 Knockout-Mausmodellen untersucht. Es wurde je eine Gruppe von Stabilin-1 oder Stabilin-2 Knockout-Mäusen mit einer Kontrollgruppe bestehend aus Wildtyp-Mäusen verglichen. Den Tieren wurden PMAOD-QuantumDots verabreicht, deren Aufnahme dieser in LSECs wurde zwischen den Gruppen verglichen wurde. Die Versuche mit den Stabilin-1 und Stabilin-2 Knockout-Mäusen wurden je dreimal

wiederholt. Abbildung 8 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen: (A) vergleicht hierbei Wildtyp und Stabilin-1 Knockout-Mäuse (Stab1ko), (B) vergleicht Wildtyp und Stabilin-2 Knockout-Mäuse (Stab2ko). Die drei Versuchswiederholungen wurden mit unterschiedlicher Tierzahl ($n = 12, 8, 6$) durchgeführt. Die Fluoreszenz pro $0,1 \times 10^6$ Zellen in den CD146-positiven Fraktionen wurde auf die Kontrollgruppe normiert. Abbildung 8 (A) zeigt die Fluoreszenz-Intensität der Stabilin-1 Knockout-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Stabilin-1 Knockout-Gruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verringerte Fluoreszenz-Intensität in der CD146-pos. Fraktion beobachtet. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht in allen Versuchswiederholungen. Durch die hohe Variabilität der Ergebnisse bei den drei Versuchswiederholungen wurde keine signifikante Verringerung in der Zusammenschau der Fluoreszenz-Intensität der Stabilin-1 Knockout-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Abbildung 8 (B) zeigt die Fluoreszenz-Intensität der Stabilin-2 Knockout-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein Knockout des Stabilin-2-Rezeptors verringerte die Fluoreszenz-Intensität und damit die Partikelaufnahme in allen drei Versuchswiederholungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine signifikante Verringerung der Fluoreszenz-Intensität ($p < 0,05$) in der CD146-positiven Fraktion wurde nur beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den Stabilin-2 Knockout-Gruppen beobachtet. Allerdings wurde kein komplettes Verschwinden des Fluoreszenzsignals in der CD146-positiven Fraktion beobachtet – weder in der Kontrollgruppe noch in der Knockout-Gruppe.

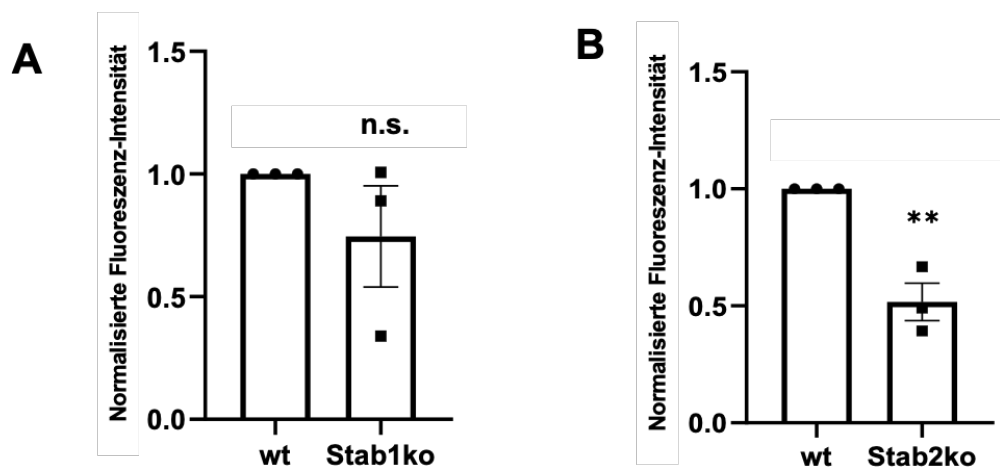


Abb. 8: Normalisierte QuantumDot-Fluoreszenz in CD146-pos. Fraktion von Kontroll-Mäusen (Wildtyp) und knockout Mäusen nach Injektion von 2,5 mg QuantumDots mit 3 Versuchswiederholungen.

Jeder Maus wurden 2,5 mg QuantumDots injiziert. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Lebern entnommen und die Zellen mittels MACS sortiert. Die Intensität des Fluoreszenz Signal in der CD146-pos. Fraktion wurde mittels TECAN®-Reader ermittelt. (A) Stabilin-1 knockout $n = 12, 8, 6$; (B) Stabilin-2 knockout $n = 12, 8, 6$. Die Fluoreszenz-Intensität in den Gruppen wurde auf den Wert der Kontrollgruppe normalisiert. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

3.2.3.2 Untersuchung der QuantumDot-Aufnahme mittels

Durchflusszytometrie

Durch die Untersuchung der Partikelaufnahme in LSECs mittels *Magnetic-activated cell-sorting* wurde der Stabilin-2-Rezeptor als potenziell notwendiger Rezeptor für die Nanopartikelaufnahme identifiziert. Um die Aufnahme der PMAOD-umhüllten QuantumDots nach intravenöser Applikation in die unterschiedlichen Leberzellen genauer zu untersuchen, wurde die Aufnahme der QuantumDots auch mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden jeweils Stabilin-1 oder Stabilin-2 Knockout-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen (Kontrollgruppe) verglichen. Die Leberzellen wurden mittels *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) sortiert. So konnten LSECs, Neutrophile, Kupffer-Zellen, dendritische Zellen und leberspezifische Monozyten voneinander unterschieden werden. Anschließend wurde die Intensität des QuantumDot-spezifischen Fluoreszenzsignals in den Zellpopulationen zwischen Kontroll- und Knockout-Gruppen verglichen. Abbildung 9 zeigt die Anzahl an QuantumDot-positiven Zellen in den unterschiedlichen Zellpopulationen in Prozent, wobei in (A) die Kontrollgruppe mit der Stabilin-1 Knockout-Gruppe verglichen wird; (B) zeigt den Vergleich von Kontrollgruppe und Stabilin-2 Knockout-Gruppe.

Die Stabilin-1 Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger QD-positive LSECs auf, jedoch kann hier, vergleichbar mit den Ergebnissen aus Abbildung 8 (A) nur von einem Trend gesprochen werden. Der prozentuale Anteil an QD-positiven Kupffer-Zellen war in der Stabilin-1 Knockout-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. In den Stabilin-1 defizienten Mäusen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger QD-positive LSECs, dafür aber mehr QD-positive Kupffer-Zellen detektiert. Die Unterschiede zwischen Stabilin-1 Knockout-Gruppe und Kontrollgruppe war in keiner der Zellpopulationen signifikant.

Die Stabilin-2 Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant geringeren prozentualen Anteil an QD-positiven LSECs (Abb 9. B). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen, die mittels Fluoreszenz-Intensitätsmessung (Abb.8) ermittelt wurden.

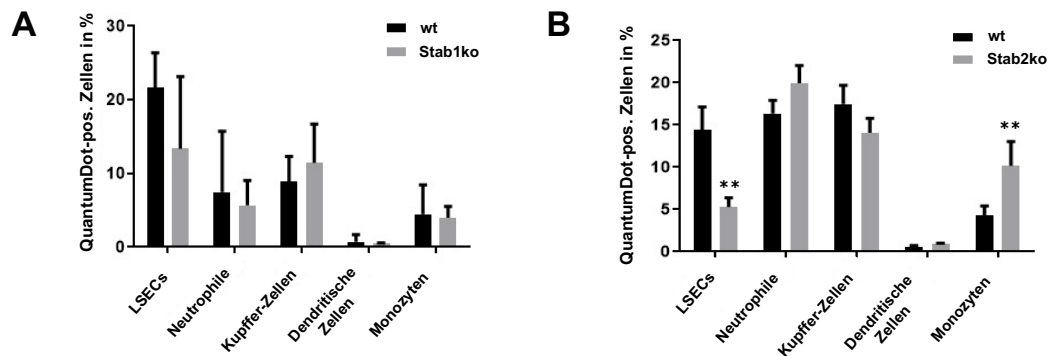


Abb. 9: Prozentualer Anteil an QuantumDot-pos. Zellen in den Leberzellpopulationen. Injektion von 2,5 mg QuantumDots und 30-minütige Inkubation. Leberzellen wurden mittels Durchflusszytometrie in Zellpopulationen sortiert, die Fluoreszenz-Intensität der QuantumDots wurde ermittelt. (A) Stabilin-1 Knockout (n=6); (B) Stabilin-2 Knockout (n=6). Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

In beiden Untersuchungen wurde eine geringere Aufnahme von QDs in Stabilin-2-defizienten Mäuse beobachtet, in beiden Versuchen war dieser Effekt im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant. In der Stabilin-2 knockout Gruppe wurde außerdem eine signifikant höhere Anzahl an QuantumDot-positiven Monozyten, im Vergleich zur Wildtyp- Kontrollgruppe beobachtet. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die verringerte Aufnahme der QuantumDots in LSECs zu einer kompensatorisch erhöhten Aufnahme der Partikel in Monozyten führt.

Die Aufnahme von QDs in andere Leukozyten variierte in den beiden Experimenten (Abb. 9 (A) und (B)). In beiden Versuchsdurchläufen wurde ein nur sehr geringer prozentualer Anteil an QuantumDot-positiven dendritischen Zellen festgestellt. Neben LSECs wurde außerdem ein hoher Anteil an QD-positiven Kupffer-Zellen und Neutrophilen festgestellt. Die hohe Aufnahme von PMAOD-QuantumDots in Kupffer-Zellen scheint im Anbetracht der hohen Phagozytoseaktivität dieses Zelltyps plausibel.

3.3 Untersuchung der intrazellulären Prozessierung und transkriptionellen Veränderungen innerhalb der LSECs nach Aufnahme autoreaktiver Peptide mittels PMAOD-umhüllten Nanopartikeln

Im zweiten Teil dieser Forschungsarbeit soll der Frage nachgegangen werden, wie Nanopartikel nach der rezeptorvermittelten Endozytose intrazellulär in den Leber-sinusoidalen Endothelzellen prozessiert werden. Wie Carambia et al. in ihren Arbeiten aus den Jahren 2015 und 2021 gezeigt haben, führt die Stimulation der LSECs mittels Nanopartikel-gekoppeltem Peptid zur Generierung antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen. Durch die Nanopartikel-vermittelte Aufnahme von Autoantigenen sind LSECs in der Lage, Toleranz gegen die transportierten Peptide zu vermitteln. Hierdurch konnte im Mausmodell eine Progression der durch das Peptid vermittelten Autoimmunerkrankung aufgehalten werden. Die intrazellulären Veränderungen, die schlussendlich zu der tolerogenen Antwort der LSECs auf die Peptidgabe führen, sind bislang weitgehend nicht bekannt.

Teilziel dieser Arbeit ist es, ein genaueres Verständnis über die intrazellulären Veränderungen in LSECs zu erlangen, um besser zu verstehen, was für die Entwicklung der Autoantigen-spezifischen Immuntoleranz benötigt wird. Hierfür wurde das NuTRAP-VECad-CreERT2-Mausmodell genutzt, mit welchem die Extraktion von GFP-markierten Ribosomen der LSECs möglich ist. Hierdurch kann LSEC-spezifische *messengerRNA* (im Folgenden mRNA genannt) gewonnen werden, die zum Zeitpunkt der Entnahme an den gebunden war. Diese mRNA gibt Auskunft über den aktuellen translationalen Status einer Zelle. Die Sequenzierung dieser mRNA kann dann Aufschluss über die Gene geben, die zu einem bestimmten Zeitpunkt an den Ribosomen translatiert werden und damit über die Proteine, die zu diesem Zeitpunkt produziert werden.

3.3.1 Nachweis der GFP- Färbung der NuTRAP-VECad-CreERT2- Tiere

Abbildung 10 zeigt die GFP-Färbung in fixiertem weißem inguinalen Fettgewebe (A) und der Leber (B). Die durch Tamoxifen induzierte GFP-Färbung beschränkt sich in den unterschiedlichen Geweben auf die Ribosomen der Endothelzellen. Durch die auf Endothelzellen beschränkte Produktion von GFP wird darauf geschlossen, dass in der Leber hauptsächlich die Ribosomen der Leber-sinusoidalen Endothelzellen mittels GFP markiert werden. Durch

Immunpräzipitation der GFP-markierten Ribosomen und RNA-Extraktion kann so LSEC-spezifische mRNA extrahiert werden. Diese mRNA entspricht der an den Ribosomen abgelesenen RNA, so kann Aufschluss über den translationalen Status der Zellen zum Zeitpunkt der Ribosomenextraktion gewonnen werden.

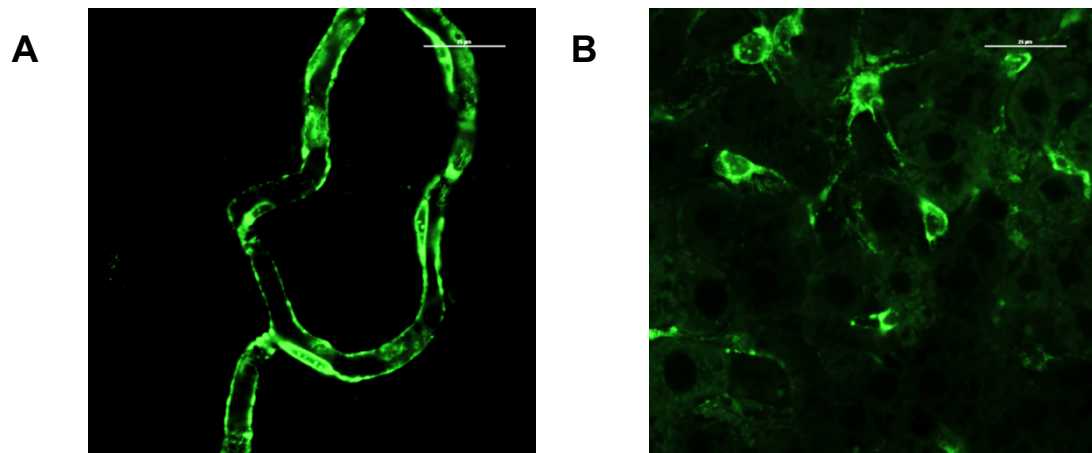


Abb. 10: GFP-markierte Ribosomen in Endothelzellen von NuTRAP-VECad-CreERT2 Mäusen. Die endotheliale GFP-Produktion wurde durch dreimalige Tamoxifengabe (7, 2 und 1 Tag vor Organentnahme) induziert. Die Leber der Maus wurde fixiert, das GFP wurde mit einem Konfokalmikroskop mit Resonanzscanner nachgewiesen. Hierbei wurde das Gewebe mit 395nm angeregt, die *Excitation*maximum des GFP liegt bei 509nm. (A) weißes inguinale Fettgewebe; (B) Leber.

3.3.2 Charakterisierung isolierter endothelialer mRNA

Zur Untersuchung der mittels TRAP-IP extrahierten mRNA wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um die Genexpression zwischen der Gesamtleber (im Folgenden *input* genannt) und der endothelialen mRNA (im Folgenden anti-GFP *pulldown* genannt) zu vergleichen.

Durch den Vergleich dieser Genexpressionsanalysen sollte untersucht werden, welche Zelltypen in *input*- und anti-GFP *pulldown*- mRNA vorzufinden sind.

Abbildung 11 vergleicht die Expression mehrerer Markergene zwischen der Gesamtleber-RNA (*input*) und der LSEC spezifischen mRNA (anti-GFP *pulldown*). Es wurden sowohl Hepatozyten-spezifische Marker, Leukozyten-spezifische Marker als auch LSEC-spezifische Marker in den Proben gemessen, um zu untersuchen welche Zelltypen in der mRNA des anti-GFP *pulldown* vorzufinden sind.

Die Apolipoproteine ApoA1 und ApoB sind Marker, die in der Leber nur durch Hepatozyten produziert werden und deshalb als Hepatozyten-spezifische Marker genutzt werden. (Eggerman et al. 1991) Die Expression dieser Marker war in der *input*-RNA signifikant höher als in der anti-GFP *pulldown*-mRNA. Der Makrophagen-spezifische Marker EMR-1 war in *input*- und *pulldown*-RNA nur sehr

gering exprimiert, was darauf schließen lässt, dass mittels TRAP-Immunpräzipitation keine Ribosomen von Makrophagen extrahiert werden. Der LSEC-spezifische Marker Stabilin-2 war in der *pulldown*-RNA signifikant höher exprimiert als in der Gesamtleber-RNA. Auch die Chemokine CXCL 10, CXCL 16 und CXCL 9 waren in der *pulldown*-RNA signifikant höher exprimiert als in der Gesamtleber-RNA. In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, im anti-GFP-*pulldown* mit hoher Gewissheit LSEC-spezifische mRNA vorzufinden, da in dieser besonders der LSEC-spezifische Marker Stabilin-2 signifikant höher exprimiert ist als in der Gesamtleber-RNA.

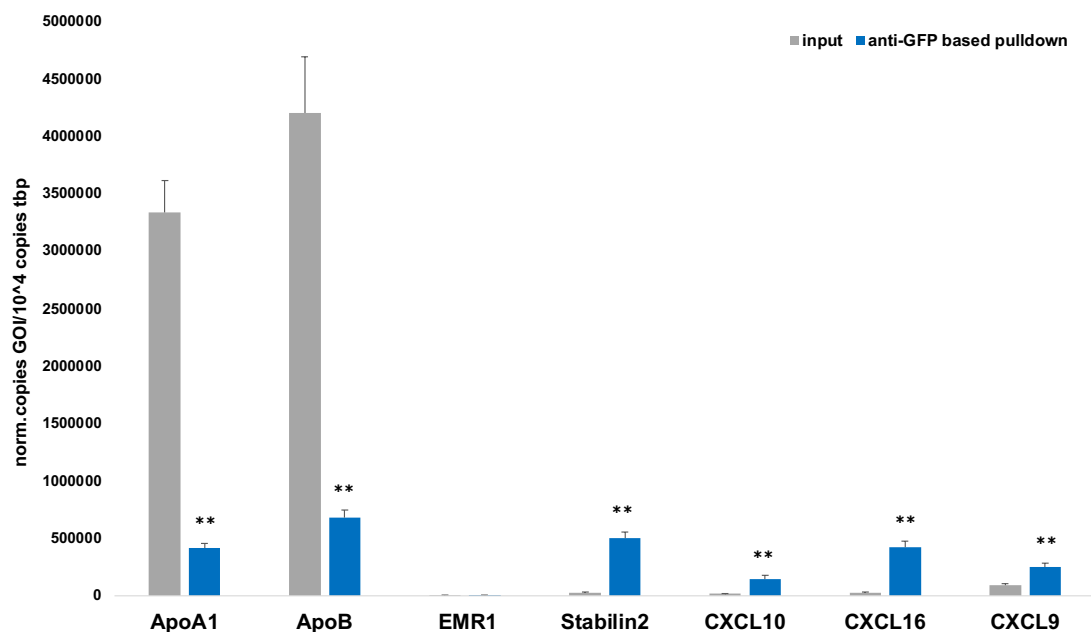


Abb. 11: Expressionsmuster relevanter Marker-Gene in input und anti-GFP pulldown. (n=20)
Die endotheliale mRNA wurde mittels TRAP-Immunpräzipitation aus Leber von NuTRAP-VECAd-CreERT2 -Tieren extrahiert. Die Expression relevanter Gene wurde im Gesamt-Lebergewebe (*input*) und in der mRNA (*anti-GFP pulldown*) mittels TaqMan® qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind auf das *housekeeping* Gen 36b4 normalisiert. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

3.3.3 Analyse LSEC-spezifischer mRNA nach Gabe von Peptid-gekoppelten und ungekoppelten Nanopartikeln

Die Methode der TRAP-Immunpräzipitation wurde anschließend dafür verwendet, um ein genaueres Verständnis über die transkriptionellen und translationalen Veränderungen innerhalb der LSECs nach Autoantigen-Aufnahme zu erlangen. Hierfür wurde die mRNA von Mäusen, die entweder mit peptidgekoppeltem Nanopartikeln oder ungekoppelten Nanopartikeln behandelt wurden, untersucht. So konnten die intrazellulären Veränderungen auf ribosomaler Ebene zwischen den verschiedenen behandelten Gruppen verglichen werden. Es wurden vier unterschiedliche Gruppen miteinander verglichen. Je zwei Gruppen erhielten

peptidgekoppelte Nanopartikel zu unterschiedlichen Injektionszeitpunkten, zusätzlich erhielt eine Gruppe eine Injektion mit ungekoppelten Nanopartikeln, eine Gruppe wurde als Kontrolle nur mit PBS injiziert. Jeweils fünf NuTRAP-VECadh-Mäuse pro Gruppe wurden behandelt.

Abbildung 12 stellt den Versuchsaufbau schematisch dar. Eine Gruppe erhielt eine intravenöse Injektion mit 100 µl PBS (Kontrollgruppe) vier Stunden vor Organentnahme, eine andere erhielt eine Injektion mit 100 µl ungekoppelten Nanopartikeln (im Folgenden genannt PMAOD-NPs; bereitgestellt von topas *therapeutics* GmbH®). Zwei weitere Gruppen erhielten OVA-I gekoppelte Nanopartikel, sogenannte OVA-PMAOD-NPs (bereitgestellt von topas *therapeutics* GmbH®). Hierbei wurde die Gruppe „OVA-PMAOD-NPs“ einmalig injiziert (100 µl, 4h vor Organentnahme), die Gruppe „OVA-PMAOD-NPs 2x“ erhielt eine doppelte Injektion (100 µl je vier und vierundzwanzig Stunden vor Organentnahme).

Die von topas *therapeutics* GmbH® bereitgestellten Partikel sind im Gegensatz zu den fluoreszierenden QuantumDots mit PMAOD-umhüllte SPIOs, welche keine Eigen-Fluoreszenz aufweisen.

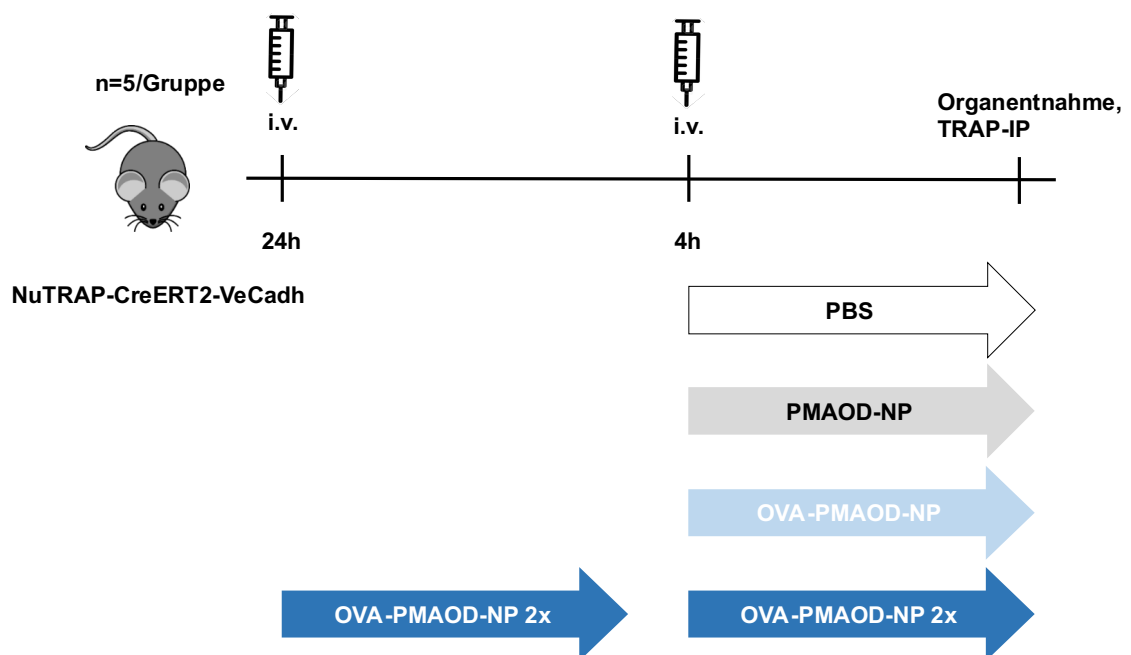


Abb. 12: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und Injektionsschema zur Beurteilung der mRNA-Antwort nach Nanopartikel-Peptid Gabe.

Je 5 Tiere pro Gruppe erhielten als retroorbitale Injektion entweder 100 µl PBS, 100 µl PMAOD-NPs, 100 µl OVA-PMAOD-NPs 4 h vor Organentnahme. Eine weitere Gruppe erhielt je 100 µl OVA-PMAOD-NPs je 24 h und 4 h vor Organentnahme.

3.3.4 RNA-Sequenzierung endothelialer mRNA

Um genauer zu verstehen, welche intrazellulären Vorgänge in LSECs nach Aufnahme von Autoantigen-gekoppelten Nanopartikeln ablaufen, wurde die mittels TRAP-IP isolierte mRNA sequenziert. Die Sequenzierung stellt eine ungerichtete Analyse dar, wodurch alle Gene, die in der RNA-Probe exprimiert sind, detektiert werden können. Ziel dieser Sequenzierung war es, Signalwege und Gene ausfindig zu machen, die durch die Autoantigen-Behandlung hochreguliert werden. Hierfür wurden aus dem in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Experiment jeweils vier Proben aus den Gruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP, und OVA-PMAOD-NP 2x zur Sequenzierung genutzt. Die PMAOD-NP-Gruppe dient hierbei als Kontrollgruppe, da diese Gruppe keine Injektion des Autoantigens, sondern lediglich einen „leeren“ Nanopartikel erhielt. Die Sequenzierung wurde von *novoGene* (UK) durchgeführt.

3.3.4.1 Darstellung im Clusterdiagramm

Abbildung 13 zeigt die Expressionsstärke mehrerer Genfamilien in der mRNA der Gruppen PMAOD-NP (einmalige PMAOD-NP-Injektion vier Stunden vor Organentnahme), OVA-PMAOD-NP (einmalige OVA-PMAOD-NP-Injektion vier Stunden vor Organentnahme) und OVA-PMAOD-NP 2x (zweifache OVA-PMAOD-NP Injektion vierundzwanzig und vier Stunden vor Organentnahme). Im Clusterdiagramm wird das homogene Expressionsmuster innerhalb der einzelnen sequenzierten Proben in den Gruppen sichtbar. Das Clusterdiagramm stellt dar, dass die einzelnen Proben innerhalb der drei Gruppen das gleiche Expressionsverhalten aufzeigen, das heißt annotierte Gene gleichermaßen stärker oder schwächer exprimiert wurden. Zwischen den Gruppen wurden Unterschiede festgestellt, besonders die Expression der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe unterschied sich von den anderen beiden Gruppen, was durch die unterschiedliche Anfärbung der Gen-Annotationen dargestellt wird.

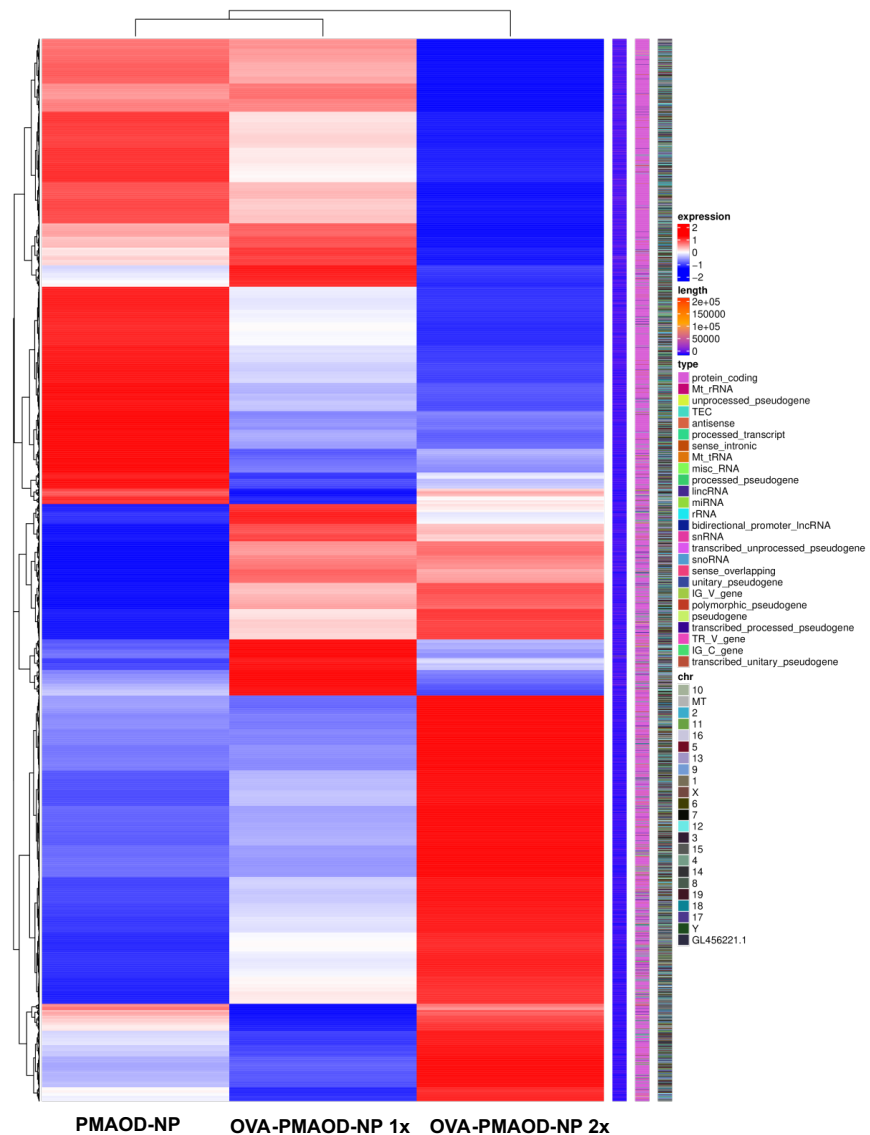


Abb. 13: Clusterdiagramm der exprimierten mRNA in Gruppen. (n=4)

Die messengerRNA wurde mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Das Diagramm zeigt die Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den drei Gruppen, welche entweder mit PMAOD-NP (Kontrolle), einmalig OVA-PMAOD-NP oder doppelt OVA-PMAOD-NP injiziert wurden. Die unterschiedliche Expressionshöhe der annotierten Gene wurde durch Blau- (Herabregulation) sowie Rot- (Hochregulation) Schattierungen dargestellt.

3.3.4.2 Darstellung differentiell-regulierter Gene mittels Vulkanplot

Mittels RNA-Sequenzierung wurde eine Vielzahl von Genen ermittelt, die für unterschiedlichste Proteine kodieren. Die vergleichende Analyse ermöglicht es, die Herunter- und Hochregulation von Genen zu untersuchen, hierbei wird jeweils der *p*-Wert sowie der relative Expressionsunterschied (im folgenden *foldchange* genannt), für jedes Gen im direkten Vergleich zweier Gruppen berechnet. Mittels dieser Analyse können die Expressionshöhen der Gene zwischen den Gruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x und OVA-PMAOD-NP 2x verglichen und dargestellt werden. In 3 voneinander unabhängigen Analysen wurden jeweils die

PMAOD-NP -Gruppe mit der OVA-PMAOD-NP 1x -Gruppe, die PMAOD-NP -Gruppe mit der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe sowie die OVA-PMAOD-NP 1x- mit der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe verglichen. Um Unterschiede zwischen den Gruppen zu darzustellen, wurden Vulkanplots angefertigt. Abbildung 14 zeigt die exprimierten Gene in den drei Gruppen im Vulkanplot. In der Kontrollgruppe und der OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe wurden 11074 Gene gefunden, die in beiden Gruppen exprimiert sind (A). Gefunden wurden 263 Gene, die nur in der OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe, und 182 Gene, die nur in der Kontrollgruppe exprimiert sind. Zwischen der Kontrollgruppe und der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe wurden die größten Unterschiede in Expressionshöhen festgestellt (B). In der Kontrollgruppe und der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe wurden 10981 Gene gefunden, die in beiden Gruppen exprimiert waren (B). Es wurden 381 Gene identifiziert, die nur in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe, und 275 Gene, die nur in der Kontrollgruppe exprimiert waren. Auch zwischen der OVA-PMAOD-NP 1x- und der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe wurden Unterschiede in der Genexpressionshöhen festgestellt (C), jedoch waren diese weniger stark ausgeprägt als zwischen Kontrollgruppe und OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe. In der OVA-PMAOD-NP 1x- und der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe wurden 11092 Gene gefunden, die in beiden Gruppen exprimiert sind (C). Es wurden 245 Gene, die nur in der OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe, und 270 Gene, die nur in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe exprimiert sind, gefunden. Mittels Vulkanplot wird außerdem sichtbar, dass durch die zweizeitige doppelte OVA-PMAOD-NP-Injektion die größte Veränderung des relativen Expressionsunterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht wird.

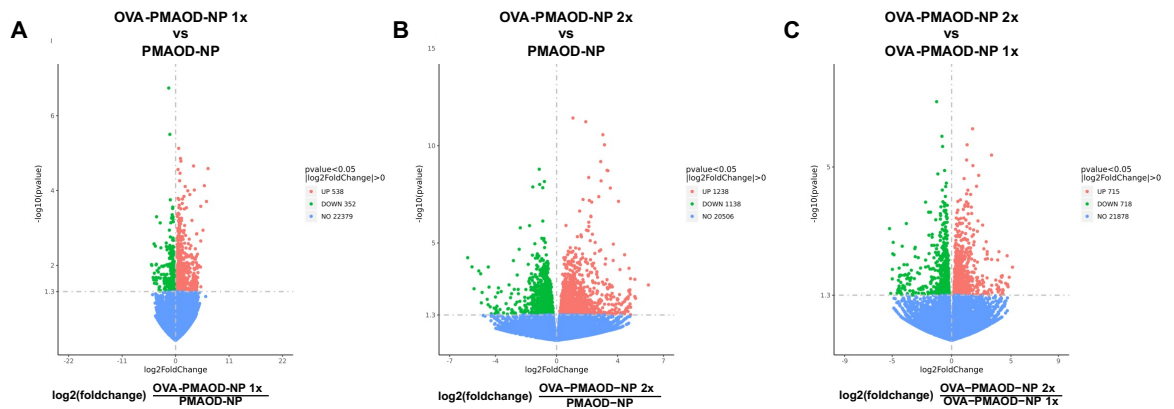


Abb. 14: Vulkanplot der exprimierten mRNA im Vergleich der Gruppen. (n=4)

Die mRNA wurde mittels RNA- Sequenzierung analysiert. Das Diagramm zeigt die Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den drei Gruppen, welche entweder *PMAOD-NP* (Kontrolle), einmalig *OVA-PMAOD-NP* oder doppelt *OVA-PMAOD-NP* injiziert bekamen. (A) Kontrolle (*PMAOD-NP*) verglichen mit *OVA-PMAOD-NP* 1x; (B) Kontrolle verglichen mit *OVA-PMAOD-NP* 2x; (C) *OVA-PMAOD-NP* 1x verglichen mit *OVA-PMAOD-NP* 2x.

3.3.4.3 Charakterisierung relevanter Markergene für die LSEC-spezifische tolerogene Immunantwort nach Peptidaufnahme

Die Darstellung des *foldchange* der detektierten Gene im Vulkanplot zeigt, dass es einige Gene gibt, die durch die Behandlung mit den Peptid-gekoppelten Nanopartikeln signifikant höher exprimiert werden als andere. Ein Ziel der Sequenzierung sollte es sein, eine LSEC-spezifische Gensignatur zu identifizieren, die nach der Behandlung mit Peptid-gekoppelten Nanopartikeln in LSECs hervorgerufen wird. Diese Gensignatur repräsentiert die physiologische Antwort der LSECs auf eine Stimulation mit Peptid-gekoppelten Partikeln. Diese LSEC-spezifische Gensignatur kann in weiteren Versuchen genutzt werden, um zu analysieren, ob bei fehlendem Rezeptor ein Ausbleiben dieser LSEC-spezifischen transkriptionellen Antwort auftritt, was auf ein Ausbleiben der immunologischen Antwort der LSECs hindeutet.

Um aus der Vielzahl der detektierten Gene einige relevante Gene gründlicher untersuchen zu können, wurden die Genkataloge mittels zwei Kriterien analysiert. Ziel dieser Sortierung war es Gene herauszufiltern, die eine Relevanz in der LSEC-vermittelten Induktion von immunologischer Toleranz haben. Für die Induktion der immunologischen Toleranz ist es zum einen wichtig, dass LSECs mit zirkulierenden Lymphozyten in Kontakt treten, zum anderen müssen LSECs dann anti-inflammatorische Signale senden, um die angelockten Lymphozyten zu einem tolerogenen Phänotyp zu *primen*.

Als Teil der spezifischen Gensignatur in Betracht gezogen wurden alle Gene, die in den mit Peptid behandelten Gruppen (*OVA-PMAOD-NP* 1x und *OVA-PMAOD-*

NP 2x) im Gegensatz zur Kontrollgruppe (PMAOD-NP) hochreguliert waren. Außerdem wurden die Gene, die in der doppelt behandelten Gruppe (OVA-PMAOD-NP 2x) im Gegensatz zu der einmal behandelten Gruppe (OVA-PMAOD-NP 1x) hochreguliert waren, in Betracht gezogen. Alle Gene, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 oder kleiner in den Proben gefunden wurden, d.h. ein p -Wert $\leq 0,05$ aufwiesen, wurden zur weiteren Untersuchung in Betracht gezogen. Um aus diesen statistisch relevanten Genen nun jene herauszufiltern, die für die Zelle auch einen wichtigen Effekt vermitteln, wurde als zweites Kriterium der *foldchange* betrachtet:

Alle Gene, die im Vergleich zur unbehandelten Gruppe entweder in der OVA-PMAOD-NP 1x- oder in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe mindestens einen *foldchange* von 2 aufwiesen (die Expression ist in den Gruppen im Vergleich zur Kontrolle doppelt so hoch) wurden zur weiteren Analyse in Betracht gezogen.

Alle Gene, die im Vergleich zu der einmal mit Peptid behandelten Gruppe (OVA-PMAOD-NP 1x) in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe mindestens einen *foldchange* von 2 aufwiesen (die Expression ist in den Gruppen im Vergleich zur OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe doppelt so hoch) wurden zur weiteren Analyse ebenfalls in Betracht gezogen.

Diese neu sortierten Gene wurden dann im Hinblick auf die Relevanz für die Leukozyten-Diapedese sowie die LSEC-spezifische Toleranzvermittlung untersucht.

Durch die Sortierung wurden 10 Gene als Markergene festgelegt, die die LSEC-vermittelte Reaktion auf die Nanopartikel-vermittelte Autoantigenbehandlung charakterisieren. Diese 10 Gene lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: Gene, die eine Rolle in der Leukodiapedese entlang der Sinusoide spielen und Gene, die eine Rolle in der Induktion der Immuntoleranz durch LSECs spielen. Die 5 Marker, die die Leukodiapedese charakterisieren, sind CCL 2, CCL 3, CCL 4, CCL 5, CCL 7. Die fünf Gene, die eine Rolle in der Induktion von Immuntoleranz spielen, sind Ptger4, Fgl1, CD69, Sfrp5 und Il1rn.

Um die Expressionshöhe der Markergene in den drei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde der relative Expressionsunterschied, *foldchange*, auf die Expression der PMAOD-NP-Gruppe normalisiert. Abbildung 15 bildet den normalisierten *foldchange* der drei Gruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x und OVA-PMAOD-NP 2x ab. Es wurde ein signifikant höherer *foldchange* in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe im Vergleich zur PMAOD-NP -Gruppe für alle Leukozyten-Diapedese Markergene beobachtet. Das Chemokin CCL3 wurde nur in der sequenzierten mRNA der PMAOD-NP- und OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe

gefunden, nicht in der mRNA der OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe. Ptger4 stellte das einzige Markergen der Immuntoleranz-Marker dar, bei dem eine signifikante Erhöhung des *foldchange* sowohl im Vergleich der PMAOD-NP mit OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe, als auch im Vergleich der PMAOD-NP- mit OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe beobachtet wurde.

Für die Marker CCL2, CCL4, CCL7, Ptger4, CD69, Fgl1 und Sfrp5 wurde als Trend beobachtet, dass der *foldchange* in der PMAOD-NP -Gruppe am niedrigsten und in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe am höchsten ist.

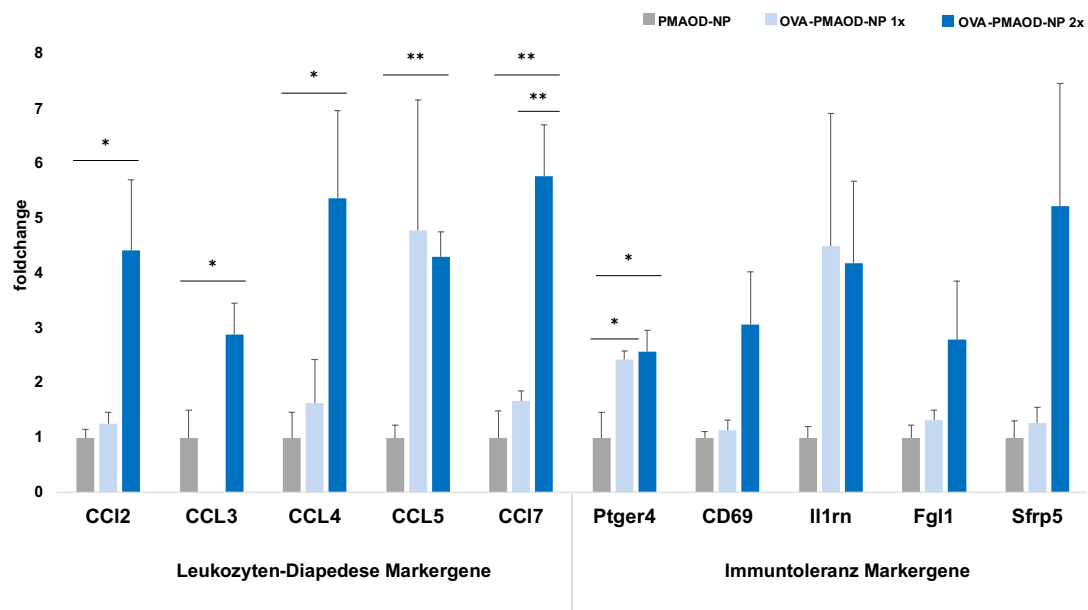


Abb. 15: Normalisierter *foldchange* der Leukozyten-Diapedese und Immuntoleranz Markergene.

Der *foldchange* der sortierten Markergene wurde für die Gruppen, OVA-PMAOD-NP 1x und OVA-PMAOD-NP 2x auf den *foldchange* der Kontrollgruppe (PMAOD-NP) normalisiert. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

Die ermittelten Marker stellen die spezifische Gensignatur von LSECs dar, die mit Peptid-gekoppelten und PMAOD-umhüllten SPIOs behandelt wurden.

Diese Proteine spielen außerdem eine potenzielle Rolle in der durch LSECs vermittelte Induktion von Immuntoleranz gegen die verabreichten Peptidkomplexe. Es ist bislang keine Charakterisierung von mRNA stimulierter LSECs bekannt, weswegen die detektierten Proteine mittels eigens festgelegter Sortierungskriterien ausgewählt wurden.

3.3.4.4 Genexpressionsanalyse der Markergene in den Versuchsgruppen mittels quantitativer *realtime*-PCR

Die ausgewählten Markergene wurden anschließend in den mRNA-Proben der Gruppen aus Kapitel 3.3.3 mittels quantitativer *realtime*-PCR untersucht. Es galt herauszufinden, ob sich die Markergen-Erhöhung auch durch quantitative *realtime*-PCR darstellen lässt. Acht von den insgesamt zehn Markergenen wurden mittels *TaqMan*[®] qRT-PCR für die PBS-, PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x-, und OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe analysiert, die Messung der Marker CD69 und Il1rn erfolgte nicht. Die Kopienzahl der Gene wurde durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet und auf das *Housekeeping*-Gen *tbp* normiert. Zwischen der PBS- und der PMAOD-NP -Gruppe wurden für keine der untersuchten Gene signifikante Unterschiede festgestellt, weswegen die Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Abbildung 16 zeigt den Vergleich der Expressionshöhe der Markergene in den drei Gruppen PMAOD-NP, OVA-PMAOD-NP 1x und OVA-PMAOD-NP 2x. Die Expression von CCL 2, CCL 3, CCL 5, CCL 7 und Ptger4 war in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe am höchsten, jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu einer anderen Gruppe erreicht. Für alle Marker außer CCL 4 wurde bei der doppelten Injektion von OVA-PMAOD-NP (OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe) eine höhere Expression der Markergene als in der OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe beobachtet. Sfrp5 sowie Fgl1 war in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe signifikant höher exprimiert als in der OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe.

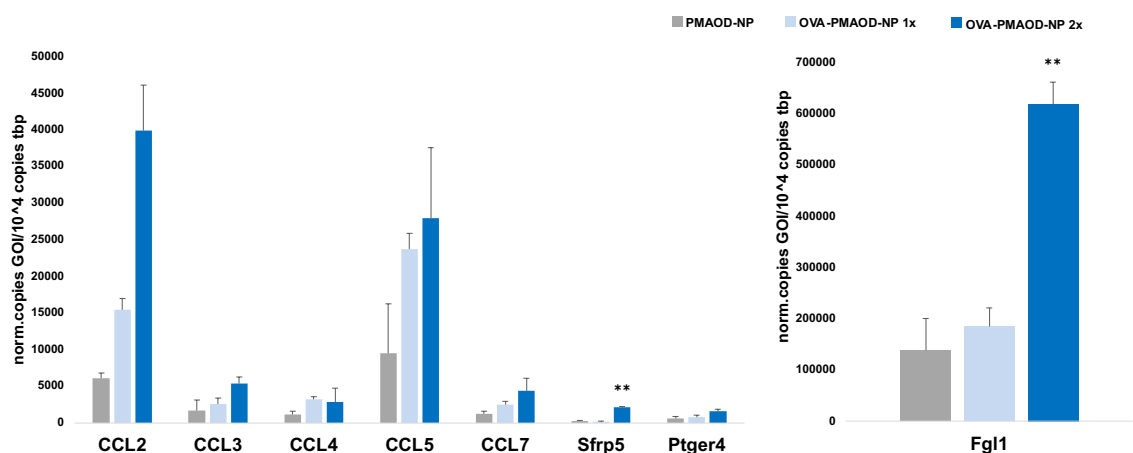


Abb.16: Expressionsanalyse der mittels RNA-Sequenzierung ausgewählten Markergene in den Versuchsgruppen. (n=5)

Die Gruppen erhielten je 100 μ l PMAOD-NP oder 100 μ l OVA-PMAOD-NP vier Stunden vor der Organentnahme. Eine weitere Gruppe erhielt 200 μ l OVA-PMAOD-NP, je 100 μ l 24 und 4 Stunden vor Organentnahme. Die endotheliale mRNA wurde mittels TRAP-Immunpräzipitation aus Leber von VeCadh_NuTRAP-Tieren extrahiert. Die Expression relevanter Gene wurde in der mRNA (anti-GFP *pulldown*) mittels *TaqMan*[®] qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind auf das *housekeeping* Gen *tbp* normalisiert. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

Zusammenfassend lässt sich durch die mittels qRT-PCR ermittelte Expression der Markergene in den Gruppen als Trend beobachten, dass die Nanopartikel-vermittelte Gabe von OVA I-Peptid zu einer Erhöhung der Genexpression dieser führt. Ebenfalls kann als Trend dargestellt werden, dass die Expression der Marker in der PMAOD-NP Gruppe am niedrigsten, und in der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe am höchsten sind. Dies entspricht den Ergebnissen aus den RNA-Sequenzierungsdaten. Die Gensignatur, die durch die RNA-Sequenzierung ermittelt wurde, verhält sich in der quantitativen PCR gleichermaßen. Somit konnte durch die Genexpressionsanalyse auf die intrazelluläre LSEC-Antwort rückgeschlossen werden. Mittels quantitativer RT-PCR kann beurteilt werden, ob die relevanten Gene für Immunzell-Diapyrese und Immuntoleranzentwicklung transkribiert und hochreguliert werden.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die doppelte, zeitversetzte Gabe von OVA I-Peptid einen stärkeren Effekt in den LSECs hervorruft als die einzelne Peptid-Injektion. Besonders durch die zweizeitige, zeitversetzte Injektion des Peptids werden signifikante Unterschiede in Expressionshöhe der Markergene beobachtet.

3.3.4.5 Analyse der exprimierten Gene in der endothelialen mRNA mittels *GO-Enrichment*-Analyse

Um die Relevanz der doppelten Injektion im Vergleich zur einfachen OVA-PMAOD-NP-Injektion genauer zu betrachten, wurde außerdem der *foldchange* in Expressionshöhe mehrerer Gen-Annotationen untersucht. Mittels GO-Analyse wird die Expressionsstärke der Genannotationen zwischen den drei Gruppen, OVA-PMAOD-NP 1x, OVA-PMAOD-NP 2x und Kontrolle verglichen. Abbildung 17 stellt die GO-Analysen der Gruppen dar, wobei (A) die Kontrollgruppe versus OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe darstellt, (B) die Kontrollgruppe versus OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe abbildet und (C) OVA-PMAOD-NP 1x- versus OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe darstellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in der mRNA der OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe Gene, die eine Rolle im Fettsäurestoffwechsel, der Fettsäurebiosynthese, und der Regulation des Hormonstoffwechsels spielen, signifikant hochreguliert (A). Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden in der mRNA der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe die meisten hochregulierten Gene gefunden (B). Besonders Gene, die eine Rolle im Ribosomen-Stoffwechsel spielen, waren signifikant höher in der mRNA der OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe exprimiert als in der mRNA der Kontrollgruppe. Zwischen der OVA-PMAOD-NP 1x- und OVA-

PMAOD-NP 2x-Gruppe wurden ebenfalls Unterschiede in den Expressionshöhen von mehreren Signalwegen entdeckt. Im Vergleich zur OVA-PMAOD-NP 1x-Gruppe waren in der mRNA OVA-PMAOD-NP 2x-Gruppe viele Gene, die eine Rolle in der humoralen Immunantwort und der Aktivierung des Komplementsystems spielen, signifikant hochreguliert.

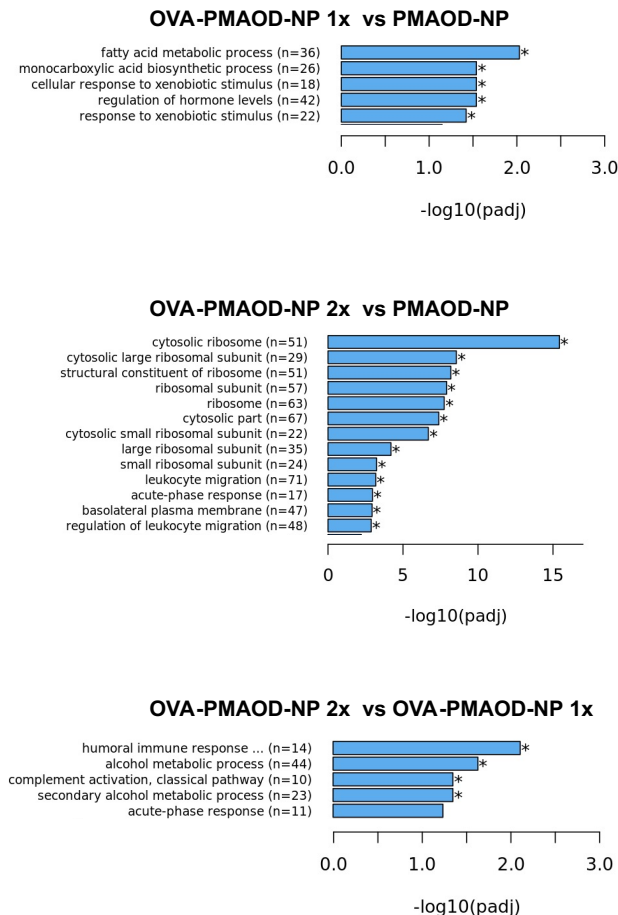


Abb. 17: GeneOntology (GO) Enrichment-Analyse mRNA in den Gruppen. (n=4)

Mittels GO-Analyse wurde die Expressionsstärke mehrerer Gene von Signalwegen ermittelt und die Expressionshöhen der Gruppen miteinander verglichen, um mögliche Gruppenunterschiede darzustellen. (A) Kontrolle verglichen mit OVA-PMAOD-NP 1x; (B) Kontrolle verglichen mit OVA-PMAOD-NP 2x, (C) OVA-PMAOD-NP 1x verglichen mit OVA-PMAOD-NP 2x.

Besonders die zweizeitige Injektion von OVA-PMAOD-NP führt zu einer Erhöhung der Genannotationen „humorale Immunantwort“ sowie „Aktivierung Komplementsystem“. Die einmalige Gabe von OVA-PMAOD-NP führte zu keiner signifikanten Erhöhung dieser Genannotationen. Diese Ergebnisse lassen darauf deuten, dass besonders für die immunologische Reaktion der LSECs zur Toleranzinduktion, eine doppelte Injektion von Nanopartikel und Peptid eine vorteilhaft ist.

3.4 Untersuchung des zeitlichen Einflusses der Peptid-Injektion auf die LSEC-spezifische Immunreaktion

Die Ergebnisse aus 3.3 zeigen, dass die doppelte Injektion des OVA I-Peptids, im Vergleich zur singulären Injektion, einen größeren Effekt in LSECs, besonders eine stärkere immunologische Reaktion dieser, hervorruft. Diese Beobachtung veranlasste dazu, die Relevanz des Injektionszeitpunkts sowie der Injektionsmenge für die LSEC-spezifische Reaktion auf das Peptid zu untersuchen. Im folgenden Versuch galt es, den optimalen Zeitpunkt für die Injektion der Peptid-gekoppelten Partikel zu ermitteln, um die größtmögliche intrazelluläre Reaktion in LSECs hervorzurufen. Außerdem galt es herauszufinden, wie lange die Reaktion in LSECs andauert, bzw. wie lange die Peptid-Injektion zu einer Erhöhung der Markergene führt. Die Genexpressionshöhe der Markergene, die mittels Sequenzierung detektiert wurden, soll hierbei als Anhaltspunkt für die Stärke der immunologischen LSEC-Antwort dienen.

Für diese Untersuchung wurden sieben Gruppen mit einer Fallzahl von je 6 Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Mäuse erhielten als Injektion, entweder 100 µl leere Nanopartikel (PMAOD-NP der Firma *topas therapeutics GmbH*®) oder 100µl OVA-I gekoppelte PMAOD-NP (im Folgenden abgekürzt mit OVA-PMAOD-NP). Diese Partikel waren, wie in den ebenfalls aufgeführten Versuchen, ein mit PMAOD-umhüllter SPIO-Partikel, gekoppelt an das OVA I-Peptid. Die PMAOD-NP-Gruppen stellten hierbei jeweils die Kontrollgruppen dar, da diese keine Peptidgabe, sondern lediglich einen „leeren“ Nanopartikel verabreicht bekamen, durch welche keine Immunreaktion erwartet wurde.

Abbildung 18 bildet das Injektionsschema und den Versuchsaufbau ab. Neben der Relevanz des Injektionszeitpunkts wurde außerdem die einmalige mit der zweimaligen Injektion von 100 µl OVA-PMAOD-NP und PMAOD-NP verglichen. Wie in Abbildung 18 dargestellt, erhielten die ersten 4 Gruppen entweder eine Injektion PMAOD-NP oder eine Injektion OVA-PMAOD-NP zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Es wurde die Injektion 4h, 24h, 48h und 168h Stunden vor Organentnahme miteinander verglichen. Weitere 3 Gruppen erhielten eine doppelte Injektion, je zweifach 100 µl PMAOD-NP oder zweifach 100 µl OVA-PMAOD-NP. Hierfür wurde die zweite Injektion immer 4 Stunden vor Organentnahme verabreicht, die erste Injektion wurde entweder 24h, 48h oder 168h vor dem Versuchstag verabreicht.

Der relative Expressionsunterschied der Markergene unterschied sich zwischen LSEC-spezifischer mRNA und Gesamtleber-RNA nicht signifikant (Daten in dieser

Arbeit nicht aufgeführt), weswegen die Analyse der Markergene in der RNA der Gesamtleber (*input*) erfolgte. Die Veränderung der Genexpression wurde zwischen den PMAOD-NP - und OVA-PMAOD-NP -Gruppen verglichen. Die Veränderung in Expressionshöhen in der OVA-PMAOD-NP-Gruppe wurde auf die Expressionshöhe der PMAOD-NP -Gruppen normiert.

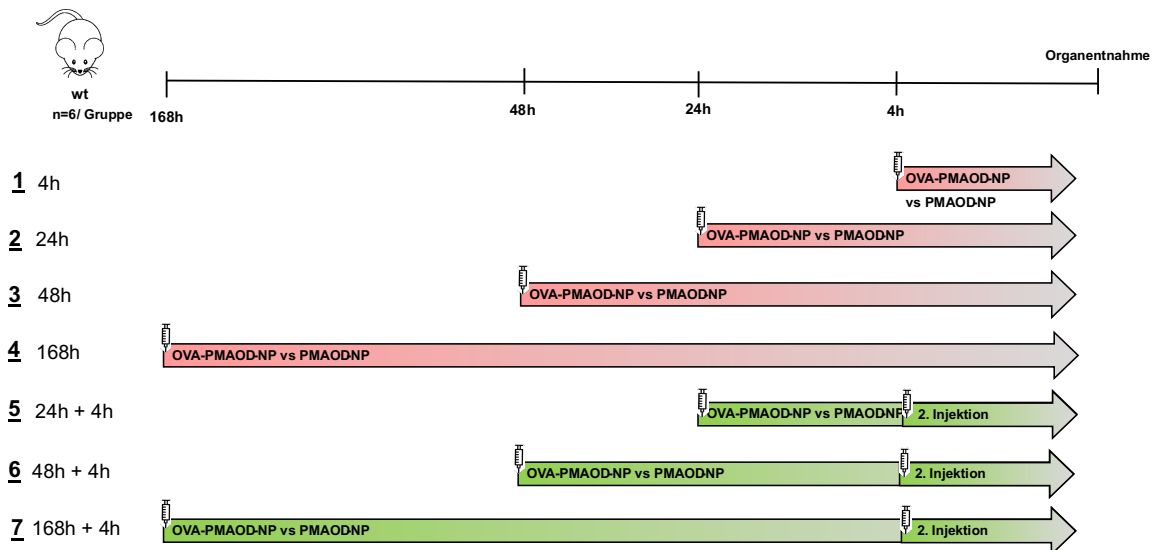


Abb. 18: Injektionsschema zur Beurteilung der Relevanz des zeitlichen Einflusses auf die intrazellulären Veränderungen in LSECs.

Es wurden 7 Gruppen (n=6) miteinander verglichen. Es wurden 100 µl OVA-PMAOD-NP und als Kontrolle 100 µl PMAOD-NP appliziert. Die ersten 4 Gruppen erhielten eine einzelne Injektion, die letzten 3 Gruppen eine doppelte Injektion der Partikel.

Abbildung 19 stellt die Expression der Markergene in den einmalig injizierten Gruppen dar. Bei einmaliger Injektion von Nanopartikeln und Peptid wurde beobachtet, dass die Veränderung der Genexpressionshöhe in der Gruppe, die 4h vor Organentnahme injiziert wurde (4h OVA-PMAOD-NP 1x vs PMAOD-NP), am größten ist. Es wurde eine signifikante Erhöhung im *foldchange* der OVA-PMAOD-NP -Gruppe im Vergleich zur PMAOD-NP -Gruppe für die Chemokine CCL 4 und CCL 7 erreicht. Als Trend hat sich in dieser Gruppe gezeigt, dass die Expression aller Chemokine durch die Peptidinjektion in der OVA-PMAOD-NP -Gruppe im Vergleich zur PMAOD-NP -Gruppe um mindestens das Zweifache erhöht ist. In den Gruppen, die eine einmalige Injektion OVA-PMAOD-NP 24h oder 48h vor Organentnahme erhielten, konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden.

Die Expression der Markergene variierte in den Gruppen, die 24h oder 48h vor Organentnahme injiziert wurden, zwischen OVA-PMAOD-NP-Gruppe und PMAOD-NP-Gruppe nicht signifikant. Die Expression der Chemokine war bei

Ergebnisse

Injektion 24h und 48h vor Organentnahme in der OVA-PMAOD-NP-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert. Erklärt werden könnte dieser Effekt dadurch, dass die Reaktion der LSECs auf die Peptidgabe nach 24h bzw. 48h Stunden schon wieder abgeklungen war und bereits 4h nach der intrazellulären Aufnahme ihren Höhepunkt fand.

In der Gruppe, die eine einmalige Injektion OVA-PMAOD-NP 168h vor Organentnahme erhielt, wurde dann wiederum ebenfalls eine Erhöhung des *foldchange* für alle Chemokine beobachtet, es wurde jedoch keine Signifikanz erreicht. Dieses Ergebnis war, überraschenderweise, gegensätzlich zu den Expressionsmustern der Gruppen der anderen Injektionszeitpunkte.

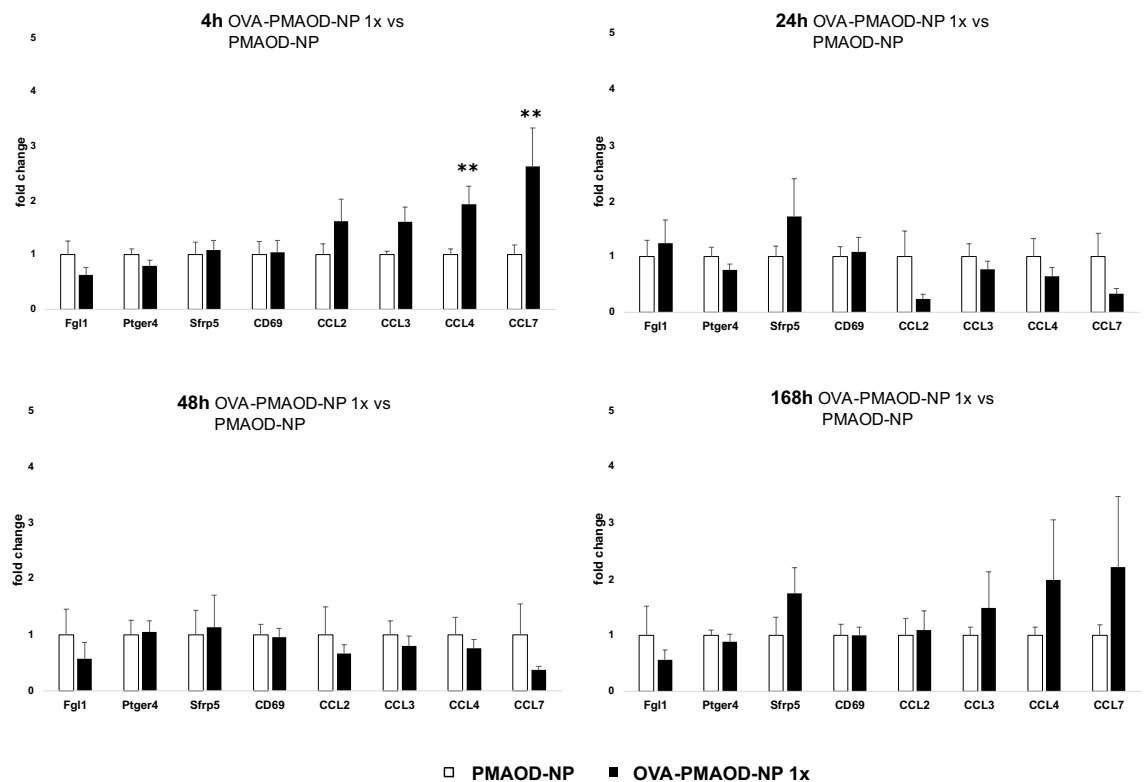


Abb. 19: Expressionsmuster der Markergene bei variierendem Injektionszeitpunkt der Nanopartikel, einmalige Injektion. (n=6)

Wildtyp-Mäuse erhielten zu unterschiedlichen Zeitpunkten je einmalig 100 µl OVA-PMAOD-NPs (2,5 mg/ml), die Kontrollgruppe erhielt 100 µl PMAOD-NPs (2,5 mg/ml). Die RNA der Gesamtleber (*input*) wurde extrahiert, die Expression der Zielgene mittels TaqMan® qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind auf das *housekeeping* Gen *tbp* normalisiert. Die Veränderung der Genexpression wurde auf die Expression der PMAOD-NPs -Gruppe bezogen. Mittelwert ± SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

Abbildung 20 stellt die Expression der Markergene in den zweimal injizierten Gruppen dar. Die Gruppe, die eine zweifache Injektion OVA-PMAOD-NP – jeweils 4h und 24h vor Organentnahme erhielt, zeigte die größte Erhöhung der Markergenexpression im Vergleich zur PMAOD-NP-injizierten Gruppe. Der

foldchange dieser Gruppe war höher als in der Gruppe, die nur eine einmalige Injektion von OVA-PMAOD-NP 4h vor Organentnahme erhielt. Im Vergleich zu, der mit PMAOD-NP behandelten Kontrollgruppe wurde eine signifikante Erhöhung der Chemokine CCL 2, CCL 4 und CCL 7 in der 24h und 4h vor Organentnahme behandelten Gruppe beobachtet.

Auch in der Gruppe, die ihre beiden Injektionen jeweils 48h und 4h vor Organentnahme erhielt, zeigte sich eine Erhöhung der Chemokinexpression, jedoch war die Erhöhung der Markergene etwas geringer als in der Gruppe, die 24h und 4h vor Organentnahme injiziert wurden. In dieser Gruppe wurde eine signifikante Erhöhung der Genexpressionshöhe in der OVA-PMAOD-NP 2x Gruppe nur für das Chemokin CCL7 beobachtet.

Dieser Effekt wurde in der Gruppe, die jeweils 168h und 4h vor Organentnahme injiziert wurden, nicht mehr beobachtet. In dieser doppelt injizierten Gruppe wurde im Vergleich zur PMAOD-NP -Gruppe eine verringerte Expression der Chemokine beobachtet. Die Herunterregulation der Markergene in der mit OVA-PMAOD-NP behandelten Gruppe im Vergleich zu der PMAOD-NP -Gruppe stand somit im Kontrast zu den Ergebnissen der anderen zweizeitig injizierten Gruppen. Das Ausbleiben einer intrazellulären Antwort in LSECs nach einer Woche könnte durch das Vorhandensein eines immunologischen Gedächtnisses erklärt werden.

Falls also nach 168h bereits eine vollständige Toleranz gegen das Peptid in den LSECs entwickelt wird, kommt es durch die erneute Präsentation des schon bekannten OVA I-Peptid zu keiner Immunreaktion mehr, dementsprechend werden keine Chemokine mehr produziert und die Erhöhung der Genexpression der Markergene bleibt aus.

Ergebnisse

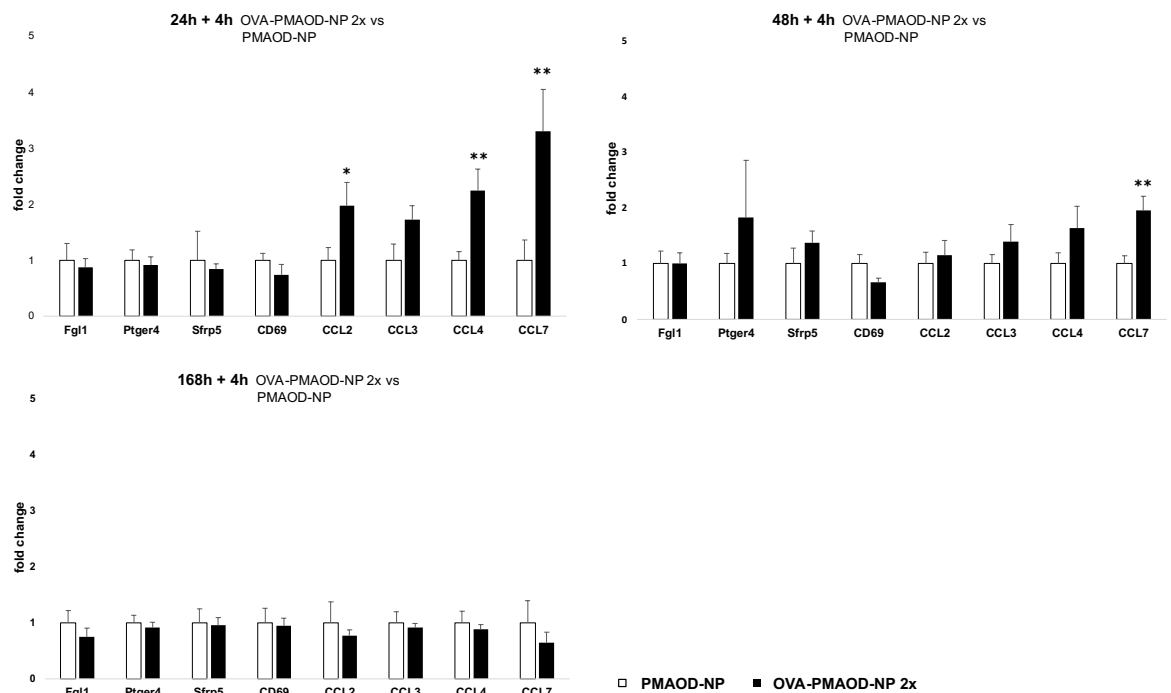


Abb. 20: Expressionsmuster der Zielgene bei variierendem Injektionszeitpunkt der Nanopartikel, zweizeitige Injektion. (n=6)

Wildtyp-Mäuse erhielten zu unterschiedlichen Zeitpunkten je zweimalig 100 µl OVA-PMAOD-NP (2,5 mg/ml), die Kontrollgruppe erhielt 100 µl PMAOD-NP (2,5 mg/ml). Die RNA der Gesamtleber (*input*) wurde extrahiert, die Expression der Zielgens mittels TaqMan® qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind auf das *housekeeping* Gen *tbp* normalisiert. Die Veränderung der Genexpression wurde auf die Expression der PMAOD-NP -Gruppe bezogen. Mittelwert ± SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

Die Ergebnisse dieses Versuchs lassen allgemein darauf schließen, dass die größten Veränderungen in der Expression der Markergene beobachtet werden können, wenn ein OVA I-Peptid 4h vor Organentnahme verabreicht wird. Hierbei wird dieser Effekt gering verstärkt, wenn zusätzlich 24h oder 48h Stunden vor Organentnahme eine zweite Injektion verabreicht wird. Entscheidend für die adäquate Reaktion der LSECs auf die Peptidinjektion scheint aber die Injektion 4h vor Organentnahme darzustellen. Die fehlende Expressionserhöhung der Markergene bei der Gruppe, die 168h sowie 4h vor Organentnahme injiziert wurde, lässt vermuten, dass LSECs nach Toleranzentwicklung auf ein präsentiertes Peptid keine erneute Reaktion mehr auf dieses Peptid zeigen. Da durch die zweizeitige Injektion der Peptid-gekoppelten-Nanopartikel 24h und 4h vor Organentnahme die stärkste Reaktion in den LSECs beobachtet werden konnte, wurde für weitere Versuche mit diesem Injektions-Schema gearbeitet.

3.5 Analyse der LSEC spezifischen Reaktion auf die Nanopartikel-vermittelte Peptidaufnahme im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde dargestellt, dass sich die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln in LSECs in Stabilin-2-defizienten Mäusen signifikant verringert.

Bisher ungeklärt bleibt jedoch, ob der Stabilin-2-Rezeptor für die adäquate Etablierung der LSEC-induzierten Immuntoleranz gegen ein transportiertes Peptid benötigt wird. Können LSECs auch bei fehlendem Stabilin-2-Rezeptor Toleranz vermitteln, ist die Relevanz des Rezeptors für die Etablierung der Toleranz fraglich. Ziel der folgenden Studie sollte sein zu überprüfen, ob bei fehlendem Stabilin-2-Rezeptor nicht nur die Aufnahme der Partikel vermindert ist, sondern auch die tolerogene Reaktion der LSECs als Antwort auf die Peptidpräsentation beeinträchtigt ist. Dies würde bestätigen, dass die suffiziente Stabilin-2-Präsentation auf LSECs benötigt wird, um Immuntoleranz gegen ein verabreichtes Peptid zu etablieren. Die intrazelluläre Reaktion der LSECs auf ein durch Nanopartikel transportiertes Peptid wird, wie in den vorherigen Versuchen, durch die Erhöhung der Markergene, welche aus den Daten der RNA-Sequenzierung ermittelt wurden, definiert. Es galt zu untersuchen, inwieweit sich die Expression dieser Markergene im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell im Vergleich zur Expression in Wildtyp-Mäusen unterscheidet.

Abbildung 21 stellt schematisch den Versuchsaufbau der durchgeführten Untersuchung dar. Im Versuch wurden 4 Gruppen mit je fünf Stabilin-2 Knockout-Mäusen und fünf wildtyp-Mäusen verglichen. Tiere beider Gruppen erhielten vierundzwanzig und vier Stunden vor Organentnahme entweder 100 µl PMAOD-NPs (2,5 mg/ml) zur Kontrolle oder 100 µl OVA-PMAOD-NPs (Konz. der Nanopartikel 2,5 mg/ml). Am Versuchstag wurden die Lebern der Tiere entnommen und die Gesamtleber-RNA (*input*) präpariert. In dieser wurde dann mittels TaqMan qRT-PCR® die Expression der Markergene, mit Ausnahme des Markergens CCL 5, in den Gruppen gemessen, die Kopienzahl der Gene wurde durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet und auf das *Housekeeping*-Gen *tbp* normiert.

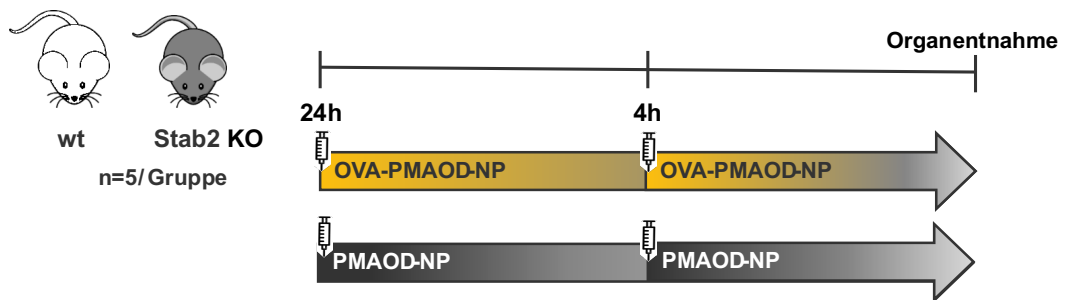


Abb. 21: Versuchsaufbau zum Vergleich der intrazellulären LSEC- Antwort von wildtyp und Stabilin-2 Knockout- Mäusen

Alle Tiere erhielten eine zweifache Injektion je 24h und 4h vor Organentnahme, entweder mit 100 μ l PMAOD-NPs oder 100 μ l OVA-PMAOD-NPs (je 2,5 mg/ml).

Die Unterschiede zwischen den Expressionshöhen der Markergene in den mit OVA-PMAOD-NPs-behandelten Gruppen wurde auf die Expression in den Kontrollgruppen normiert und der *foldchange* in der Höhe der Genexpression berechnet. Abbildung 22 zeigt den *foldchange* der Markergene in der Stabilin-2 Knockout-Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe.

3.5.1 Expressionsanalyse der Immuntoleranz-Markergene

Abbildung 22 zeigt die Markergene, die die durch LSECs-vermittelte tolerogene Immunantwort repräsentieren. Die Expression der Markergene variierte zwischen wildtyp und Stabilin-2 Knockout-Mäusen, und zwar sowohl in den mit PMAOD-NP-behandelten Gruppen als auch in den mit OVA-PMAOD-NP-behandelten Gruppen. Für die beiden Marker CD69 und Il1rn zeigte sich in der Stabilin-2 Knockout-Gruppe eine verringerte Expression nach Behandlung mit OVA-PMAOD-NP. Hierbei lässt sich jedoch nur von einem Trend sprechen, es wurde keine Signifikanz zwischen Stabilin-2 Knockout- und Kontrollgruppe erreicht. Für die beiden Marker Fgl1 und Sfrp5 wurde in den Stabilin-2 Knockout-Gruppen eine erhöhte Expression dieser Marker beobachtet, sowohl in den mit PMAOD-NP - als auch in den mit OVA-PMAOD-NP-behandelten Gruppen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren für alle Markergene gering, es wurden keine signifikanten Differenzen festgestellt. Dass die Genexpression der Marker, die auf die Etablierung der Immuntoleranz hindeuten, durch den fehlenden Stabilin-2-Rezeptor nicht ausblieben, könnte darauf hindeuten, dass LSECs trotz Stabilin-2 Defizienz immer noch in der Lage sind immunologische Toleranz zu etablieren.

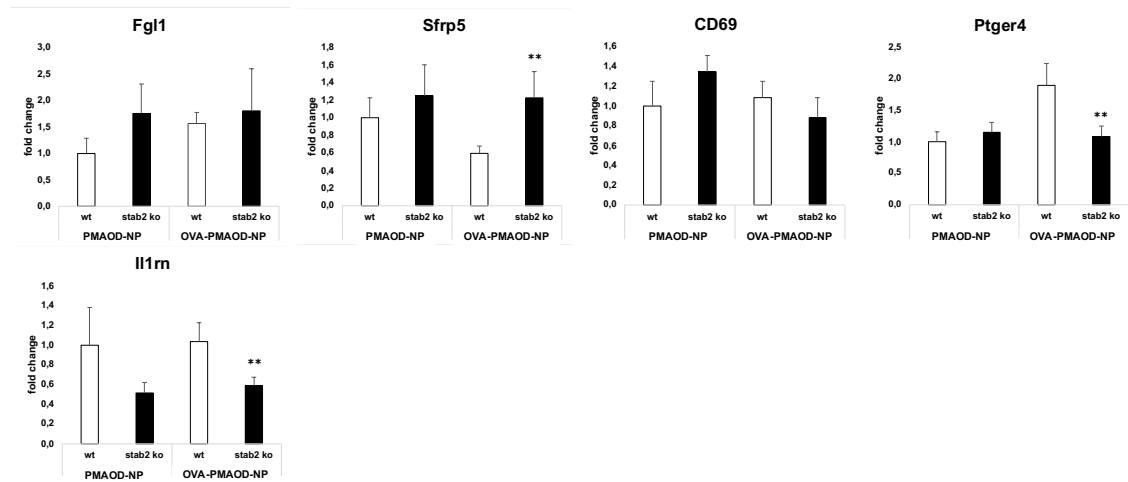


Abb. 22: Expressionsmuster der Immuntoleranz-Markergene in Kontrollgruppe und Stabilin-2 Knockout-Gruppe. (n=5)

Wildtyp-Mäuse und Stabilin-2 Knockout-Mäuse erhielten 24h und 4h vor Organentnahme 100 μ l OVA-PMAOD-NP (2,5 mg/ml) oder 100 μ l PMAOD-NP (2,5 mg/ml). Die RNA der Gesamtleber (*input*) wurde extrahiert, die Expression der Zielgene mittels TaqMan® qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind auf das *housekeeping* Gen *tbp* normalisiert. Die Veränderung der Genexpression wurde auf die Expression der Kontrollgruppe bezogen (wildtyp-Mäuse). (A) Markergene für tolerogene Immunantwort; (B) Markergene für Leukodiapedese. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

3.5.2 Expressionsanalyse der Leukozyten Diapedese-Markergene

In Abbildung 23 sind die Markergene, die die durch LSECs vermittelte Leukozyten-Diapedese darstellen, aufgetragen. Vergleicht man die Unterschiede zwischen den Expressionshöhen der mit PMAOD-NP-behandelten Kontrollgruppe und der mit PMAOD-NP behandelten Stabilin-2 Knockout-Gruppe, wird sichtbar, dass die Unterschiede sehr viel geringer ausgeprägt sind als die beobachteten Expressionshöhen der Immuntoleranz-Markergene. Sämtliche Marker waren in der mit OVA-PMAOD-NP-injizierten Stabilin-2 Knockout-Gruppe geringer exprimiert als in der mit OVA-PMAOD-NP injizierten wildtyp-Kontrollgruppe. Für die Chemokine CCL 4 und CCL 7 war diese Verringerung der Expressionshöhe zwischen mit OVA-PMAOD-NP-behandelten Stabilin-2 Knockout-Gruppe und der wildtyp-Kontrollgruppe signifikant. Es konnte beobachtet werden, dass die Defizienz des Stabilin-2 Rezeptors zu einer verringerten Expression der Markergene, die die LSEC vermittelte Leukodiapedese repräsentieren, führt.

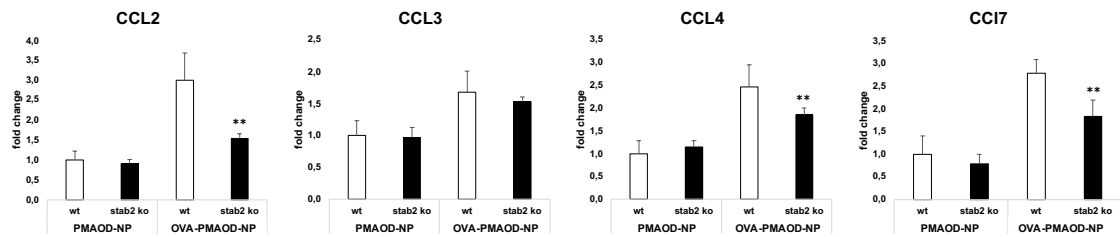


Abb. 23: Expressionsmuster der Leukozyten Diapedese-Markergene in Kontrollgruppe und Stabilin-2 Knockout-Gruppe. (n=5)

Wildtyp-Mäuse und Stabilin-2 Knockout-Mäuse erhielten 24h und 4h vor Organentnahme 100 μ l OVA-PMAOD-NP (2,5 mg/ml) oder 100 μ l PMAOD-NP (2,5 mg/ml). Die RNA der Gesamtleber (*input*) wurde extrahiert, die Expression der Zielgene mittels TaqMan® qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind auf das *housekeeping* Gen *tpb* normalisiert. Die Veränderung der Genexpression wurde auf die Expression der Kontrollgruppe bezogen (wildtyp-Mäuse). (A) Markergene für tolerogene Immunantwort; (B) Markergene für Leukodiapedese. Mittelwert $\pm$ SEM, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$.

Nach Zusammenführung der Ergebnisse dieses Versuches könnte gedeutet werden, dass das Fehlen des Stabilin-2-Rezeptors die Leukodiapedese beeinträchtigt. Dies wurde durch die verringerte Erhöhung der entsprechenden Markergene in der mit Peptid-behandelten Stabilin-2 Knockout-Gruppe im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrollgruppe gezeigt. Die Induktion der Toleranz könnte bei Stabilin-2 Defizienz jedoch unbeeinträchtigt bleiben, da die entsprechenden Markergene in der mit Peptid behandelten Stabilin-2 Knockout-Gruppe nicht signifikant geringer exprimiert waren als in der Wildtyp-Kontrollgruppe. Es wurde in allen Gruppen eine erhöhte Expression der Markergene in der mit Peptid behandelten Wildtyp-Kontrollgruppe im Vergleich zu der mit PMAOD-NP behandelten Gruppe beobachtet.

4 Diskussion

Einen neuen Therapieansatz für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu finden, beschäftigt die moderne Forschung schon seit Langem. Die heutigen Behandlungsmethoden fokussieren sich vor allem auf eine generalisierte Suppression des Immunsystems, was erhebliche Nebenwirkungen erzeugt. Eine erhöhte Infektanfälligkeit, verminderte Fruchtbarkeit und unterschiedlichste Nährstoffmängel stellen nur einige der häufigen Nebenwirkungen dar. (Shaw, Kaplan, and Kaufman 1996) Die Möglichkeit, diese Autoimmunerkrankungen durch eine selektivere Strategie, die spezifisch auf das auslösende Autoantigen gerichtet ist, zu behandeln, stellt deswegen einen aussichtsvollen neuen Therapieansatz dar. Durch Etablierung von Immuntoleranz gegen ein spezifisches autoreaktives Peptid könnten Autoimmunerkrankungen sehr spezifisch, und damit ohne großen Eingriff in das restliche Immunsystem, behandelt werden. Dies könnte die erheblichen Nebenwirkungen reduzieren und die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessern. Die immunsuppressiven Eigenschaften von Lebersinusoidalen Endothelzellen zu nutzen, um diese antigenspezifische Immuntoleranz zu etablieren, ist hierfür ein vielversprechender Ansatz. Mithilfe von Nanopartikeln können autoreaktive Peptide mit hoher Spezifität zu LSECs transportiert werden. (Heine et al. 2014) Daraufhin können LSECs Immuntoleranz gegen diese Peptide vermitteln, welche sich dann generalisiert im gesamten Körper manifestieren. Carambia et al. haben dieses Phänomen in ihren Arbeiten mehrfach - sowohl für die Behandlung von CD4-T Zellen als auch für CD8 T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankungen - im Mausmodell aufgezeigt. (Carambia et al. 2015; Carambia et al. 2021) Der Aufnahmemechanismus der Nanopartikel in LSECs ist bislang noch weitgehend unerforscht. Auch die Prozessierung der Partikel sowie die intrazellulären Veränderungen der LSECs, die nach Peptidaufnahme stattfinden, sind ungewiss. Ziel dieser Arbeit war, die Mechanismen zu untersuchen und neue Erkenntnisse über Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung der Nanopartikel in Bezug zur Toleranz-induzierenden Immunantwort zu generieren.

4.1 Relevanz des Stabilin-2 Rezeptors für die Aufnahme PMAOD-umhüllter Nanopartikel

In dieser Arbeit wurden einige der auf LSECs präsentierten Rezeptoren in Bezug auf die Relevanz für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln untersucht. Hierbei stellte sich der *Scavenger*-Rezeptor Stabilin-2 als relevanter Rezeptor für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln heraus. Bei dem Stabilin-2 Knockout-Mausmodell wurde eine signifikant verringerte Nanopartikel-Aufnahme im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet, jedoch wurde immer noch ein gewisser Anteil an Partikeln in LSECs aufgenommen. Möglicherweise kompensiert der Stabilin-1-Rezeptor die Funktion des Stabilin-2-Rezeptors, wenn dieser auf der Zelloberfläche fehlt. Interessanterweise zeigte der Stabilin-1-Rezeptor eine weitaus geringere Relevanz für die Aufnahme der eingesetzten Nanopartikel als der verwandte Stabilin-2-Rezeptor. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die zwei verwandten Rezeptoren auf der Zelloberfläche unterschiedliche Funktionen bedienen. Dass die Aufnahme der Nanopartikel durch Fehlen von Stabilin-2 nicht vollständig ausbleibt, könnte so begründet werden, dass ein weiterer oder mehrere andere Rezeptoren ebenfalls die PMAOD-umhüllten Nanopartikel aufnehmen. Dass viele der auf LSECs exprimierten *Scavenger*-Rezeptoren nicht spezifisch für ein bestimmtes Substrat sind, sondern unterschiedliche Moleküle binden, unterstreicht diese Hypothese. (Areschoug and Gordon 2009) Es ist außerdem zu erwähnen, dass in dieser Arbeit die Partikelaufnahme in LSECs mittels voreingenommenem Versuchsaufbau untersucht wurde. So wurden mit spezifischen Knockout-Mausmodellen die Relevanz vier verschiedener, auf LSECs stark exprimierter, Rezeptoren untersucht. (Bhandari et al. 2021; Pandey, Nour, and Harris 2020) Mittels unspezifischer Rezeptoranalyse können zukünftig andere Rezeptoren identifiziert werden und auf ihre Relevanz für die Aufnahme von Nanopartikeln untersucht werden. Nicht untersucht wurde im Rahmen dieser Arbeit der Mannose-Rezeptor, welcher sowohl auf LSECs als auch in hohem Maße auf Makrophagen exprimiert ist. (Linehan et al. 1999) Weil die Nanopartikel jedoch mit hoher Spezifität von LSECs aufgenommen werden, wurde der Mannose-Rezeptor in dieser Arbeit von vorne herein aus den Experimenten ausgeschlossen. Es ist bislang nicht geklärt, ob auch der Mannose-Rezeptor, der ebenfalls über eine hohe endozytotische Kapazität verfügt, als ein möglicher relevanter Rezeptor für die Partikelaufnahme infrage kommt. (Linehan et al. 2005; Linehan et al. 1999)

Zur Beantwortung der Frage, ob der Stabilin-1-Rezeptor die Funktion des Stabilin-2-Rezeptors kompensieren kann, sollten weitere Untersuchungen mit Stabilin-1/2-doppel Knockout-Mäusen erfolgen. Da die Fortpflanzungsrate der Stabilin-1/2-doppel Knockout-Mäuse vermindert und die Züchtung schwierig ist, sind Versuche mit diesen Tieren jedoch nicht leicht umsetzbar. Die verminderte Fortpflanzungsaktivität dieser Doppel-Knockout-Mäuse lässt jedoch auf die Relevanz der Stabiline im Organismus rückschließen. (Schledzewski et al. 2011) Die verwendeten Stabilin-2 Knockout-Mäuse weisen den Stabilin-2-Knockout im gesamten Organismus, also auf jeder Zelle, auf. In Anbetracht dessen wäre es also von großem Interesse, die Relevanz des Stabilin-2 -Rezeptors in anderen Organen zu untersuchen. So ist aus der Publikation von Bargheer et al. von 2015 (Bargheer et al. 2015) bekannt, dass neben der Leber auch die Milz einen großen Anteil an PMAOD-umhüllten Nanopartikeln aufnimmt. In diesem Kontext wäre es interessant zu untersuchen, ob die Partikelaufnahme in die Milz im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell ebenso verringert ist.

Die Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 9) zeigten, dass die verringerte Aufnahme von Nanopartikeln in LSECs zu einer erhöhten Aufnahme der Partikel in andere leberständige Leukozyten, wie zum Beispiel Kupffer-Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten führt. Über welchen Mechanismus die Aufnahme der Partikel bei Fehlen des Stabilin-2-Rezeptors vermehrt in andere Leber APCs führt, ist bislang ebenfalls unbekannt. Um dieser Frage nachzugehen, wäre es sinnvoll, die Bluthalbwertszeit der Partikel in Wildtyp- und Stabilin-2 Knockout-Mäusen zu vergleichen. Dies könnte die Frage beantworten, ob die Partikel im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell länger im Organismus zirkulieren oder kompensatorisch schneller in andere Zelltypen aufgenommen werden. Außerdem würde dies wichtige Informationen in Bezug auf die Verträglichkeit der Partikel geben, auch im Hinblick auf mögliche klinische Studien. Da die PMAOD-umhüllten Nanopartikel in der Leber auch von Kupffer-Zellen in hoher Konzentration phagozytiert werden, muss außerdem untersucht werden, welche Auswirkungen die vermehrte Phagozytose der Partikel in leberständige Makrophagen auf die Immunantwort hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten in ihrer Zusammenschau darauf hin, dass der Stabilin-2 Rezeptor maßgeblich für die Partikelaufnahme in LSECs verantwortlich ist. Es wurde sowohl mittels *Magnetic activated cell sorting* als auch mittels Durchflusszytometrie gezeigt, dass die Partikelaufnahme bei fehlendem Stabilin-2 signifikant verringert ist. In Folgestudien gilt es nun zu untersuchen, welche

Auswirkungen der Knockout von Stabilin-2 für die Aufnahme, Verteilung und Toxizität der Nanopartikel hat.

4.2 Relevanz des Stabilin-2 Rezeptors für Etablierung von Immuntoleranz

Durch die Versuche mit den Stabilin-2 Knockout-Mäusen wurden zwei wichtige Erkenntnisse generiert: Zum einen wurde nachgewiesen, dass durch Fehlen des Stabilin-2 Rezeptors die Nanopartikelaufnahme in LSECs verringert ist. Zum anderen wurde im zuletzt aufgeführten Versuch belegt, dass auch die intrazellulären Veränderungen in den LSECs, also die Hochregulierung der Gene, die die Leukodiapedese und T-Zell vermittelte Toleranz darstellen, verringert ist. Eine genauere Definition und Erläuterung der Funktion der Markergene erfolgt im Kapitel 4.4. Bemerkenswert ist, dass besonders die Chemokinexpression, welche den ersten Schritt in der Anlockung von T-Lymphozyten in die Sinusoide darstellt, durch Fehlen des Stabilin-2-Rezeptors beeinträchtigt ist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Expression der Marker, die die tolerogene Immunantwort durch LSECs darstellen, unbeeinträchtigt blieb. Dies lässt darauf deuten, dass auch die geringe Aufnahme an Partikeln in den Stabilin-2-defizienten Mäusen ausreichen könnte, eine tolerogene Antwort in LSECs hervorzurufen.

Relevant wäre es nun in einem nächsten Schritt zu untersuchen, ob der Stabilin-2-Rezeptor nicht nur essenziell für die Aufnahme der Partikel, sondern auch für die Entwicklung der Immuntoleranz ist. Es gilt herauszufinden, ob die Reaktion der LSECs auf das transportierte Peptid auch im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell ausreicht, um regulatorische T-Zellen zu generieren. Hierfür könnten Experimente mit transgenen T-Zellen durchgeführt werden um zu untersuchen, ob durch die verringerte Nanopartikelaufnahme im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell auch eine verringerte Aktivierung dieser transgenen T-Zellen zur Folge hat. Die Arbeitsgruppe von Carambia et al. hat in ihren Arbeiten gezeigt, dass durch die Nanopartikel-vermittelte Aufnahme von autoreaktiven Peptiden, CD4- sowie CD8-vermittelte Autoimmunerkrankungen im Mausmodell behandelt werden können. (Carambia et al. 2015; Carambia et al. 2021) Ob dieser Effekt im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell nicht mehr stattfindet, ist bislang ungeklärt. Der Nachweis, dass der Stabilin-2 Rezeptor auch für die Etablierung der Immuntoleranz und damit essenziell für den propagierten Therapieansatz ist, könnte die Relevanz des Rezeptors noch einmal unterstreichen. Wenn die Etablierung der Immuntoleranz aber auch im Stabilin-2 Knockout-Mausmodell uneingeschränkt funktionierte, hätte

das Vorhandensein des Rezeptors keine Relevanz für die Etablierung von Immuntoleranz durch LSECs. Fraglich ist also, ob die reduzierte Aufnahme von Peptid-gekoppelten Nanopartikeln in den Knockout-Mäusen immer noch reicht, um die LSECs so zu stimulieren, dass sie die Immuntoleranz gegen das transportierte Peptid etablieren. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, sollte auch im Stabilin-2 Knockout-Modell untersucht werden, ob die Experimentelle Autoimmun-Enzephalitis mittels Nanopartikel-Behandlung zu therapieren ist.

4.3 Limitationen der vorliegenden Arbeit im Kontext der Partikelauswahl

Zur Untersuchung der Aufnahme der Partikel in LSECs wurde mit fluoreszierenden QuantumDots gearbeitet. Für die weiteren Studien mit dem NuTRAP-Mausmodell wurden dann superparamagnetische Eisenoxid-Partikel (SPIOs) genutzt. Beide Partikel waren mit einem hydrophilen PMAOD-Polymer versehen und wurden den Mäusen retroorbital injiziert. Mit einer Nanopartikelkonzentration von 2,5 mg/ml und einem Injektionsvolumen von 100 µl wurden alle Experimente mit einer einheitlichen Dosis durchgeführt, um die beobachteten Effekte in den Versuchen miteinander vergleichen zu können. Diese festgelegte Injektionsmenge führte zu einer messbaren Aufnahme von QDs in LSECs und zusätzlich zu einer adäquaten transkriptionellen Antwort in den LSECs. Die Peptidmenge, die die Mäuse pro Nanopartikel erhielten, belief sich auf 18 ng. Diese Menge deckt sich mit der Menge in den von Carambia et al. durchgeführten Studien, die mit dieser Menge an Peptid erfolgreich Immuntoleranz in den unterschiedlichen Krankheitsmodellen etablieren konnten. (Carambia et al. 2015; Carambia et al. 2021) Die Konzentration der Partikel blieb in jedem Versuch gleich. Weil davon ausgegangen wurde, dass nur die PMAOD-Hülle für den Aufnahmemechanismus der Partikel verantwortlich ist, konnten die Eigenschaften des Partikelkerns vernachlässigt werden. Da die Aufnahme der SPIOs in die LSECs nicht mittels MACS untersucht wurde, bleibt ungeklärt, ob die Aufnahme der SPIOs der Aufnahme von QuantumDots - wie angenommen - wirklich gleicht. Die *in vivo*-Applikation von fluoreszierenden Nanopartikeln hat Einfluss auf die dreidimensionale Faltung und Funktion von Proteinen, damit ist die Gabe fluoreszierender Nanopartikel gesundheitsschädlich. (Kunachowicz et al. 2022) Partikel, die lediglich aus der hydrophil-amphiphilen Hülle, ohne den Nanopartikel als Kern bestehen, könnten einen für den Mensch ungefährlichen Behandlungsansatz darstellen. Die Herstellung solcher Partikel stellt daher eine wichtige Rolle in der

Weiterentwicklung des hier aufgezeigten Therapieregimes dar. Auch für diese nächste Generation von Partikeln sollte die Rolle des Stabilin-2 Rezeptors für die Aufnahme dieser Nanopartikel untersucht werden. Eine Umhüllung mit PMAOD stellt jedoch nicht die einzige Möglichkeit dar, Nanopartikel mit hoher Spezifität zu LSECs zu transportieren. Liu et al. zeigten in mehreren ihrer Arbeiten, dass auch eine Umhüllung mit dem hydrophilen *Poly(lactid-co-glycolic-acid)*, abgekürzt PLGA, eine Möglichkeit darstellt, Nanocarrier spezifisch zu LSECs zu transportieren. (Liu et al. 2019; Liu et al. 2021) Ein Vorteil, den PLGA im Gegensatz zu PMAOD bietet, ist, dass die Umhüllung biokompostierbar ist und einen bereits von der FDA zugelassenen Medikamenten-Carrier darstellt. (Soppimath et al. 2001; Kumari, Yadav, and Yadav 2010; Shive and Anderson 1997) Im Gegensatz zu den PMAOD-Partikeln werden Nanopartikel mit einer PLGA-Umhüllung nicht spezifisch von LSECs aufgenommen: für die spezifische Aufnahme der Partikel in LSECs ist die Kopplung eines ApoB-Peptids an den PLGA-NP nötig. Dieses ApoB-Peptid fungiert als Stabilin-spezifisches Substrat. (Liu et al. 2019) Durch die Kopplung von ApoB sollen die PLGA-umhüllten Nanopartikel über den Stabilin-1 und -2 Rezeptor in LSECs endozytiert werden. Dies wird in den Arbeiten von Liu et al. durch die spezifische Verteilung fluoreszierender OVA-Peptide in der Leber demonstriert. (Liu et al. 2019) Eine spezifischere Analyse der LSECs nach Partikelinjektion durch Zellseparation oder Durchflusszytometrie erfolgte jedoch nicht. Des Weiteren zeigen die Arbeiten von Liu et al. wichtige Erkenntnisse über den Einfluss der Partikelgröße auf. Die in ihren Studien genutzten Partikel hatten eine Größe von 230nm, da größere Partikel hauptsächlich von Kupffer-Zellen sowie dendritischen Zellen phagozytiert wurden. Im Vergleich hierzu hatten die in dieser Arbeit verwendeten Partikel eine Größe von 25nm. Ob dieser deutliche Größenunterschied der Partikel einen Einfluss auf die LSEC spezifische Aufnahme hat, bleibt ungeklärt.

Mithilfe der LSEC-spezifischen, PLGA-umhüllten Nanocarrier konnte im Mausmodell eine tolerogene Immunantwort gegen Allergene hervorgerufen und somit eine allergen-induzierte Atemwegsinfektion verhindert sowie behandelt werden. Die Arbeiten von Liu et al. zeigen auf, dass die tolerogenen Eigenschaften der LSECs nicht nur zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen genutzt werden sollten, sondern auch zur Bekämpfung von Allergien und Anaphylaxie eingesetzt werden könnten. (Liu et al. 2021; Liu et al. 2019) Damit wird verdeutlicht, dass der Einsatz LSEC-spezifischer Nanopartikel nicht nur auf die Toleranzentwicklung gegen autoimmune Peptide beschränkt werden sollte. Der Einsatz von PLGA als Umhüllung von Nanopartikeln bietet im Gegensatz zu

PMAOD den Vorteil, dass er bereits etabliert und FDA-zugelassen ist. Ob die Umhüllung mit PMAOD oder PLGA einen signifikanten Vorteil in der LSEC-spezifischen Immunantwort hat, bleibt unklar. Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob die Weiterentwicklung von Stabilin-2-spezifischen Nanopartikel-Konstrukten für die Induktion der Immuntoleranz möglicherweise Vorteile gegenüber den konventionellen PLGA-Nanopartikeln haben könnte.

Ein weiterer Faktor, welcher Einfluss auf die LSEC-spezifischen Partikelaufnahme haben kann und eine Limitation für die Ergebnisse darstellt, ist die genaue Zellmorphologie der LSECs. Aus mehreren Studien ist bekannt, dass sich die Morphologie und der Zellaufbau der LSECs entlang der verschiedenen Leberzonen voneinander unterscheiden. Unterschiedliche Rezeptoren, die eine Rolle im *Homing* von Lymphozyten oder in der *Scavenger*-Funktion der Zelle spielen, werden nur in bestimmten Arealen der Leberzonen exprimiert; so wird CD31 nur auf gering fenestrierten LSECs um die Zentralvene herum exprimiert. (Vonnahme 1993). Außerdem ist zu beachten, dass das Alter der Mäuse einen Einfluss auf Aufnahmekapazität der Partikel spielen könnte. Neue Arbeiten zeigen, dass sich die Fenestrierung der LSECs mit steigendem Alter zurückbildet. (Szafranska et al. 2021) Simultan dazu könnte sich so auch die Endozytosefähigkeit bzw. die Rezeptordichte auf LSEC mit dem Alter reduzieren. Die bei der vorliegenden Arbeit genutzten Tiere wiesen bei Organentnahme ein Alter von 9-12 Wochen auf. Interessant wäre es in Folgestudien zu untersuchen, inwieweit sich das Alter der Mäuse auf die Endozytose der Nanopartikel auswirkt. Neben der Endozytosefähigkeit gilt es außerdem herauszufinden, inwieweit das Altern der Endothelzellen einen Einfluss auf ihre einzigartige Fähigkeit hat, naive CD8⁺ T-Zellen zu tolerogenen T-*memory* Zellen zu induzieren. (Dudek et al. 2022)

4.4 Analyse der Toleranzinduktion durch Bestimmung des Translatomes

Die mittels TRAP-Immunpräzipitation isolierte RNA wurde sequenziert, so konnte Aufschluss über den Translationsstatus der LSECs nach Partikelinjektion gewonnen werden. Die PMAOD-NP-Gruppe diente in diesem Versuch als Kontrollgruppe, da diese kein OVA I-Peptid, sondern lediglich den leeren Nanopartikel injiziert bekam und somit keine Reaktion auf ein Peptid erwartet wurde. Durch diese ungerichtete Analyse der endothelialen mRNA mittels Sequenzierung wurden erstmals die transkriptionellen und translationalen

Veränderungen in LSECs nach Peptidaufnahme untersucht. Die Sequenzierung der an den Ribosomen gebundenen *messengerRNA* ermöglicht es, nur diejenigen Gene zu analysieren, die nach der Peptidinjektion an den Ribosomen translatiert werden und zu untersuchen, welche Proteine nach Peptidaufnahme verstärkt produziert werden. Hierdurch konnte eine LSEC-Gensignatur identifiziert werden, die die spezifische transkriptionelle Reaktion von LSECs auf die Aufnahme von PMAOD-OVA-SPIOs darstellt. Dadurch kann sehr genau beurteilt werden, inwieweit sich diese intrazelluläre Antwort der LSECs bei fehlendem Stabilin-2 Rezeptor verändert. Durch den Vergleich der Gruppen kann außerdem die Relevanz der doppelten Injektion im Vergleich zur einzelnen Injektion beurteilt werden. Interessanterweise sind die Unterschiede in der Genexpression zwischen den Gruppen, die einmalig und zweimalig injiziert wurden, am größten: Die ungerichtete Analyse des Translatoms zeigte, dass nach zweifacher Injektion mit Peptid-gekoppeltem Nanopartikel neben Hochregulierung von Genen, die relevant für die humorale Immunantwort sind, auch Gene, die für den Ribosomenstoffwechsel wichtig sind, hochreguliert werden. (Abb. 17). Eine verstärkte Expression von Ribosomen in LSECs könnte eine verstärkte Proteinbiosynthese widerspiegeln, die für die erhöhte Chemokinproduktion benötigt wird, welche wiederum für die erfolgreiche Kommunikation der Immunzellen benötigt werden. Durch eine höhere Anzahl an Ribosomen wird deutlich, dass LSECs durch die Aufnahme der Partikel „aktiv“ werden und die Proteinbiosynthese erhöhen. (Petibon et al. 2021) Dieser Effekt wird vor allem durch die zweizeitige Injektion von Peptid in LSECs hervorgerufen. Neben einer Hochregulierung der Gene für Ribosomenstoffwechsel und Immunantwort wurden durch die Peptidgabe auch Signalwege der Fettsäuresynthese hochreguliert. Ob die Peptidaufnahme in LSECs auch eine Veränderung im Fettstoffwechsel hervorruft, ist bislang unerforscht. Jedoch zeigte ein Paper von McMahan et al. aus dem Jahr 2016, dass freie Fettsäuren zur einer Herunterregulation der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch LSECs führt. (McMahan et al. 2016) Ob auch die erhöhte Fettsäuresynthese ein Teil der tolerogenen Antwort durch LSECs ist, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Um aus den mittels Sequenzierung identifizierten Genen die Markergene herauszufiltern, die die LSEC vermittelte Diapedese von Immunzellen sowie die tolerogene Immunantwort repräsentieren, erfolgte eine Sortierung anhand eigens festgelegter Kriterien. Zur Sortierung wurden alle Gene herangezogen, die einen festgelegten *foldchange* und p-Wert erreichten. Gene, die diese eigens

festgelegten Sortierungskriterien nicht erreichten, wurden nicht in Betracht gezogen. Dies kann zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen, da eventuell wichtige Marker nicht in die weiteren Versuche mit eingeschlossen wurden. Ziel dieser Sortierung war es, aus der Vielzahl der Sequenzierungsdaten Proteine zu identifizieren, die bei einer von LSECs ausgehenden tolerogenen Immunreaktion verstärkt exprimiert werden.

Durch die Sortierung wurden 10 Gene als Markergene festgelegt, die die LSEC-vermittelte Reaktion auf die Nanopartikel-vermittelte Autoantigenbehandlung charakterisieren. Diese 10 Gene lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Gene, die eine Rolle in der Leukodiapedese entlang der Sinusoide spielen und Gene, die eine Rolle in der Induktion der Immuntoleranz spielen. Als fünf Marker der Leukodiapedese wurden die Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und CCL7 identifiziert. Die 5 Gene, die eine Rolle in der Induktion von Immuntoleranz spielen, sind Ptger4, Fgl1, CD69, Sfrp5 und Il1rn. Im Folgenden soll die Relevanz der ausgewählten Marker im Kontext dieser Arbeit kurz erläutert werden um zu verdeutlichen, warum genau diese Proteine als Markergene aus den Sequenzierungsdaten ausgewählt wurden.

Die Chemokine CCL2-5 sowie CCL7 stellen Proteine dar, die wichtig für die Chemoattraktion und Leukozytendiapedese entlang des Endothels sind. CCL2 dient der Anlockung von Leukozyten, vor allem Makrophagen und Monozyten, führt aber auch zur Expression von weiteren Chemokinen. (Singh, Anshita, and Ravichandiran 2021) CCL3, ein weiteres Chemokin, wurde 1988 erstmals als Macrophage-inflammatory-protein (MIP) beschrieben. (Wolpe et al. 1988) Auch CCL3 spielt eine Rolle in der Anlockung von Leukozyten. Beschrieben wurde die Rolle von CCL3 sowohl in akuter Inflammation, aber auch im Kontext der Aktivierung von tolerogenen T-Zellen. (Ntanasis-Stathopoulos, Fotiou, and Terpos 2020) CCL4 stellt ein sehr bekanntes Chemokin dar, welches vor allem unter inflammatorischen Bedingungen an der Chemoattraktion von unreifen dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten und natürlichen Killer-Zellen beteiligt ist. (Maurer and von Stebut 2004; Taub et al. 1995). Außerdem bewirkt CCL4 die Induktion der Calcium-Freisetzung in unreifen Lymphozyten. (Honczarenko et al. 2002) Endothelial exprimiertes CCL5, auch RANTES genannt, ist für die selektive Diapedese und Transmigration von Th1-Zellen zuständig. (Kawai et al. 1999) CCL7 wird auch unter physiologischen Bedingungen konstant von Endothelzellen produziert, die Expression wird unter inflammatorischen Bedingungen erhöht und dient ebenso der Anlockung von Leukozyten. (Bardina et al. 2015). Neben mehreren Chemokinen, die durch die RNA-Sequenzierung

detektiert wurden, sind auch mehrere Gene, die eine Rolle in der Immuntoleranz spielen, entdeckt worden. Als erster Marker wurde der Prostaglandin E-Rezeptor 4 (Ptger4) als stark exprimiert entdeckt. Dieser *high-affinity* Rezeptor bindet Prostaglandin E2. PGE2 supprimiert die Il-2 Produktion und Empfänglichkeit in T-Zellen und führt dadurch zu einer unspezifischen Unterdrückung von T-Zell Aktivierung und Proliferation. Durch PGE2 wird der Phänotyp CD4-positiver Zellen von Th1-Zellen zu weniger Gewebe-angreifenden Th2- oder Th17- Zellen vermittelt. (Kalinski 2012) So kann PGE2, mit dem entsprechenden Prostaglandin E Rezeptor 4, auch zum toleranz-vermittelnden Effekt der LSECs beitragen. Fibrinogen-like-protein 1 (FGL-1) ist ein Protein, welches ausschließlich in der Leber produziert und ausgeschüttet wird. (Yan et al. 2004) Fgl-1 stellt den Ligand des LAG3-Rezeptors dar, ein inhibitorischer Rezeptor, der in mehreren Reviews als vielversprechender Immun-Checkpoint Rezeptor beschrieben wird. (Qian et al. 2021; Ruffo et al. 2019). Die Bindung von FGL-1 an LAG3 führt zu T-Zell Depletion, T-Zell Funktionseinschränkung und der Aktivierung von regulatorischen, Il-10-produzierenden Plasma-Zellen. (Lino et al. 2018) FGL1 stellt also einen Rezeptor dar, der sehr potent in der Suppression des Immunsystems ist. CD69 ist ein Rezeptor aus der Familie der Typ C-Lektine. Der Rezeptor ist auf vielen residenten Antigen-präsentierenden Zellen zu finden und ist ein klassischer Marker für die frühe Lymphozytenaktivierung. (López-Cabrera et al. 1993) Besonders involviert ist der Rezeptor in der Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu FoxP3+ regulatorischen T-Zellen, und trägt dadurch auch zur Ausbildung der LSEC-vermittelten Toleranz bei. (Lieberman et al. 2012) *Secreted frizzled related protein-5* (Sfrp-5) ist ein Adiponektin, welches über den WNT-Signalweg anti-inflammatorisch wirkt. (Ouchi et al. 2010) Auch dieses Protein wurde mittels Sequenzierung als stark transkribiert in der ribosomalen LSEC-RNA entdeckt. Als letzter Marker, der eine Rolle zu den tolerogenen Effekten der LSEC beitragen könnte, ist der sogenannte Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (Il1rn). Il1rn stellt einen von 2 Antagonisten des Interleukin-1 Rezeptors dar. Der Interleukin 1-Rezeptor Antagonist wirkt natürlicherweise anti-inflammatorisch. (Dinarello 2010) So ist aus Studien bekannt, dass Il1rn-defiziente Mäuse in kürzester Zeit auto-inflammatorische Erkrankungen, wie zum Beispiel eine destruktive Arthritis, entwickeln. (Horai et al. 2000)

Die ausgewählten Proteine wurden in den aufgeführten Arbeiten mit einer Anlockung und der Kommunikation von Immunzellen sowie der Etablierung immunologischer Toleranz in Verbindung gebracht. Somit spielen die Proteine eine potenzielle Rolle in der durch LSECs vermittelten Induktion von Immuntoleranz

gegen die verabreichten Peptidkomplexe. Eine spezifischere Untersuchung der unterschiedlichen Proteine im Kontext der Nanopartikelaufnahme in LSECs ist bislang jedoch nicht erfolgt. Auch dies stellt eine Limitation der Ergebnisse dar. Um eine objektivere Messung zu erreichen, sollten RNA-Sequenzierungsdaten aus anderen LSEC-Studien herangezogen und mit dem Datensatz aus dieser Arbeit verglichen werden. Interessant wäre es in diesem Kontext zu untersuchen, ob die identifizierten Marker auch in den Studien von Carambia et. al. sowie Liu et. al. erhöht sind, da hier eine messbare Toleranzinduktion durch erfolgreiche T-Zellinduktion bereits nachgewiesen wurde. (Carambia et al. 2021; Liu et al. 2019) Bislang erfolgte keine mRNA-Charakterisierung von stimulierten LSECs, weswegen die detektierten Proteine mittels eigens festgelegter Sortierungskriterien ausgewählt wurden - auch dies stellt eine Limitation in der Interpretation der Daten dar. Die Gesamtheit der sequenzierten RNA-Daten muss im Laufe neuer Erkenntnisse immer wieder neu betrachtet werden. Die Identifizierung anderer, bislang nicht als relevant bezeichneter Markergene können die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen.

Die in der Sequenzierung identifizierte Markergenerhöhung wurde ebenfalls in einer Untersuchung mittels quantitativer *realtime*-PCR beobachtet. Somit konnte die Expression der Markergene gleichermaßen durch RNA-Sequenzierung und qRT-PCR bestimmt werden. Die LSEC-induzierte Leukozyten-Diapedese und Immuntoleranzentwicklung konnte durch Messung der Expressionshöhen der entsprechenden Markergene einfach nachverfolgt werden. Die Möglichkeit, diese LSEC-spezifische immunologische Antwort ohne Sequenzierung endothelialer RNA oder Aktivierung transgener T-Zellen zu bestimmen, stellt eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit dar.

4.5 Kontextbezogene Abwägung der Wahl des Injektionszeitpunkt und der Injektionsmenge

Mittels RNA-Sequenzierung wurde festgestellt, dass die zweifache Injektion von Peptid-gekoppelten Nanopartikeln einen messbaren Unterschied zur einfachen Injektion hervorruft. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der Markergene in der zweifach injizierten Gruppe, im Vergleich zur einfach injizierten Gruppe. (Abbildung 16) Dieses Ergebnis veranlasste dazu, die Relevanz von Injektionszeitpunkt und die Injektionsmenge der peptidgekoppelten Nanopartikel weiter zu untersuchen. Da die Ergebnisse der Sequenzierung deutlich zeigen, dass der Injektionszeitpunkt eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Antwort

der LSECs spielt, war es von großem Interesse, die zeitliche Komponente der Nanopartikel-Injektion zu untersuchen. Bislang hat es keine Studien gegeben, bei denen der Unterschied zwischen mehreren Injektionszeitpunkten von Peptid-gekoppelten Nanopartikeln verglichen wurden.

Für die Versuche wurde die einfache Injektion von Peptid-gekoppeltem Nanopartikeln mit der zweizeitigen Injektion verglichen. Da die injizierte Dosis der Partikel immer die gleiche war, erhielten die zweizeitig injizierten Mäuse die doppelte Menge an Peptid. Der Versuch zeigte eindrucklich, dass die Injektion vier Stunden vor Organentnahme den größten Effekt auf die intrazellulären Veränderungen von LSECs hatte. Dies verdeutlichte, dass die Chemokinexpression, die unter anderem als Antwort auf die Peptidgabe in LSECs passiert, nach nur vier Stunden ihr Maximum erreichte. Interessanterweise konnte eine doppelte Injektion diesen Effekt nur erhöhen, wenn die vorangegangene erste Injektion nicht länger als 24 Stunden vor Organentnahme zurücklag. Eine Peptidgabe, die länger als 24 Stunden vor der Organentnahme passierte, hatte dann keinen zusätzlichen Effekt mehr auf die LSECs. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Injektion, die 4 Stunden vor Organentnahme erfolgte, die Wirkung der Injektion, die 168 Stunden vor Organentnahme erfolgt war – also die Erhöhung der Markergene der Leber-RNA – sozusagen ‚auslöschte‘. Die gewonnenen Erkenntnisse über Menge und Injektionszeitpunkt der Nanopartikelbehandlung sind für die weitere Untersuchung der LSEC-abhängigen Therapie von Autoimmunerkrankungen von Relevanz. In den Arbeiten von Antonella Carambia aus dem Jahr 2015 sowie 2021 erfolgte die Applikation der Partikel einmalig 24h vor der Organentnahme. Auch in den Arbeiten von Qi Liu aus den Jahren 2019 und 2021 wurden die Peptid-geladenen Nanopartikel 24h vor Organentnahme appliziert. (Liu et al. 2021; Liu et al. 2019; Carambia et al. 2015; Carambia et al. 2021) Besonders interessant ist es zu untersuchen, ob die Induktion der CD8- sowie CD4-vermittelten Immuntoleranz, wie sie in den unterschiedlichen Arbeiten demonstriert wird, durch eine Veränderung des Injektionszeitpunktes sowie des Injektionsvolumens beeinflusst wird. In weiteren Untersuchungen gilt es herauszufinden, wie viele Peptid-Injektionen benötigt werden, um eine vollständige Toleranz gegen ein transportiertes Peptid zu etablieren und ob dadurch eine permanente Immunisierung erreicht werden kann, die bestenfalls lebenslänglich anhält.

4.6 Ausblick

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse dieser Arbeit die Relevanz des Stabilin-2 Rezeptors für die Aufnahme der PMAOD-umhüllten Partikel. Ob der Rezeptor jedoch essenziell für die Induktion der LSEC-vermittelten Immuntoleranz ist, bleibt hier ungeklärt. Es wurden außerdem erste Erkenntnisse über die intrazellulären Vorgänge der LSECs nach Peptidaufnahme gewonnen. Diese Arbeit bildet somit einen wichtigen Beitrag und kann als Grundlage für weitere Untersuchungen in diesem Forschungsbereich dienen. Besonders die Identifikation einer Gensignatur, die spezifisch für die Reaktion von LSECs auf PMAOD-OVA I-SPIOs ist, stellt einen wichtigen Beitrag dar, da sie durch eine ungerichtete Analyse etabliert wurde. Diese Gensignatur kann in Folgestudien als Marker der adäquaten LSEC-Reaktion auf ein mit Peptid-gekoppelten Nanopartikel verwendet werden. Es gilt, den Aufnahmemechanismus, die Prozessierung und die Verträglichkeit der Peptid-gekoppelten Partikeln weiter zu untersuchen, um diese wichtigen Punkte für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien von Autoimmunerkrankungen mit einzubeziehen. Bedeutsam ist es in diesem Kontext, einen geeigneten *Nanocarrier* zu finden, der zum einen gesundheitlich unbedenklich ist und zum anderen immer noch die gleiche Spezifität für LSECs aufweist wie die PMAOD-umhüllten QDs und SPIOs. Eine Möglichkeit wäre hierfür, die reine Partikelhülle als stabilen *Carrier* herzustellen und an diesen *Carrier* ein Autoantigen anzukoppeln. So würden die Partikel durch die PMAOD-Hülle immer noch mit hoher Spezifität in LSECs aufgenommen werden, die schädlichen Eigenschaften des Partikelkerns wären jedoch irrelevant. Die Möglichkeit, dass LSECs durch ein immunologisches Gedächtnis permanente Toleranz gegen ein Peptid etablieren könnten, lässt hoffen, dass mittels Nanopartikel-vermittelter Peptidbehandlung der LSECs eine effiziente und langfristige Behandlungsoption für Autoimmunerkrankungen generiert werden kann.

5 Zusammenfassung

Einen Weg zu finden, um Autoimmunerkrankungen effizient, möglichst nebenwirkungsarm und ohne große Eingriffe in das Immunsystem zu behandeln, hat die moderne Forschung schon seit geraumer Zeit beschäftigt. Zur Behandlung dieser vielfältigen Erkrankungen wird untersucht, immunologische Toleranz gegen die krankheitsauslösenden autoreaktiven Antigene zu etablieren. Im Hinblick auf dieses aussichtsvolle Ziel stellt sich das Gebiet der Nanomedizin als vielversprechender neuer Therapieansatz dar. Mittels kleinster Nanopartikel können therapeutische Substanzen, wie zum Beispiel pharmakologisch wirksame Moleküle, zu bestimmten Zelltypen transportiert werden. Zur Induktion immunologischer Toleranz stellt die Erforschung Leber-sinusoidaler Endothelzellen (LSECs) ein wichtiges Ziel dar. Physiologisch vermitteln LSECs, auch im inflammatorischen Milieu, Immuntoleranz. Carambia et al. ist es gelungen, autoreaktive Peptide mittels kleinster PMAOD- umhüllter Nanopartikel in LSECs einzuschleusen. LSECs konnten daraufhin immunologische Toleranz gegen diese Peptide vermitteln, und so konnten sowohl CD4- als auch CD8- T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankungen im Mausmodell behandelt werden. Die mit PMAOD- umhüllten Partikel werden mit hoher Spezifität von LSECs endozytiert. Über welchen Rezeptor die Endozytose vermittelt wird und wie diese Partikel intrazellulär prozessiert werden, ist bislang unklar.

Ziel dieser Arbeit ist es, den notwendigen Rezeptor für die LSEC-spezifische Partikelaufnahme zu identifizieren. Hierfür wurde die Aufnahme von PMAOD- umhüllten Nanopartikeln in mehreren Rezeptor-Knockout-Mausmodellen untersucht.

Des Weiteren sollten Erkenntnisse über die zelluläre Antwort der LSECs auf die Nanopartikel-vermittelte Peptidgabe gewonnen werden. Mittels *Nuclear ribosome tagging affinity purification* wurde die mRNA von Peptid- behandelten Mäusen extrahiert und durch RNA-Sequenzierung untersucht. So konnte Aufschluss über den Translationsstatus der LSECs nach Nanopartikel- vermittelter Peptidaufnahme gewonnen werden. Mit Hilfe von Zellseparationsexperimenten sowie der Durchflusszytometrie konnte im Rahmen dieser Arbeit wurde der Stabilin-2 als wichtigster Rezeptor für die Aufnahme von PMAOD-umhüllten Nanopartikeln in die LSECs identifiziert werden.

Mittels Sequenzierung der LSEC-spezifischen mRNA wurde erkenntlich, dass besonders die zweizeitige, zeitversetzte Peptidgabe eine intrazelluläre Antwort in LSECs hervorruft. Mehrere Proteine, wie zum Beispiel CCL2, CCL4 und CCL7, die

eine Rolle in der Leukozyten-Diapedese in die Sinusoide sowie der Induktion von Immuntoleranz spielen, werden in den mit peptidbehandelten Gruppen vermehrt an den Ribosomen abgelesen und produziert. Diese Markergene repräsentieren eine LSEC-spezifische Gensignatur, welche als Reaktion auf die Peptid-Nanopartikel Gabe an den Ribosomen abgelesen wird. Die LSEC-spezifische Reaktion auf die transportierten Peptide findet vier Stunden nach Applikation ihren Höhepunkt. Behandelte man Mäuse mit Peptid-gekoppelten Nanopartikeln, findet sich bei erneuter Präsentation des Peptids - eine Woche später - keine Reaktion mehr auf diese. Diese Beobachtung lässt auf die Möglichkeit eines immunologischen Gedächtnisses von LSECs schließen. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die LSEC-vermittelte Chemokinexpression in Stabilin-2 Knockout-Mäusen vermindert ist.

In dieser Arbeit konnten somit wichtige Fragen zur Aufnahme, zur Kinetik und der Wirkungsweise von Peptid-beladenen Nanopartikeln im Kontext der LSEC-vermittelten Immunantwort beantwortet werden. Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob die Weiterentwicklung von Stabilin-2-spezifischen Nanopartikel-Konstrukten für die Induktion der Immuntoleranz möglicherweise Vorteile gegenüber den konventionellen PMAOD-Nanopartikeln haben könnte. Darüber hinaus könnten die ermittelten Gensignaturen zur Diagnostik bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen weiterentwickelt werden könnten, um die Effizienz der Toleranzinduktion zu ermitteln.

6 Summary

Treating autoimmune diseases efficiently, with as few side effects as possible, and without making major interventions in the immune system has been a topic of modern research for some time. To find new treatment strategies against autoimmune diseases, investigations are being carried out on how to establish immunological tolerance against the disease-triggering autoreactive antigens. For this ambitious goal, the field of nanomedicine presents itself as a promising new therapeutic approach. With the help of small nanoparticles functioning as a carrier, therapeutic substances, such as pharmacologically active molecules, can be transported to certain cell types. In this context, liver-sinusoidal endothelial cells (LSECs) represent an important target with a view to the induction of immune tolerance. LSECs can mediate tolerance very consistently (reliably?), they show very little plasticity, and remain tolerogenic even in an acute inflammatory milieu. Carambia et al. has succeeded in transporting autoreactive peptides into LSECs using small PMAOD-coated nanoparticles as a carrier. These LSECs were then able to mediate immunological tolerance against the transported peptides, thus leading to the efficient treatment of both CD4 and CD8 T cell-mediated autoimmune diseases. Because of the hydrophilic PMAOD-coating, the nanoparticles are endocytosed at a high specificity by LSECs. Yet, it is still not clear which receptor actually mediates the endocytosis and how the particles are processed intracellularly.

The main aim of this work is to identify the necessary receptor for LSEC-specific particle- uptake. For this purpose, the uptake of PMAOD-coated nanoparticles was investigated in several receptor knockout mouse models. A second aim of this work is the investigation of the intracellular changes within the LSECs after the nanoparticle-mediated peptide uptake. Using *nuclear ribosome tagging affinity purification*, the mRNA of peptide-treated mice was extracted and examined by RNA sequencing. By doing so, information about the translational status of the LSECs after nanoparticle-mediated peptide uptake could be obtained.

Using cell separation experiments as well as flow cytometry, the Stabilin-2 receptor was identified as the most important receptor for the uptake of PMAOD-coated nanoparticles in LSECs, as nanoparticle uptake was significantly reduced in the absence of Stabilin-2. Findings from the sequencing of messenger LSEC-RNA show that particularly the two-stage, time-shifted peptide administration caused a great intracellular response within LSECs. Several proteins, such as CCL2, CCL4

and CCL7, that play a role in leukocyte diapedesis into the sinusoids and in the induction of immune tolerance were increasingly expressed and produced on the ribosomes in the peptide- treated groups. These marker genes represent a LSEC-specific gene signature which is translated on the ribosomes in response to the peptide-nanoparticle treatment. The LSEC-specific reaction to the transported peptides peaks four hours after application. Absolutely no reaction could be found when the second injection of peptide-coupled nanoparticles was made one week after the first treatment. This observation suggests the possibility of an immunological memory in LSECs. The results of this study show, that LSEC-mediated chemokine expression is reduced in stabilin-2 knockout mice.

In this work, important questions about the uptake, kinetics and mode of action of peptide-loaded nanoparticles in the context of the LSEC-mediated immune response were answered. Future studies will have to show whether the further development of stabilin 2-specific nanoparticle constructs for the induction of immune tolerance could potentially have advantages over conventional PMAOD nanoparticles. In addition, the identified gene signatures could be further developed for diagnostic purposes in the treatment of autoimmune diseases in order to determine the efficiency of tolerance induction.

7 Literaturverzeichnis

- Acton, S., A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, and M. Krieger. 1996. 'Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor', *Science*, 271: 518-20.
- Allavena, P., M. Chieppa, P. Monti, and L. Piemonti. 2004. 'From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor', *Crit Rev Immunol*, 24: 179-92.
- Araki, N., T. Higashi, T. Mori, R. Shibayama, Y. Kawabe, T. Kodama, K. Takahashi, M. Shichiri, and S. Horiuchi. 1995. 'Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction', *Eur J Biochem*, 230: 408-15.
- Areschoug, T., and S. Gordon. 2009. 'Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis', *Cell Microbiol*, 11: 1160-9.
- Bardina, S. V., D. Michlmayr, K. W. Hoffman, C. J. Obara, J. Sum, I. F. Charo, W. Lu, A. G. Pletnev, and J. K. Lim. 2015. 'Differential Roles of Chemokines CCL2 and CCL7 in Monocytosis and Leukocyte Migration during West Nile Virus Infection', *J Immunol*, 195: 4306-18.
- Bargheer, D., A. Giemsa, B. Freund, M. Heine, C. Waurisch, G. M. Stachowski, S. G. Hickey, A. Eychmüller, J. Heeren, and P. Nielsen. 2015. 'The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice', *Beilstein J Nanotechnol*, 6: 111-23.
- Bhandari, S., A. K. Larsen, P. McCourt, B. Smedsrod, and K. K. Sorensen. 2021. 'The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease', *Front Physiol*, 12: 757469.
- Bhandari, S., R. Li, J. Simon-Santamaria, P. McCourt, S. D. Johansen, B. Smedsrod, I. Martinez-Zubiaurre, and K. K. Sorensen. 2020. 'Transcriptome and proteome profiling reveal complementary scavenger and immune features of rat liver sinusoidal endothelial cells and liver macrophages', *BMC Mol Cell Biol*, 21: 85.
- Böttcher, J. P., O. Schanz, C. Garbers, A. Zaremba, S. Hegenbarth, C. Kurts, M. Beyer, J. L. Schultze, W. Kastenmüller, S. Rose-John, and P. A. Knolle. 2014. 'IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8+ T cell function', *Cell Rep*, 8: 1318-27.
- Buelens, C., V. Verhasselt, D. De Groote, K. Thielemans, M. Goldman, and F. Willems. 1997. 'Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10', *Eur J Immunol*, 27: 1848-52.
- Carambia, A., C. Frenzel, O. T. Bruns, D. Schwinge, R. Reimer, H. Hohenberg, S. Huber, G. Tiegs, C. Schramm, A. W. Lohse, and J. Herkel. 2013. 'Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells', *J Hepatol*, 58: 112-8.
- Carambia, A., B. Freund, D. Schwinge, O. T. Bruns, S. C. Salmen, H. Ittrich, R. Reimer, M. Heine, S. Huber, C. Waurisch, A. Eychmüller, D. C. Wraith, T. Korn, P. Nielsen, H. Weller, C. Schramm, S. Luth, A. W. Lohse, J. Heeren, and J. Herkel. 2015. 'Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice', *J Hepatol*, 62: 1349-56.
- Carambia, A., B. Freund, D. Schwinge, M. Heine, A. Laschtowitz, S. Huber, D. C. Wraith, T. Korn, C. Schramm, A. W. Lohse, J. Heeren, and J. Herkel. 2014. 'TGF-beta-

- dependent induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Tregs by liver sinusoidal endothelial cells', *J Hepatol*, 61: 594-9.
- Carambia, A., C. Gottwick, D. Schwinge, S. Stein, R. Digigow, M. Selec, D. Mungalpara, M. Heine, F. A. Schuran, C. Corban, A. W. Lohse, C. Schramm, J. Heeren, and J. Herkel. 2021. 'Nanoparticle-mediated targeting of autoantigen peptide to cross-presenting liver sinusoidal endothelial cells protects from CD8 T-cell-driven autoimmune cholangitis', *Immunology*, 162: 452-63.
- Chiu, J. J., and S. Chien. 2011. 'Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives', *Physiol Rev*, 91: 327-87.
- Curbishley, Stuart M., Bertus Eksteen, Ron P. Gladue, Patricia Lalor, and David H. Adams. 2005. 'CXCR3 Activation Promotes Lymphocyte Transendothelial Migration across Human Hepatic Endothelium under Fluid Flow', *The American Journal of Pathology*, 167: 887-99.
- Davidson, Anne, and Betty Diamond. 2001. 'Autoimmune Diseases', *New England Journal of Medicine*, 345: 340-50.
- DeLeve, L. D., and A. C. Maretta-Mira. 2017. 'Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update', *Semin Liver Dis*, 37: 377-87.
- DeLeve, L. D., X. Wang, L. Hu, M. K. McCuskey, and R. S. McCuskey. 2004. 'Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287: G757-63.
- Diehl, Linda, Anna Schurich, Regina Grochtmann, Silke Hegenbarth, Lieping Chen, and Percy A. Knolle. 2008. 'Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance', *Hepatology*, 47: 296-305.
- Dinarello, Charles A. 2010. 'Anti-inflammatory Agents: Present and Future', *Cell*, 140: 935-50.
- Doll, Tais A. P. F., Senthilkumar Raman, Raja Dey, and Peter Burkhard. 2013. 'Nanoscale assemblies and their biomedical applications', *Journal of The Royal Society Interface*, 10: 20120740.
- Dudek, Michael, Kerstin Lohr, Sainitin Donakonda, Tobias Baumann, Max Lüdemann, Silke Hegenbarth, Lena Dübbel, Carola Eberhagen, Savvoula Michailidou, Abdallah Yassin, Marco Prinz, Bastian Popper, Stefan Rose-John, Hans Zischka, and Percy A. Knolle. 2022. 'IL-6-induced FOXO1 activity determines the dynamics of metabolism in CD8 T cells cross-primed by liver sinusoidal endothelial cells', *Cell Reports*, 38: 110389.
- Dunne, D. W., D. Resnick, J. Greenberg, M. Krieger, and K. A. Joiner. 1994. 'The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1863-7.
- Eggerman, T. L., J. M. Hoeg, M. S. Meng, A. Tombragel, D. Bojanovski, and H. B. Brewer, Jr. 1991. 'Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II', *J Lipid Res*, 32: 821-8.
- Falkowski, M., K. Schledzewski, B. Hansen, and S. Goerdt. 2003. 'Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces', *Histochem Cell Biol*, 120: 361-9.
- Febbraio, M., D. P. Hajjar, and R. L. Silverstein. 2001. 'CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism', *J Clin Invest*, 108: 785-91.

- Fraser, R., A. G. Bosanquet, and W. A. Day. 1978. 'Filtration of chylomicrons by the liver may influence cholesterol metabolism and atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 29: 113-23.
- Freund, B., U. I. Tromsdorf, O. T. Bruns, M. Heine, A. Giemsa, A. Bartelt, S. C. Salmen, N. Raabe, J. Heeren, H. Ittrich, R. Reimer, H. Hohenberg, U. Schumacher, H. Weller, and P. Nielsen. 2012. 'A simple and widely applicable method to ⁵⁹Fe-radiolabel monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo quantification studies', *ACS Nano*, 6: 7318-25.
- Ganesan, L. P., J. Kim, Y. Wu, S. Mohanty, G. S. Phillips, D. J. Birmingham, J. M. Robinson, and C. L. Anderson. 2012. 'FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes', *J Immunol*, 189: 4981-8.
- Ganesan, L. P., J. M. Mates, A. M. Cheplowitz, C. L. Avila, J. M. Zimmerer, Z. Yao, A. Maiseyeu, M. V. Rajaram, J. M. Robinson, and C. L. Anderson. 2016. 'Scavenger receptor B1, the HDL receptor, is expressed abundantly in liver sinusoidal endothelial cells', *Sci Rep*, 6: 20646.
- Gazi, U., and L. Martinez-Pomares. 2009. 'Influence of the mannose receptor in host immune responses', *Immunobiology*, 214: 554-61.
- Geissmann, F., T. O. Cameron, S. Sidobre, N. Manlongat, M. Kronenberg, M. J. Briskin, M. L. Dustin, and D. R. Littman. 2005. 'Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids', *PLoS Biol*, 3: e113.
- Gordon, S. 2002. 'Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response', *Cell*, 111: 927-30.
- Gottwick, C., A. Carambia, and J. Herkel. 2022. 'Harnessing the liver to induce antigen-specific immune tolerance', *Semin Immunopathol*, 44: 475-84.
- Hansen, B., P. Longati, K. Elvevold, G. I. Nedredal, K. Schledzewski, R. Olsen, M. Falkowski, J. Kzhyshkowska, F. Carlsson, S. Johansson, B. Smedsrod, S. Goerdt, S. Johansson, and P. McCourt. 2005. 'Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding', *Exp Cell Res*, 303: 160-73.
- Häussinger, Dieter, and Georg Löffler. 2014. 'Leber – Zentrales Stoffwechselorgan.' in Peter C. Heinrich, Matthias Müller and Lutz Graeve (eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Heine, M., A. Bartelt, O. T. Bruns, D. Bargheer, A. Giemsa, B. Freund, L. Scheja, C. Waurisch, A. Eychmüller, R. Reimer, H. Weller, P. Nielsen, and J. Heeren. 2014. 'The cell-type specific uptake of polymer-coated or micelle-embedded QDs and SPIOs does not provoke an acute pro-inflammatory response in the liver', *Beilstein J Nanotechnol*, 5: 1432-40.
- Heydtmann, M., P. F. Lalor, J. A. Eksteen, S. G. Hübscher, M. Briskin, and D. H. Adams. 2005. 'CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver', *J Immunol*, 174: 1055-62.
- Honczarenko, M., Y. Le, A. M. Glodek, M. Majka, J. J. Campbell, M. Z. Ratajczak, and L. E. Silberstein. 2002. 'CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor', *Blood*, 100: 2321-9.
- Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, and Y. Iwakura. 2000. 'Development of chronic inflammatory arthropathy resembling

- rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice', *J Exp Med*, 191: 313-20.
- Horst, Andrea Kristina, Katrin Neumann, Linda Diehl, and Gisa Tiegs. 2016. 'Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells', *Cellular & Molecular Immunology*, 13: 277-92.
- Irie, S., and M. Tavassoli. 1991. 'Transendothelial transport of macromolecules: the concept of tissue-blood barriers', *Cell Biol Rev*, 25: 317-33, 40-1.
- Jenne, C. N., and P. Kubes. 2013. 'Immune surveillance by the liver', *Nat Immunol*, 14: 996-1006.
- Kalinski, Pawel. 2012. 'Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E₂', *The Journal of Immunology*, 188: 21-28.
- Kawai, Toshihisa, Makoto Seki, Kenji Hiromatsu, Jean W. Eastcott, Gerald F. M. Watts, Motoyuki Sugai, Daniel J. Smith, Steven A. Porcelli, and Martin A. Taubman. 1999. 'Selective Diapedesis of Th1 Cells Induced by Endothelial Cell RANTES', *The Journal of Immunology*, 163: 3269-78.
- Kellner, Herbert. 2011. 'Entzündlich-rheumatische Erkrankungen.' in, *Klinische Pharmakologie* (Martin Wehling: Stuttgart).
- Khanna, A., A. E. Morelli, C. Zhong, T. Takayama, L. Lu, and A. W. Thomson. 2000. 'Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo', *J Immunol*, 164: 1346-54.
- Kjeken, R., S. A. Mousavi, A. Brech, T. Gjøen, and T. Berg. 2001. 'Fluid phase endocytosis of [125I]iodixanol in rat liver parenchymal, endothelial and Kupffer cells', *Cell Tissue Res*, 304: 221-30.
- Klugewitz, K., F. Blumenthal-Barby, A. Schrage, P. A. Knolle, A. Hamann, and I. N. Crispe. 2002. 'Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization', *J Immunol*, 169: 2407-13.
- Knolle, P. A., T. Germann, U. Treichel, A. Uhrig, E. Schmitt, S. Hegenbarth, A. W. Lohse, and G. Gerken. 1999. 'Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells', *J Immunol*, 162: 1401-7.
- Knolle, P. A., and A. Limmer. 2003. 'Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells', *Swiss Med Wkly*, 133: 501-6.
- Knolle, P. A., E. Schmitt, S. Jin, T. Germann, R. Duchmann, S. Hegenbarth, G. Gerken, and A. W. Lohse. 1999. 'Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells', *Gastroenterology*, 116: 1428-40.
- Knolle, P. A., A. Uhrig, S. Hegenbarth, E. Löser, E. Schmitt, G. Gerken, and A. W. Lohse. 1998. 'IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules', *Clin Exp Immunol*, 114: 427-33.
- Kruse, N., K. Neumann, A. Schrage, K. Derkow, E. Schott, U. Erben, A. Kuhl, C. Loddenkemper, M. Zeitz, A. Hamann, and K. Klugewitz. 2009. 'Priming of CD4⁺ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3-regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis', *Hepatology*, 50: 1904-13.
- Kumari, A., S. K. Yadav, and S. C. Yadav. 2010. 'Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems', *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75: 1-18.

- Kunachowicz, Dominika, Milena Ściskalska, Milan Jakubek, Rene Kizek, and Marta Kepinska. 2022. 'Structural changes in selected human proteins induced by exposure to quantum dots, their biological relevance and possible biomedical applications', *NanoImpact*, 26: 100405.
- Kunjathoor, V. V., M. Febbraio, E. A. Podrez, K. J. Moore, L. Andersson, S. Koehn, J. S. Rhee, R. Silverstein, H. F. Hoff, and M. W. Freeman. 2002. 'Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages', *J Biol Chem*, 277: 49982-8.
- Kzhyskowska, J., G. Workman, M. Cardo-Vila, W. Arap, R. Pasqualini, A. Gratchev, L. Krusell, S. Goerdt, and E. H. Sage. 2006. 'Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC', *J Immunol*, 176: 5825-32.
- Lieberman, Scott M., Jiyeon S. Kim, Evann Corbo-Rodgers, Taku Kambayashi, Jonathan S. Maltzman, Edward M. Behrens, and Laurence A. Turka. 2012. 'Site-specific accumulation of recently activated CD4+Foxp3+ regulatory T cells following adoptive transfer', *European Journal of Immunology*, 42: 1429-35.
- Limmer, A., J. Ohl, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold, and P. A. Knolle. 2000. 'Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance', *Nat Med*, 6: 1348-54.
- Linehan, S. A., L. Martínez-Pomares, P. D. Stahl, and S. Gordon. 1999. 'Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells', *J Exp Med*, 189: 1961-72.
- Linehan, S. A., R. Weber, S. McKercher, R. M. Ripley, S. Gordon, and P. Martin. 2005. 'Enhanced expression of the mannose receptor by endothelial cells of the liver and spleen microvascular beds in the macrophage-deficient PU.1 null mouse', *Histochem Cell Biol*, 123: 365-76.
- Lino, A. C., V. D. Dang, V. Lampropoulou, A. Welle, J. Joedicke, J. Pohar, Q. Simon, J. Thalmensi, A. Baures, V. Flühler, I. Sakwa, U. Stervbo, S. Ries, L. Jouneau, P. Boudinot, T. Tsubata, T. Adachi, A. Hutloff, T. Dörner, U. Zimmer-Strobl, A. F. de Vos, K. Dahlke, G. Loh, S. Korniotis, C. Goosmann, J. C. Weill, C. A. Reynaud, S. H. E. Kaufmann, J. Walter, and S. Fillatreau. 2018. 'LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells', *Immunity*, 49: 120-33.e9.
- Liu, Q., X. Wang, X. Liu, S. Kumar, G. Gochman, Y. Ji, Y. P. Liao, C. H. Chang, W. Situ, J. Lu, J. Jiang, K. C. Mei, H. Meng, T. Xia, and A. E. Nel. 2019. 'Use of Polymeric Nanoparticle Platform Targeting the Liver To Induce Treg-Mediated Antigen-Specific Immune Tolerance in a Pulmonary Allergen Sensitization Model', *ACS Nano*, 13: 4778-94.
- Liu, Q., X. Wang, X. Liu, Y. P. Liao, C. H. Chang, K. C. Mei, J. Jiang, S. Tseng, G. Gochman, M. Huang, Z. Thatcher, J. Li, S. D. Allen, L. Lucido, T. Xia, and A. E. Nel. 2021. 'Antigen- and Epitope-Delivering Nanoparticles Targeting Liver Induce Comparable Immunotolerance in Allergic Airway Disease and Anaphylaxis as Nanoparticle-Delivering Pharmaceuticals', *ACS Nano*, 15: 1608-26.

- Lohse, A. W., P. A. Knolle, K. Bilo, A. Uhrig, C. Waldmann, M. Ibe, E. Schmitt, G. Gerken, and K. H. Meyer Zum Buschenfelde. 1996. 'Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells', *Gastroenterology*, 110: 1175-81.
- López-Cabrera, M, A G Santis, E Fernández-Ruiz, R Blacher, F Esch, P Sánchez-Mateos, and F Sánchez-Madrid. 1993. 'Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors', *Journal of Experimental Medicine*, 178: 537-47.
- Mackay, I. R. 2002. 'Hepatoimmunology: a perspective', *Immunol Cell Biol*, 80: 36-44.
- Malerød, L., K. Juvet, T. Gjøen, and T. Berg. 2002. 'The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and nonparenchymal liver cells', *Cell Tissue Res*, 307: 173-80.
- Malovic, I., K. K. Sørensen, K. H. Elvevold, G. I. Nedredal, S. Paulsen, A. V. Erofeev, B. H. Smedsrød, and P. A. McCourt. 2007. 'The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor', *Hepatology*, 45: 1454-61.
- Martens, J. H., J. Kzhyshkowska, M. Falkowski-Hansen, K. Schledzewski, A. Gratchev, U. Mansmann, C. Schmuttermayer, E. Dippel, W. Koenen, F. Riedel, M. Sankala, K. Tryggvason, L. Kobzik, G. Moldenhauer, B. Arnold, and S. Goerdt. 2006. 'Differential expression of a gene signature for scavenger/lectin receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis', *J Pathol*, 208: 574-89.
- Martin-Armas, M., J. Simon-Santamaria, I. Pettersen, U. Moens, B. Smedsrød, and B. Sveinbjørnsson. 2006. 'Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides', *J Hepatol*, 44: 939-46.
- Maslak, E., A. Gregorius, and S. Chlopicki. 2015. 'Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver', *Pharmacol Rep*, 67: 689-94.
- Maurer, M., and E. von Stebut. 2004. 'Macrophage inflammatory protein-1', *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 1882-6.
- McCourt, P. A., B. H. Smedsrod, J. Melkko, and S. Johansson. 1999. 'Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors', *Hepatology*, 30: 1276-86.
- McGreal, E. P., L. Martinez-Pomares, and S. Gordon. 2004. 'Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system', *Mol Immunol*, 41: 1109-21.
- McMahan, Rachel H., Cara E. Porsche, Michael G. Edwards, and Hugo R. Rosen. 2016. 'Free Fatty Acids Differentially Downregulate Chemokines in Liver Sinusoidal Endothelial Cells: Insights into Non-Alcoholic Fatty Liver Disease', *PLoS One*, 11: e0159217.
- Middleton, J., A. M. Patterson, L. Gardner, C. Schmutz, and B. A. Ashton. 2002. 'Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium', *Blood*, 100: 3853-60.

- Milone, M. C., and P. Fitzgerald-Bocarsly. 1998. 'The mannose receptor mediates induction of IFN-alpha in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses', *J Immunol*, 161: 2391-9.
- Mousavi, S. A., M. Sporstøl, C. Fladeby, R. Kjekken, N. Barois, and T. Berg. 2007. 'Receptor-mediated endocytosis of immune complexes in rat liver sinusoidal endothelial cells is mediated by FcγRIIb2', *Hepatology*, 46: 871-84.
- Nagelkerke, J. F., K. P. Barto, and T. J. van Berkel. 1983. 'In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial, Kupffer, and parenchymal cells', *J Biol Chem*, 258: 12221-7.
- Neubauer, K., T. Wilfling, A. Ritzel, and G. Ramadori. 2000. 'Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene expression in liver sinusoidal endothelial cells during liver injury and repair', *J Hepatol*, 32: 921-32.
- Neumann, K., U. Erben, N. Kruse, K. Wechsung, M. Schumann, K. Klugewitz, A. Scheffold, and A. A. Kühl. 2015. 'Chemokine Transfer by Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contributes to the Recruitment of CD4+ T Cells into the Murine Liver', *PLoS One*, 10: e0123867.
- Nguyen-Lefebvre, A. T., and A. Horuzsko. 2015. 'Kupffer Cell Metabolism and Function', *J Enzymol Metab*, 1.
- Ntanasis-Stathopoulos, I., D. Fotiou, and E. Terpos. 2020. 'CCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment', *Adv Exp Med Biol*, 1231: 13-21.
- Ouchi, N., A. Higuchi, K. Ohashi, Y. Oshima, N. Gokce, R. Shibata, Y. Akasaki, A. Shimono, and K. Walsh. 2010. 'Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity', *Science*, 329: 454-7.
- Pandey, E., A. S. Nour, and E. N. Harris. 2020. 'Prominent Receptors of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Homeostasis and Disease', *Front Physiol*, 11: 873.
- Petibon, C., M. Malik Ghulam, M. Catala, and S. Abou Elela. 2021. 'Regulation of ribosomal protein genes: An ordered anarchy', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 12: e1632.
- Poisson, J., S. Lemoine, C. Boulanger, F. Durand, R. Moreau, D. Valla, and P. E. Rautou. 2017. 'Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases', *J Hepatol*, 66: 212-27.
- Politz, O., A. Gratchev, P. A. McCourt, K. Schledzewski, P. Guillot, S. Johansson, G. Svineng, P. Franke, C. Kannicht, J. Kzhyshkowska, P. Longati, F. W. Velten, S. Johansson, and S. Goerdt. 2002. 'Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues', *Biochem J*, 362: 155-64.
- Prevo, R., S. Banerji, J. Ni, and D. G. Jackson. 2004. 'Rapid plasma membrane-endosomal trafficking of the lymph node sinus and high endothelial venule scavenger receptor/homing receptor stabilin-1 (FEEL-1/CLEVER-1)', *J Biol Chem*, 279: 52580-92.
- Probst, H. C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. 2005. 'Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4', *Nat Immunol*, 6: 280-6.
- "Progress in autoimmune diseases research." In. 2005. NIH Autoimmune Diseases Coordinating Committee.
- Qian, Wenjing, Mingfang Zhao, Ruoyu Wang, and Heming Li. 2021. 'Fibrinogen-like protein 1 (FGL1): the next immune checkpoint target', *Journal of Hematology & Oncology*, 14: 147.

- Racanelli, V., and B. Rehermann. 2006. 'The liver as an immunological organ', *Hepatology*, 43: S54-62.
- Reading, P. C., J. L. Miller, and E. M. Anders. 2000. 'Involvement of the mannose receptor in infection of macrophages by influenza virus', *J Virol*, 74: 5190-7.
- Ruffo, E., R. C. Wu, T. C. Bruno, C. J. Workman, and D. A. A. Vignali. 2019. 'Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor', *Semin Immunol*, 42: 101305.
- Schledzewski, K., C. Geraud, B. Arnold, S. Wang, H. J. Grone, T. Kempf, K. C. Wollert, B. K. Straub, P. Schirmacher, A. Demory, H. Schonhaber, A. Gratchev, L. Dietz, H. J. Thierse, J. Kzhyshkowska, and S. Goerdts. 2011. 'Deficiency of liver sinusoidal scavenger receptors stabilin-1 and -2 in mice causes glomerulofibrotic nephropathy via impaired hepatic clearance of noxious blood factors', *J Clin Invest*, 121: 703-14.
- Schrage, A., C. Loddenkemper, U. Erben, U. Lauer, G. Hausdorf, P. R. Jungblut, J. Johnson, P. A. Knolle, M. Zeitz, A. Hamann, and K. Klugewitz. 2008. 'Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1', *Histochem Cell Biol*, 129: 441-51.
- Schrage, A., K. Wechsung, K. Neumann, M. Schumann, J. D. Schulzke, B. Engelhardt, M. Zeitz, A. Hamann, and K. Klugewitz. 2008. 'Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines', *Hepatology*, 48: 1262-72.
- Schurich, A., M. Berg, D. Stabenow, J. Böttcher, M. Kern, H. J. Schild, C. Kurts, V. Schuette, S. Burgdorf, L. Diehl, A. Limmer, and P. A. Knolle. 2010. 'Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells', *J Immunol*, 184: 4107-14.
- Shaw, L M, B Kaplan, and D Kaufman. 1996. 'Toxic effects of immunosuppressive drugs: mechanisms and strategies for controlling them', *Clinical Chemistry*, 42: 1316-21.
- Sheth, K., and P. Bankey. 2001. 'The liver as an immune organ', *Curr Opin Crit Care*, 7: 99-104.
- Shive, M. S., and J. M. Anderson. 1997. 'Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres', *Adv Drug Deliv Rev*, 28: 5-24.
- Shtykova, E. V., X. Huang, X. Gao, J. C. Dyke, A. L. Schmucker, B. Dragnea, N. Remmes, D. V. Baxter, B. Stein, P. V. Konarev, D. I. Svergun, and L. M. Bronstein. 2008. 'Hydrophilic Monodisperse Magnetic Nanoparticles Protected by an Amphiphilic Alternating Copolymer', *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, 112: 16809-17.
- Siafaka, Panoraia I., Neslihan Üstündağ Okur, Evangelos Karavas, and Dimitrios N. Bikiaris. 2016. 'Surface Modified Multifunctional and Stimuli Responsive Nanoparticles for Drug Targeting: Current Status and Uses', *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1440.
- Simionescu, N, and M Simionescu. 1988. 'Cell and tissue biology', *Urban & Schwarzenberg. Bolitmore Berlin*.
- Singh, S., D. Anshita, and V. Ravichandiran. 2021. 'MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease', *Int Immunopharmacol*, 101: 107598.
- Smedsrød, B., D. Le Couteur, K. Ikejima, H. Jaeschke, N. Kawada, M. Naito, P. Knolle, L. Nagy, H. Senoo, F. Vidal-Vanaclocha, and N. Yamaguchi. 2009. 'Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium', *Liver Int*, 29: 490-501.

- Soppimath, K. S., T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski. 2001. 'Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices', *J Control Release*, 70: 1-20.
- Sorensen, K. K., P. McCourt, T. Berg, C. Crossley, D. Le Couteur, K. Wake, and B. Smedsrod. 2012. 'The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 303: R1217-30.
- Stahl, P. D., and R. A. Ezekowitz. 1998. 'The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense', *Curr Opin Immunol*, 10: 50-5.
- Stegmann, K. A., F. Robertson, N. Hansi, U. Gill, C. Pallant, T. Christophides, L. J. Pallett, D. Peppas, C. Dunn, G. Fusai, V. Male, B. R. Davidson, P. Kennedy, and M. K. Maini. 2016. 'CXCR6 marks a novel subset of T-bet(lo)Eomes(hi) natural killer cells residing in human liver', *Sci Rep*, 6: 26157.
- Strauss, Otto, Anthony Phillips, Katya Ruggiero, Adam Bartlett, and P. Rod Dunbar. 2017. 'Immunofluorescence identifies distinct subsets of endothelial cells in the human liver', *Scientific Reports*, 7: 44356.
- Szafranska, Karolina, Larissa D. Kruse, Christopher Florian Holte, Peter McCourt, and Bartłomiej Zapotoczny. 2021. 'The wHole Story About Fenestrations in LSEC', *Frontiers in Physiology*, 12.
- Tamura, Y., H. Adachi, J. Osuga, K. Ohashi, N. Yahagi, M. Sekiya, H. Okazaki, S. Tomita, Y. Iizuka, H. Shimano, R. Nagai, S. Kimura, M. Tsujimoto, and S. Ishibashi. 2003. 'FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products', *J Biol Chem*, 278: 12613-7.
- Taub, D. D., T. J. Sayers, C. R. Carter, and J. R. Ortaldo. 1995. 'Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity', *J Immunol*, 155: 3877-88.
- Thomson, A. W., and P. A. Knolle. 2010. 'Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment', *Nat Rev Immunol*, 10: 753-66.
- "Topas Therapeutics Announces First Patient Enrolled in Phase 1 Trial with TPM203 in Pemphigus Vulgaris." In. 2019. Hamburg: topas therapeutics
- Uhrig, A., R. Banafsche, M. Kremer, S. Hegenbarth, A. Hamann, M. Neurath, G. Gerken, A. Limmer, and P. A. Knolle. 2005. 'Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver', *J Leukoc Biol*, 77: 626-33.
- Von Nahmen, F.-J. 1993. *The Human Liver: A Scanning Electron Microscopic Atlas*. (Karger: Basel).
- Wei, H., O. T. Bruns, M. G. Kaul, E. C. Hansen, M. Barch, A. Wiśniowska, O. Chen, Y. Chen, N. Li, S. Okada, J. M. Cordero, M. Heine, C. T. Farrar, D. M. Montana, G. Adam, H. Ittrich, A. Jasanoff, P. Nielsen, and M. G. Bawendi. 2017. 'Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 2325-30.
- Wisse, E. 1970. 'An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids', *J Ultrastruct Res*, 31: 125-50.
- Wisse, E. 1972. 'An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells', *Journal of Ultrastructure Research*, 38: 528-62.

- Wisse, E., R. B. De Zanger, K. Charels, P. Van Der Smissen, and R. S. McCuskey. 1985. 'The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse', *Hepatology*, 5: 683-92.
- Wolpe, S. D., G. Davatellis, B. Sherry, B. Beutler, D. G. Hesse, H. T. Nguyen, L. L. Moldawer, C. F. Nathan, S. F. Lowry, and A. Cerami. 1988. 'Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties', *J Exp Med*, 167: 570-81.
- Wong, J., B. Johnston, S. S. Lee, D. C. Bullard, C. W. Smith, A. L. Beaudet, and P. Kubes. 1997. 'A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature', *J Clin Invest*, 99: 2782-90.
- Wu, J., Z. Meng, M. Jiang, E. Zhang, M. Trippler, R. Broering, A. Bucchi, F. Krux, U. Dittmer, D. Yang, M. Roggendorf, G. Gerken, M. Lu, and J. F. Schlaak. 2010. 'Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific', *Immunology*, 129: 363-74.
- Yan, J., Y. Yu, N. Wang, Y. Chang, H. Ying, W. Liu, J. He, S. Li, W. Jiang, Y. Li, H. Liu, H. Wang, and Y. Xu. 2004. 'LFIRE-1/HFREP-1, a liver-specific gene, is frequently downregulated and has growth suppressor activity in hepatocellular carcinoma', *Oncogene*, 23: 1939-49.
- Yu, X., L. Chen, J. Liu, B. Dai, G. Xu, G. Shen, Q. Luo, and Z. Zhang. 2019. 'Immune modulation of liver sinusoidal endothelial cells by melittin nanoparticles suppresses liver metastasis', *Nat Commun*, 10: 574.

8 Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Prof. Jörg Heeren für die interessante Fragestellung, die Grundlagenforschung mit der modernen Medizin verbindet. Danke, dass du immer ein verlässlicher Ansprechpartner für mich warst und mir stets bei jeder Frage mit Rat und Tat zur Seite standest. Dank dieser Unterstützung konnte ich viele wertvolle Erfahrungen sammeln, die mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich bereichert haben.

Ein weiterer großer Dank gilt dem gesamten Team des IBMZ. Von Anfang an wurde ich dort äußerst herzlich aufgenommen, und jede noch so kleine Frage wurde geduldig beantwortet. Die angenehme Arbeitsatmosphäre hat die Zeit für mich zu einer besonders schönen Erfahrung gemacht. Besonders denke ich hier an Sandra Ehret, Birgit Henkel, Michelle Jäckstein, Janina Behrens und Ioannis Evangelakos. Ihr habt mir nicht nur die praktischen Methoden und die Laboretikette vermittelt, sondern immer ein offenes Ohr für meine Anliegen und wertvolle Ratschläge gehabt. Ihr habt diese Zeit zu etwas ganz Besonderem für mich gemacht. Auch möchte ich mich bei Cornelia Gottwick bedanken, die mich bei vielen Experimenten unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an Markus. Deine unermüdliche Geduld, dein Verständnis und deine ständige Unterstützung bei all meinen Experimenten - egal ob unter der Woche oder am Wochenende - haben dieses Projekt überhaupt erst möglich gemacht. Ohne deine Hilfe wäre vieles nicht so reibungslos verlaufen, und ich blicke mit großer Freude und Dankbarkeit auf diese Zeit zurück.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Partner danken. Euer Verständnis und der Rückhalt, den ihr mir in dieser intensiven Zeit gegeben habt, waren von unschätzbarem Wert. Danke, dass Ihr mich auf meinem Weg bis hierher begleitet habt. Natürlich denke ich hier auch an Laura und Ronja. Danke, dass Ihr immer für mich da wart, mich unterstützt habt und seelischen Beistand geleistet habt.

9 Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie unter der Betreuung von Prof. Jörg Heeren durchgeführt.

Sämtliche Versuche und statistischen Auswertungen wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder der AG Heeren eigenständig durchgeführt. Die FACS-Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Cornelia Gottwick (Arbeitsgruppe von Prof. Johannes Herkel, der I. Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf). Die Sequenzierung der RNA erfolgte durch die Firma novogene UK.

Ich versichere, diese Arbeit selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Datum:

Unterschrift:

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum:

Unterschrift: