



Technische Universität München
Institut für Molekulare Immunologie

Dynamik der Antigen-spezifischen CD8 T-Zell-Antwort gegen virale Infektion der Leber

Katrin Manske

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dirk Busch

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Prof. Dr. Dietmar Zehn

Die Dissertation wurde am 09.04.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.08.2020 angenommen.

Anhang I

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung
Fakultät für Medizin

der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:
Dynamik der Antigen-spezifischen CD8 T-Zell-Antwort gegen virale Infektion der Leber

in der Fakultät für Medizin, Institut für Molekulare Immunologie

Fakultät, Institut, Lehrstuhl, Klinik, Krankenhaus, Abteilung

unter der Anleitung und Betreuung durch: Prof. Dr. Percy A. Knolle ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in _____
veröffentlicht. Die promotionsführende Einrichtung

hat der Veröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am _____ bei der Fakultät für _____
_____ der Hochschule _____
unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema _____
_____ die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis: _____

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden, nicht einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	3
3.1. Regulation der Immunität in der Leber	3
3.2. Immunologische Mechanismen und Charakteristika bei Virus-Infektionen der Leber	4
3.3. Immunantwort gegen Hepatitis B Virus Infektion	6
3.4. Hepatitis B Virus	7
a) Pathogenese	7
b) Molekularer Aufbau des Hepatitis B Virus	8
3.5. Modellsysteme zur Untersuchung der Immunantworten gegen Leberinfektion	9
a) Lymphozytäres Choriomeningitis Virus	9
b) Lösliche, sekretorische Model-Antigene	10
c) HBV-transgene Maus	10
d) Humanisiertes Mausmodell	11
e) MUP-(Pre)Core transgene Maus	11
f) Hydrodynamische Injektion von Hepatitis B Virus Plasmid-DNA	11
g) Transfer von Hepatitis B Virus DNA durch Adeno-assoziierte Vektoren	12
h) Transfer von Hepatitis B Virus DNA durch adenovirale Vektoren	12
3.6. Ziel der Arbeit	13
4. Ergebnisse	14
4.1. Bildgebung der adenoviralen Leberinfektion	14
4.2. Rolle der Antigenexpression für eine chronische Leberinfektion	16
4.3. Dynamik der CD8 T-Zell-Antwort während akut selbst-limitierter und chronischer Leberinfektion	20
4.4. Hepatozyten-Schutzmechanismus gegen eine CD8 T-Zell-Effektorfunktion ...	25
4.5. Transfer von HBV-Genomen in murine Hepatozyten mittels adenoviraler Infektion	30
4.6. Quantität der HBV-spezifischen Antigene bestimmt den Infektionsverlauf	31
4.7. Adaptive Immunantwort gegen Ad-HBV-Luc	33
4.8. Einfluss der Antigenmenge auf die HBV-spezifische CD8 T-Zell-Antwort	35
5. Diskussion	40
5.1. Hepatozyten-spezifische Antigenexpression führt zur viralen Persistenz in der Leber	40

5.2. Chronische Ad-TTR-GOL Infektion ist mit einer eingeschränkten Aktivierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zell-Antwort verbunden	41
5.3. Ad-TTR-GOL infizierte Hepatozyten entkommen einer CD8 T-Zell-Effektorfunktion durch geringe Antigenpräsentation auf MHC-I Molekülen.....	43
5.4. Einfluss der geringen Antigenlast auf den Verlauf einer Ad-HBV-Luc Infektion	44
5.5. Hohe Antigenlast führt während einer Ad-HBV-Luc Infektion zu CD8 T-Zellerschöpfung	45
5.6. Rolle der Antigenmenge für CD8 T-Zell-Aktivierung während einer Ad-HBV-Luc Infektion	47
5.7. Modellsysteme einer Hepatitis B Virus Infektion	48
6. Material	52
6.1. Geräte	52
6.2. Materialien	53
6.3. Chemikalien	54
6.4. Medien, Lösungen und Puffer	55
6.5. Kits	58
6.6. Enzyme, rekombinante Proteine, Peptide	59
6.7. Antikörper	60
6.8. Kompetente <i>E.coli</i> Stämme	61
6.9. Expressionsplasmide und Primer	61
6.10. Mäusestämme	61
6.11. Software	62
7. Methoden	63
7.1. Molekularbiologische Methoden	63
a) Restriktionsverdau	63
b) Agarose-Gelelektrophorese	63
c) Ligation	63
d) Transformation von <i>E.coli</i>	63
7.2. Adenovirus-Produktion	64
a) Rekombination	64
b) Transfektion	64
c) Amplifikation und Dichtegradient-Zentrifugation	65
d) Immunhistochemische Adenovirus-Titration	65
7.3. Adenovirale Infektion	66
7.4. Adoptiver T-Zell-Transfer	66
7.5. <i>In vivo</i> Depletion von Immunzellen	66

7.6. Isolation primärer Zellen	67
a) Lymphozyten-Isolation aus Milz und Lymphknoten	67
b) Lymphozyten-Isolation aus Leber	67
c) Isolation und Kultivierung primärer muriner Hepatozyten	67
7.7. <i>In vitro</i> Aktivierung von zytotoxischen OT-I T-Zellen	68
7.8. Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Bildgebung	68
7.9. Alanin-Aminotransferase-Test	69
7.10. Immunhistochemie	69
7.11. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	69
7.12. Quantifizierung HBeAg in Blutplasma	70
7.13. CD8 T-Zell-Zytotoxizitätsassay	70
7.14. CD8 T-Zellproliferationsassay	71
7.15. <i>Ex vivo</i> CD8 T-Zellrestimulation	71
7.16. Durchflusszytometrie	71
a) CD8 T-Zell-Rezeptor- und Oberflächen-Färbung	71
b) Intrazelluläre Färbung	72
c) Internukleäre Färbung	72
7.17. Maushaltung	73
7.18. Statistik	73
8. Abbildungsverzeichnis	74
9. Abkürzungsverzeichnis	76
10. Veröffentlichungen	78
11. Literaturverzeichnis	80
12. Danksagung	98

1. Zusammenfassung

Infektionen der Leber mit Hepatitis B Virus (HBV) zählen weltweit mit 257 Mio. chronischen Erkrankungen zu einem globalen Gesundheitsproblem [1]. Eine dysfunktionale anti-virale CD8 T-Zell-Antwort gilt als die Hauptursache für die HBV Persistenz, die zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom führen kann [2-4]. Dennoch bleibt der Auslöser der nicht funktionalen CD8 T-Zell-Immunität weitgehend unklar. Um die Mechanismen der viralen Leberinfektionen und der eingeschränkten CD8 T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei aufeinander aufbauende experimentelle *in vivo* Systeme für hepatotrope Virusinfektionen etabliert.

Um allgemeine Mechanismen der viralen Persistenz in der Leber zu untersuchen, wurden zunächst zwei identische rekombinante Adenoviren generiert, die die Reporterproteine eGFP und Luziferase sowie das Antigen Ovalbumin entweder unter dem ubiquitären CMV-(Ad-CMV-GOL) oder dem Hepatozyten-spezifischem Transthyretin-(TTR)-Promoter (Ad-TTR-GOL) exprimierten. Eine Ad-CMV-GOL Infektion resultierte in einem akut selbst-limitierten Infektionsverlauf, während eine Hepatozyten-spezifische Expression (Ad-TTR-GOL) zur persistierenden Infektion führte. Dabei führte die Ad-TTR-GOL Infektion aufgrund der fehlenden Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen durch dendritische Zellen in sekundären lymphoiden Organen zu einer schwachen Expansion und einem dysfunktionalen Phänotyp. Darüber hinaus konnte mithilfe des Ad-TTR-GOL eine neuartige Form der Immunevasion von infizierten Zellen identifiziert werden, bei der infizierte Hepatozyten mit niedriger viraler Antigenexpression einer zytotoxischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion entgehen. Dabei verhinderten die infizierten Zellen ihre Eliminierung durch eine unterschwellige Präsentation von Virus-kodierten Peptiden auf MHC-I Molekülen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde, aufbauend auf den vorherigen Ergebnissen, ein klinisch relevantes Modellsystem etabliert, das Rückschlüsse auf die Persistenz des HBV in der Leber liefern sollte. Hierfür wurde ein rekombinantes Adenovirus generiert, das HBV1.3 Überlängengenome mit einer Luziferase-Sequenz in murine Hepatozyten einbringt (Ad-HBV-Luc). Das Ad-HBV-Luc System zeigte einen immunologischen Korridor auf, bei dem sowohl niedrige als auch hohe Antigenmengen die virale Persistenz begünstigen, eine moderate Infektionsdosis jedoch zu einem akut selbst-limitierten Verlauf führte. Dabei war eine chronische Ad-HBV-Luc Infektion, im Gegensatz zu einer akut selbst-limitierten Infektion, mit einem erschöpften und dysfunktionalen CD8 T-Zell-Phänotyp verbunden.

Zusammenfassend wurden mithilfe der hier generierten Modellsysteme mehrere Mechanismen der viralen Persistenz in der Leber gezeigt. Insbesondere zeigte sich, dass die Antigenmenge sowie Antigenverteilung über einen chronischen oder akuten Verlauf entscheiden.

2. Abstract

Liver infections with hepatitis B virus (HBV) account for 257 Mio. chronic patients worldwide leading to a global health problem [1]. Dysfunctional anti-viral CD8 T cell responses are associated with HBV persistence and can lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2-4]. However, reasons for failure of CD8 T cell immunity remain largely unknown. To unravel the mechanisms responsible for chronic viral liver infection and impaired CD8 T cell immunity, two different murine experimental *in vivo* systems for hepatotropic virus infections have been established.

To investigate general mechanisms of viral persistence in the liver, two identical replication-deficient recombinant adenoviruses have been generated, expressing eGFP and luciferase as reporter proteins as well as ovalbumin as antigen under the ubiquitous CMV- (Ad-CMV-GOL) or hepatocyte-specific Transthyretin (TTR) promoter (Ad-TTR-GOL). An Ad-CMV-GOL infection resulted in an acute infection with self-limited disease. In contrast, the hepatocyte-specific expression led to persistent infection by the Ad-TTR-GOL. Thereby, Ad-TTR-GOL persistence was elicited by absent activation antigen-specific of CD8 T cells by dendritic cells in secondary lymphoid organs resulting in low expansion and a dysfunctional phenotype. Moreover, infection with Ad-TTR-GOL led to identification of a novel mechanism of immune evasion, whereby infected hepatocytes expressing low levels of viral antigen could escape CD8 T cell effector function. Thereby, infected hepatocytes prevented their elimination by presenting virus encoded peptides on MHC-I molecules below the threshold for T cell effector function. For translation of these results to a clinically relevant infection, a replication-deficient recombinant adenovirus has been generated, which transferred HBV1.3 genomes and a luciferase sequence into murine hepatocytes (Ad-HBV-Luc). Using Ad-HBV-Luc unraveled an immunological corridor whereby both low and high antigen burden favored viral persistence. In contrast, a moderate infectious dose of Ad-HBV-Luc led to an acute infection with self-limited disease. In difference to acute self-limited infection, Ad-HBV-Luc persistence was characterized by exhausted CD8 T cells with a dysfunctional phenotype.

In summary, the here generated hepatitis model systems unraveled several mechanisms responsible for viral persistence in the liver. These mechanisms highlighted the role of antigen burden and antigen distribution determining acute or chronic course of infection.

3. Einleitung

3.1 Regulation der Immunität in der Leber

Die Leber ist ein zentrales Stoffwechselorgan, das unter anderem für Entgiftung, Protein-, Glukose- und Lipidhaushalt verantwortlich ist [5-7]. Aufgrund ihrer einzigartigen Lage kommt der Leber jedoch auch eine wichtige Rolle als lymphoides Organ zu [7, 8]. Die Leber wird nur zu etwa 20 % arteriell mit Sauerstoff-reichem Blut versorgt. Die restlichen 80 % erreichen die Leber über die Portalvene, welche Blut aus dem Gastrointestinaltrakt in die Leber transportiert [8-10]. Dadurch ist die Leber in hohem Maße Nahrungsmittelantigenen und bakteriellen Abbauprodukten ausgesetzt, welche Mustererkennungsrezeptoren des innate Immunsystems stimulieren können [8, 9, 11]. Um übermäßige Inflammationen und damit einhergehende Organschädigung zu vermeiden, herrschen in der Leber verschiedene Mechanismen, um ein tolerogenes Milieu zu schaffen. So können Leber-residente Makrophagen, die Kupffer Zellen, das Interleukin (IL) 10 und hepatische Sternzellen TGF- β (*engl.* tumor growth factor β) sezernieren, die beide immun-suppressiv wirken [12, 13]. Darüber hinaus werden in der Leber die Enzyme Tryptophan-2,3-Dioxygenase und Arginase exprimiert, welche die Proliferation von Lymphozyten hemmen [14, 15]. Dieses tolerogene Milieu kann auch dazu beitragen, dass manche Pathogene, wie das Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (HCV) oder das für Malaria-verantwortlich *Plasmodium spp.* in der Leber eine chronische Infektion etablieren können [8].

Trotz der tolerogenen Umgebung existieren in der Leber dennoch Mechanismen, um über das innate Immunsystem eine Inflammation induzieren zu können [9]. Um potentiell pathogene Antigene im Blut zu erkennen, sind die Blutgefäße in der Leber durch die Sinusoid-Endothelzellen (*engl.* liver sinusoidal endothelial cells, LSECs) ausgekleidet und mit Kupffer Zellen und Sternzellen angereichert [10]. Diese Zellen können mithilfe der Mustererkennungsrezeptoren pathogene Strukturen in der Leber früh erkennen und inflammatorische Zytokine freisetzen [10]. LSECs fungieren zusätzlich als Leber-residente Antigen-präsentierende Zellen. So können sie entweder regulatorische T-Zellen (Tregs) induzieren oder CD8 T-Zellen durch Kreuz-Präsentation von löslichen Antigenen aktivieren [16-18]. Um die Leber vor Pathogenen und viralen Infektionen zu schützen, spielt das innate Immunsystem eine wichtige Rolle. Deshalb kommen Natürliche Killer (NK) Zellen und Natürliche Killer T (NKT) Zellen in der Leber außergewöhnlich häufig vor. Anders als in anderen Organen, machen NK- und NKT Zellen jeweils ca. 30 % der Gesamtlymphozytenpopulation in der Leber aus [19]. Damit können einerseits schnelle innate Immunantworten eingeleitet werden, andererseits kann folglich mithilfe der ausgeschütteten Zytokine die adaptive Immunantwort aktiviert und moduliert werden [20].

3.2 Immunologische Mechanismen und Charakteristika bei Virus-Infektionen der Leber

Im Rahmen der adaptiven Immunantwort kommt den Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen bei der Eliminierung von viralen Leberinfektionen eine zentrale Rolle zu [9, 21, 22]. Die Regulierung dieser Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen kann auf verschiedene Wege geschehen. Klassischerweise findet die Aktivierung (*engl.* priming) von CD8 T-Zellen in sekundären lymphoiden Organen, wie Lymphknoten und Milz, durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (*engl.* antigen presenting cells, APCs) statt [23, 24]. Allerdings konnte auch eine Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen in der Leber gezeigt werden [25-28]. Dabei können Kupffer Zellen, LSECs, Leber-residente dendritische Zellen (*engl.* dendritic cells, DCs) und Hepatozyten als Antigen-präsentierende Zellen fungieren [29]. Einerseits kann Antigen-Präsentation an naive CD8 T-Zellen durch Hepatozyten eine Eliminierung oder Bim-abhängige Apoptose der T-Zellen auslösen [30, 31]. Andererseits kann eine Antigen-Präsentation durch Hepatozyten auch zu einer Aktivierung und Expansion der CD8 T-Zellen in der Leber führen [32]. Dieser Prozess scheint jedoch stark von der Menge des präsentierten Antigens und der MHC-I Moleküle auf der Oberfläche von Hepatozyten abzuhängen [32]. Während eine geringe Antigen-Präsentation auf Hepatozyten eine kurzlebige CD8 T-Zell-Antwort induzieren kann, führt eine hohe Antigen-Präsentation zu Anergie und Erschöpfung der T-Zellen [27, 33, 34]. Kupffer Zellen wurden im Zusammenhang der Toleranzinduktion von T-Zellen beschrieben [35]. Unter inflammatorischen Bedingungen können Kupffer Zellen jedoch ko-stimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche verstärkt exprimieren und so zu einer Aktivierung von CD4 - und CD8 T-Zellen in der Leber führen [26, 36]. Anders als konventionelle DCs in lymphoiden Organen, exprimieren Leber-residente DCs weniger MHC und ko-stimulatorische Moleküle, was in einer eingeschränkten Fähigkeit resultiert, T-Zellen zu aktivieren. Darüber hinaus müssen DCs unter inflammatorischen Bedingungen reifen, um T-Zellen aktivieren zu können [37]. Im Gegensatz zu DCs, können LSECs CD8 T-Zellen auch unter nicht inflammatorischen Bedingungen durch Kreuz-Präsentation von löslichen Antigenen aktivieren [18]. Während eine Aktivierung durch DCs ohne inflammatorische Stimuli zur Deletion von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen führt, können durch LSECs aktivierte CD8 T-Zellen zu einer besonderen Form von Gedächtniszellen differenzieren und während einer auftretenden Entzündung re-aktiviert werden [38]. Dieser Leber-spezifische Mechanismus könnte dazu beitragen, eine adaptive Immunantwort gegenüber Pathogenen zu generieren, die innate Stimuli umgehen. Aufgrund des tolerogenen Milieus in der Leber ist die Aktivierung der adaptiven Immunantwort ohne eine Entzündungsreaktion stark beeinträchtigt. CD4 T-Zellen können in der Leber die CD8 T-Zell-Antwort durch IL-2, IL-21, Aktivierung von APCs oder Koordination der CD8 T-Zell-Interaktion mit APCs durch Chemokine zusätzlich positiv beeinflussen [39]. Auf der anderen Seite können jedoch auch immun-suppressive oder regulatorische Zellen einen Einfluss auf die CD8 T-Zell-Antwort und Erschöpfung nehmen. So

können Tregs durch Sekretion von IL-10 und TGF- β die T-Effektorzellen während akuter und früher chronischer Infektionen unterdrücken sowie zur T-Zellerschöpfung führen [40]. Darüber hinaus können erschöpfte APCs, myeloide Suppressorzellen, CD8 Tregs und NK Zellen zur T-Zell-Erschöpfung und somit zu persistenten viralen Infektionen in der Leber beitragen [41-43]. So können NK Zellen im Rahmen ihrer regulatorischen Funktion Antigen-spezifische CD8 T-Zellen in der Leber lysieren und somit die adaptive Immunantwort einschränken [44]. Konnte eine funktionale adaptive Immunantwort generiert werden, dann können Antigen-spezifische CD8 T-Zellen infizierte Hepatozyten auf drei Arten eliminieren: (1) zytolytisch durch Sekretion von Perforin/Granzym B bzw. durch den FAS-Liganden, der nach Bindung an den FAS-Rezeptor in Hepatozyten Apoptose induziert; (2) nicht-zytolytisch durch Sekretion von Zytokinen, wie Interferon γ (IFN γ), die die virale Replikation hemmen; oder (3) durch nicht-kanonische Effektorfunktion, bei der durch LSECs stimulierte CD8 T-Zellen Tumornekrosefaktor (TNF) sekretieren, das ausschließlich in infizierten Hepatozyten Apoptose induziert [45-48].

Können bereits aktivierte CD8 T-Zellen die infizierten Hepatozyten nicht rechtzeitig eliminieren, so kann eine andauernde (virale) Antigenlast und die damit verbundene kontinuierliche Stimulation des T-Zell-Rezeptors zum erschöpften Zustand der T-Zellen führen [41]. Dadurch kann die Anzahl und Effektorfunktion von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen progressiv eingeschränkt werden [49, 50]. Die T-Zell-Erschöpfung wird durch langfristige Expression von Markern wie PD-1 (*engl.* programmed cell death protein 1), CTLA-4 (*engl.* cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) und Tim-3 (*engl.* T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3) charakterisiert [41]. Auch das Gleichgewicht der Transkriptionsfaktoren Tcf-1 (*engl.* T-cell factor 1), TOX (*engl.* Thymocyte selection-associated high mobility group box), Eomes (Eomesodermin) und T-bet (*engl.* T-box expressed in T cells) stehen im Zusammenhang der erschöpften T-Zell-Antwort [41, 51-53]. T-Zellen, die einen erschöpften Zustand annehmen, verlieren zunächst, die Kapazität IL-2 und TNF zu produzieren [41, 54, 55]. Während eines weiter fortgeschrittenen Erschöpfungszustandes verlieren die T-Zellen zusätzlich die Kapazität, IFN- γ zu produzieren [55-58]. Ist die virale Antigenlast kontinuierlich zu hoch, können die T-Zellen im letzten Schritt der Erschöpfung deletiert werden [59]. Das Ausmaß der Erschöpfung hängt von der viralen Last, der CD4 T-Zell-Hilfe sowie der Dauer der Infektion ab [41].

Kontinuierliche Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch präsentiertes Antigen gilt als die Hauptursache von erschöpften CD8 T-Zellen [41]. Dennoch können sich CD8 T-Zellen nach Reduktion der Antigenlast wieder erholen und in T-Gedächtniszellen entwickeln, sofern sie der Stimulation durch viel Antigen nicht allzu lange ausgesetzt waren [52, 60, 61]. Damit sind Antigenlast und Expositionsdauer wichtige Determinanten der T-Zell-Erschöpfung [41].

3.3 Immunantwort gegen Hepatitis B Virus Infektion

Anders als die meisten viralen Infektionen, bei denen das Virus in der Anfangsphase logarithmisch expandiert, amplifiziert das HBV nur verzögert und führt damit zur asymptomatischen HBV Infektion, die in eine chronische Infektion übergehen kann [62]. Eine HBV Infektion ist auch durch eine außergewöhnlich lange Inkubationszeit und lange Immunantwort, insgesamt bis zu sechs Monaten, gekennzeichnet [63]. Diese lange Phase, bis Immunantworten induziert werden, kann der Tatsache geschuldet werden, dass das HBV nur eine schwache innate Immunantwort induziert. Während einer initialen Infektion konnten bisher kaum oder nur wenige pro-inflammatorische Zytokine, wie Typ-I IFN, IL-15 und IFN-lambda1, detektiert werden [64-67]. Stattdessen wurde in der Anfangsphase der Infektion das immun-suppressive IL-10 sekretiert, welches gleichzeitig mit transient inhibierter NK- und T-Zell-Antwort und Virämie auftrat [64]. Bisher ist unklar, ob die fehlende innate Immunantwort auf das Nichterkennen der HBV Infektion oder einen aktiven Flucht-Mechanismus des Virus zurückzuführen ist. NK Zellen spielen während der HBV Infektion eine wichtige Rolle. Sie können regulatorische oder anti-virale Funktionen ausüben [9]. Bereits früh nach HBV Infektion können vermehrt NK Zellen in der Zirkulation detektiert werden, ihre Anzahl sinkt jedoch wieder sobald die virale Last steigt [45, 64]. Während chronischer HBV Infektionen scheinen die NK Zellen durch IL-10 und TGF- β supprimiert zu werden [68]. Gegenteilige Ergebnisse belegen die Beteiligung von NK Zellen an Leberschaden [69]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NK Zellen in der Leber HBV-spezifische T-Zellen eliminieren können, die PD-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren [44]. Die Effizienz der Behandlung von chronischer Hepatitis B mittels IFN α kann hauptsächlich auf Aktivierung der NK Zellen zurückgeführt werden [62]. Unmittelbar nach IFN α -Therapie konnten Proliferation und Aktivierung von NK Zellen, sowie wiederhergestellte anti-virale IFN γ Produktion detektiert werden [70, 71].

Für die Eliminierung einer HBV Infektion sind HBV-spezifische CD8 T-Zellen von zentraler Bedeutung [21, 46]. Dabei wird die nicht-zytolytische CD8 T-Zell-Effektorfunktion eher im frühen Stadium der HBV Infektion ausgeübt, während die zytolytische Funktion erst im späteren Verlauf die Rolle übernimmt, um eine effiziente Eliminierung des Virus mit möglichst geringem Leberschaden zu ermöglichen [45, 72]. Eine chronische HBV Infektion ist jedoch von einer schwachen, progressiv erschöpften CD8 T-Zell-Antwort oder der Bim-abhängig Deletion von HBV-spezifischen CD8 T-Zellen gekennzeichnet [73-76]. Es konnte gezeigt werden, dass CD8 T-Zellen während einer chronischen HBV Infektion begrenzte proliferative Kapazitäten und geringe Sekretion von anti-viralen Zytokinen wie IFN γ aufweisen [73]. Darüber hinaus ko-exprimieren CD8 T-Zellen die Erschöpfungsmarker wie PD-1, CTLA-4, Tim-3 oder 2B4 (CD244) auf ihrer Oberfläche [9]. Dabei ist der erschöpfte Phänotyp auf Leber-assoziierten CD8 T-Zellen stärker ausgeprägt als auf CD8 T-Zellen in der Peripherie [77]. Dies mag an der Produktion der jeweiligen Liganden von Hepatozyten in der Leber unter

inflammatorischen Bedingungen liegen [9]. Zusätzlich exprimieren LSECs, Kupffer-Zellen und Sternzellen kontinuierlich den PD-I-Liganden [9]. Weitere Faktoren, die zu T-Zell-Erschöpfung führen können, sind anhaltende (hohe) Antigenlast, fehlende CD4 T-Zell-Hilfe, direkte Suppression durch Tregs, inhibitorische Zytokine (IL-10, TGF- β) oder intrahepatische geringe Arginin-Level [9]. Trotz der zentralen Rolle von CD8 T-Zellen während der Eliminierung einer HBV Infektion, sind lediglich 1 % der Leber-infiltrierten T-Zellen Antigen-spezifisch [9]. Damit können CD8 T-Zellen indirekt zum Leberschaden führen, wenn sie nicht in der Lage sind, das Virus zu eliminieren [78]. In Patienten mit chronischer HBV Infektion wurde gehäuftes Vorkommen von Tregs, Th17 und Th22 Zellen, die CD161 und CXCR6-Rezeptoren exprimieren, in der Leber beobachtet [79-82]. Während Tregs anti-inflammatorische Funktionen ausüben können, sezernieren Th17 und Th22 Zellen IL-17 und IL-22, welche sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte haben können [9, 62].

Auch CD4 T-Zellen spielen bei der Kontrolle einer HBV Infektion eine entscheidende Rolle und sind für die Aktivierung von CD8 T-Zellen notwendig [9]. Abwesenheit von CD4 T-Zellen vor einer HBV Infektion resultierte in einer ausbleibenden CD8 T-Zellantwort und chronischer Hepatitis [83]. CD4 T-Zell-Hilfe während einer akuten HBV Infektion ist stark ausgeprägt und resultiert in einer Th1-Antwort [63, 84, 85]. Darüber hinaus wird die CD4 T-Zell-Hilfe für eine effiziente Antikörperproduktion durch B-Zellen benötigt [62]. Die Antikörper können virale Partikel in der Zirkulation neutralisieren und verhindern eine erneute Hepatozyten-Infektion [86]. Eine humorale Antwort durch Generierung von neutralisierenden Antikörpern wurde zwar während HBV Infektionen beschrieben, spielt aber in Zusammenhang mit der Eliminierung einer akuten Infektion nur eine untergeordnete Rolle [87].

3.4 Hepatitis B Virus

a) Pathogenese

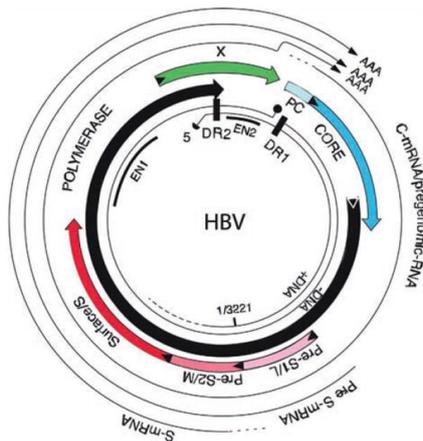
Das humane Hepatitis B Virus (HBV) besitzt ein enges Wirtsspektrum und kann auf natürliche Weise nur auf Menschen, Schimpansen oder Makaken übertragen werden [88-92]. Infektionen mit dem HBV führen im Erwachsenenalter in 5 % der Fälle zu einer chronischen Infektion der Leber, als deren Folge sich im Laufe der Jahre eine Leberzirrhose, ein hepatozelluläres Karzinom oder ein Leberversagen entwickeln kann [2-4]. Vertikal übertragene Infektion von Müttern auf Neugeborene oder Infektionen im frühen Kindesalter führen in bis zu 90 % der Fälle zu einer chronischen Infektion [93]. Damit verursachte das HBV 257 Millionen chronische Erkrankungen, mit einer globalen Prävalenz von 3,5 % der Weltbevölkerung, und führte im Jahr 2015 zu 887.000 Todesfällen aufgrund von Folgeerkrankungen [94]. Eine HBV Infektion wird über Blut oder Körperflüssigkeiten, sowie Vaginal-, Samen- oder Speichelflüssigkeit, übertragen [1]. Im frühen Stadium verläuft die Infektion meist asymptomatisch. Wird das HBV innerhalb von sechs Monaten nach Infektion nicht eliminiert, so etabliert sich eine chronische

Hepatitis [1]. Heutzutage ist ein prophylaktischer Impfstoff verfügbar, der vor einer HBV Infektion schützt. Viele chronische Infektionen entstanden jedoch bevor der vorsorgliche Impfstoff gegen HBV entwickelt wurde, weshalb therapeutische Maßnahmen nach einer Infektion mit chronischem Verlauf erforderlich sind [94]. Darüber hinaus sind die Medikamente und der Impfstoff nicht in allen Ländern, vor allem nicht in Entwicklungsländern, verfügbar [94]. Aktuell werden Nukleos(t)idanaloga und (pegyliertes) IFN α zur Therapie von chronischen HBV Infektionen verabreicht [95, 96]. Diese Behandlung führt jedoch nur in 1 % der Fälle zu einer vollständigen Eliminierung des HBV, weshalb die meisten Patienten an wiederkehrender Virämie und Entzündung der Leber leiden [97-99]. Gründe für eine selten heilbare chronische Infektion liegen in der Molekularbiologie des HBV und der Anatomie der Leber. Eine Besonderheit des HBV liegt darin, dass es aufgrund seiner Wechselwirkung mit dem Natriumtaurocholat-Cotransporter-Polypeptid (*engl.* sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) ausschließlich die Hepatozyten der Leber infizieren kann [100]. In der Leber werden jedoch aufgrund ihres einzigartigen Milieus überwiegend Toleranzmechanismen, anstatt Immunität, begünstigt [8]. Eine weitere Besonderheit des HBV, die dessen Persistenz begünstigt, liegt im viralen Lebenszyklus und der Bildung eines Minichromosoms, der *covalently closed circular DNA* (cccDNA), das als Templat für virale DNA-Replikation und RNA-Synthese dient [97-99]. Die cccDNA, die nach einer HBV Infektion im Nucleus der Hepatozyten gebildet wird, und deren Integration in das Wirtsgenom begünstigen die HBV Persistenz auf molekularer Ebene [98, 101].

b) Molekularer Aufbau des Hepatitis B Virus

Das HBV gehört zu den Hepadnaviridae und stellt ein behülltes Virus mit zirkulärer, partiell doppelsträngiger *relaxed circular DNA* (rcDNA) dar [102]. Das Genom und die daran kovalent gebundene virale Polymerase sind in ein Nukleokapsid (28 nm), bestehend aus ikosaedrisch angeordneten Hepatitis B Core (HBc/HBcore) Proteinen, verpackt [103, 104]. Das Nukleokapsid ist nach außen hin zusätzlich mit Hepatitis B Surface (HBs) Proteinen umhüllt, die in drei Formen vorkommen: HBs L (*large*), M (*middle*) und S (*small*) [103, 105]. Die als Dane Partikel bezeichneten infektiösen Viren haben einen Durchmesser von 42 nm [103]. Das virale Genom hat eine Größe von ca. 3,2 kbp, das in Abhängigkeit des HBV Genotyps (A-J) bzw. der geographischen Verteilung in seiner Länge und Sequenz variieren kann [106]. Das kompakte HBV-Genom verfügt über vier überlappende offene Leseramen (*engl.* open reading frames, ORFs) ([schematische Darstellung 1](#)). Der Minus-Strang der DNA kodiert für das gesamte Genom, beinhaltend die vier ORFs, vier Promotoren, zwei Enhancer, sechs Start-Codons sowie eine Polyadenylierungssequenz. Damit ergeben sich die mRNA Transkripte PreC/C (3,5 kb), PreS (2,4 kb), S (2,1 kb) und X (0,7 kb) [102]. Somit kodieren die viralen mRNAs für das PreCore (HBe) bzw. Core (HBc/HBcore) Protein, drei Surface Proteine (HBs

L, M, S), die Polymerase und das X Protein (HBx) [102, 107]. Während das HBcore Protein für den Aufbau des Nukleokapsid zuständig ist, gilt das HBe Protein als sekretorische Form des HBcore Proteins, das posttranskriptionell prozessiert und im Blut als HBe Antigen (HBeAg) detektiert werden kann und damit als diagnostischer Marker dient [108]. Die drei HBs Proteine L, M und S werden in einem ORF mit drei Start-Codons kodiert. Das HBs Antigen (HBsAg) im Blut während chronischer HBV Infektion ist mit hepatozellulärem Karzinom assoziiert und dient ebenfalls als diagnostischer Marker [109, 110]. Auf Grundlage des HBsAg konnte das heutige Vakzin gegen eine HBV Infektion entwickelt werden [111, 112]. Die Polymerase kodiert für mehrere funktionelle Domänen für die reverse Transkriptase, RNaseH und eine Primer-Sequenz, die für die Synthese der viralen rcDNA im Nukleokapsid erforderlich sind [113]. Das HBx Protein ist durch Initiieren und Aufrechterhalten der viralen Replikation für den Lebenszyklus des HBV verantwortlich [114, 115].



Schematische Darstellung 1: Hepatitis B Virus Genom. Abbildung entnommen aus Seeger und Mason, Virology, 2015 [102].

3.5 Modellsysteme zur Untersuchung der Immunantworten gegen Leberinfektion

Aufgrund des engen Wirtsspektrums von HBV gestalten sich Studien des Immunsystems gegen das Virus und Mechanismen der Persistenz als schwierig. Kleintiermodelle zur Untersuchung der HBV Infektion sind nötig. Da Mäuse auf natürliche Weise sich jedoch nicht mit HBV infizieren lassen, müssen gute Modelle für das HBV gefunden werden oder das Virus auf unnatürliche Weise in murine Lebern gebracht werden.

a) Lymphozytäres Choriomeningitis Virus

Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) ist ein nicht-zytopathisches Arenavirus und wurde oft als Model zur Untersuchung der viralen Hepatitis in Mäusen verwendet [75]. Mithilfe des LCMV konnten bereits mehrere immunologische Erkenntnisse zu MHC-I-abhängigen Antigenerkennung, Mechanismen der zytotoxischen T-Zellen, Ausbildung des immunologischen Gedächtnis oder T-Zell-Erschöpfung gemacht werden [116-119].

Das LCMV ist ein RNA-Virus und stellt ein replikationsfähiges System dar [120]. Auch während einer LCMV Infektion spielen die CD8 T-Zellen, ähnlich einer HBV Infektion, eine zentrale Rolle [121]. Verschiedene LCMV Stämme führen zu unterschiedlichen Infektionsverläufen. So können die Stämme WE (geringe Infektionsdosis) und Armstrong eliminiert werden, während der Stamm 13 oder WE (hohe Infektionsdosis) persistieren [121-124]. Es wurde beschrieben, dass die Persistenz des LCMV Stamms 13 auf einen eingeschränkten Typ-I IFN Signalweg zurückgeführt werden kann [125, 126]. Nichtsdestotrotz repliziert das LCMV hauptsächlich in DCs und unterscheidet sich damit zwangsläufig von einer HBV Infektion [127-129]. Dabei ist das LCMV nicht hepatotrop und nach einer Infektion können virale Partikel in Organen wie Gehirn, Nieren, Milz oder Lymphknoten nachgewiesen werden [55, 130].

b) Lösliche, sekretorische Model-Antigene

Ovalbumin stellt eines der am besten untersuchten und charakterisierten Antigene dar und ist aufgrund seiner Immunogenität und gut beschriebener Epitope ein geeignetes Antigen zur Untersuchung der adaptiven Immunantwort [131, 132]. Das Ovalbumin kann spezifisch in Hepatozyten exprimiert werden und der Einfluss des Antigens kann durch induzierbare Promotoren oder sekretorische bzw. nicht-sekretorische Isoformen des Proteins untersucht werden [133, 134]. Einbringen der Ovalbumin-DNA in Hepatozyten mithilfe eines adenoviralen Vektors ermöglichte bereits Untersuchungen der viralen Hepatitis in der Maus [48, 135]. Dabei können Ovalbumin-spezifische CD8 T-Zellen (CD45.1 OT-I T-Zellen) vor der Infektion adoptiv transferiert werden, die das immundominante Peptid Ova257-264 (SIINFEKL) auf MHC-I Molekülen erkennen und anhand ihres kongenen Markers CD45.1 re-isoliert und untersucht werden können [38, 135]. Nichtsdestotrotz ist das Ovalbumin ein Model-Antigen, dessen Epitope andere Bindungs- und Erkennungscharakter aufweisen als die der HBV-assoziierten Proteine. So kann im Ovalbumin-angelehnten Model eine CD8 T-Zell-Antwort unabhängig von der CD4 T-Zell-Hilfe generiert werden, im Gegensatz zur CD8 T-Zell-Antwort während einer HBV Infektion [46, 136].

c) HBV-transgene Maus

Eines der ältesten HBV-angelehnten Kleintiermodelle stellen replikationskompetente HBV-transgene Mäuse dar, die 1995 von Guidotti *et al.* generiert wurden [137]. In diesem Model wurde das HBV1.3-Überlängengenom transgen in Mäuse eingebracht, wo es in Hepatozyten repliziert, ohne Leberschaden zu induzieren [137, 138]. Mithilfe dieses Models konnten bereits mehrere anti-virale Therapeutika getestet werden [139, 140]. Aufgrund der zentralen Toleranz gegenüber HBV-Antigenen können in diesem Model die Immunantworten gegen das HBV nur schwer untersucht werden [141]. Erwähnenswert ist, dass die cccDNA in diesem murinen Modellsystem nicht gebildet werden kann [102]. Das HBV-replikationskompetente transgene

Mausmodel eignet sich nicht dazu, den viralen Lebenszyklus und die Bildung bzw. Eliminierung der cccDNA zu untersuchen.

d) Humanisiertes Mausmodell

Humanisierte Mausmodelle für HBV Infektionen stellen chimäre Mäuse dar, die humane Hepatozyten tragen und dadurch mit dem HBV natürlich infiziert werden können [142-146]. Um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, basiert dieses System auf immundefizienten Mäusen ohne T-Zell-, B-Zell-, NK Zell-Antwort und ohne γ -Kette des IL-2 Rezeptors [138, 143, 145]. Durch die Infektion der chimären Mäuse mit HBV können in dem humanisierten Mausmodell verschiedene Schritte des viralen Lebenszyklus, die cccDNA Bildung und antivirale Therapeutika untersucht werden [147]. Aufgrund der Immundefizienz eignet sich dieses Modell jedoch nicht zur Untersuchung der Immunantwort oder der Immunpathologie. Transfer von MHC-übereinstimmenden humanen Immunzellen aus demselben Donor könnte Aufschlüsse über HBV-spezifische Immunität liefern [138, 148].

e) MUP-(Pre)Core transgene Maus

Das Epitop HBcore93-100 (MGLKFRQL) des HBcore Proteins wurde im Kontext des MHC-I Moleküls H2-Kb in der C57BL/6 Maus gut beschrieben und gilt als ein immundominantes Peptid [149]. Im MUP-PreCore oder MUP-Core transgenen Modell wird das HBcore Protein unter dem MUP (*engl.* mouse major urinary protein) Promoter Hepatozyten-spezifisch exprimiert [150]. Dabei kann im MUP-Core System das HBcore Protein nicht sekretiert, während es im MUP-PreCore von Hepatozyten sekretiert werden kann [151]. Dieses Mausmodell kann gut zur Untersuchung der CD8 T-Zell-Aktivierung in der Leber herangezogen werden [152]. Um eine Immunantwort gegen das HBV zu untersuchen, müssen jedoch alle HBV-spezifischen Proteine einbezogen werden.

f) Hydrodynamische Injektion von Hepatitis B Virus Plasmid-DNA

Die hydrodynamische Injektion von zirkulärer HBV-DNA, um HBV-Genome in Hepatozyten einzubringen, wird in der Forschung oft verwendet, um einen akut selbst-limitierenden Krankheitsverlauf nachzustellen [141, 153, 154]. Transfer von HBV-Plasmiden in immunkompetente Mäuse erlaubt es, die vollständige HBV-spezifische Immunantwort zu untersuchen. Die hydrodynamische Injektion selbst löst jedoch einen starken Leberschaden aus, was mit einer Inflammation verbunden ist, die während einer natürlichen HBV Infektion nicht vorhanden ist [62, 154-156]. Die damit verbundene Aktivierung des innate Immunsystems könnten einen Einfluss auf das adaptive Immunsystem nehmen.

g) Transfer von Hepatitis B Virus DNA durch Adeno-assoziierte Vektoren

Alternativ können HBV-Genome durch Adeno-assoziierte Vektoren (AAV) in murine Hepatozyten eingebracht werden, ohne Leberschaden zu induzieren [141]. Danach kann das HBV in Hepatozyten replizieren, ohne jedoch neue Hepatozyten infizieren zu können aufgrund des fehlenden NTCP-Rezeptors und eines weiteren bisher unbekanntes Faktors in der Maus [157]. Nach einer AAV-HBV Infektion können alle HBV-spezifischen Proteine exprimiert werden, wodurch in immunkompetenten Mäusen die Immunantwort gegen das HBV untersucht werden kann. Im AAV-HBV Model konnte sogar die Bildung einer cccDNA nachgewiesen werden [158]. Eine AAV-HBV Infektion führt jedoch zwangsläufig zu einem chronischen Krankheitsverlauf, wodurch die in dem System zu testenden Therapeutika die HBV-spezifische Replikation bzw. Expression lediglich unterdrücken [141]. Dennoch kann in diesem System eine Re-Aktivierung des Immunsystems nach Behandlung beobachtet werden, die Aufschlüsse über die Potenz der getesteten anti-viralen Therapeutika gibt [159].

h) Transfer von Hepatitis B Virus DNA durch adenovirale Vektoren

Auch der Transfer von HBV-Genomen mittels adenoviraler Vektoren ermöglicht das Einbringen der HBV-DNA in Hepatozyten, ohne Leberschaden zu induzieren [141]. Dabei wurde von Sprinzl *et. al* das HBV1.3 Überlängenkonstrukt in einen adenoviralen Vektor des Serotyp 5 mit deletierten adenoviralen Regionen E1A/E1B und E3 eingebracht (Ad-HBV1.3) [160]. Durch die E1A/E1B Deletion wurde die Replikationsfähigkeit des Adenovirus und durch die E3 Deletionen das Erkennen des Adenovirus durch Abwehrmechanismen im Wirt ausgeschlossen [161, 162]. Das HBV kann nach adenoviralem Transfer in Hepatozyten replizieren und exprimiert alle HBV-spezifischen Proteine [160]. Eine Ad-HBV1.3 Infektion initiiert eine T-Zell-Antwort und kann somit zur Analyse des Immunsystems gegen das HBV herangezogen werden. Bisher sind eindeutige Ergebnisse zur Persistenz und Eliminierung von Ad-HBV1.3 nicht publiziert. In den meisten Fällen resultiert das Ad-HBV1.3 in einer chronischen Infektion [154, 163]. Nur durch hohe Infektionsdosen, die einen Leberschaden auslösen, wurde die Eliminierung des Ad-HBV1.3 bisher beschrieben [154]. Im Gegensatz zu dem Transfer mittels Adeno-assoziierten Vektoren können in adenovirale Vektoren zusätzlich zum HBV1.3 Überlängenkonstrukt noch weitere Markerproteine wie Luziferase oder Fluoreszenzproteine eingebracht werden.

3.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Doktorarbeit war es, neue Modellsysteme für virale Infektionen der Leber in der Maus zu etablieren und die CD8 T-Zell-Antwort gegen diese zu charakterisieren. Hierbei sollten Virus-assoziierte Mechanismen untersucht werden, die die virale Persistenz begünstigen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine akut selbst-limitierte und chronische Ovalbumin-basierte adenovirale Leberinfektion etabliert werden, bei der das Ovalbumin Promoter-spezifisch jeweils ubiquitär oder nur in Hepatozyten exprimiert werden kann, vergleichbar der Expression HBV-spezifischer Proteine. Damit sollte der Einfluss der Antigenexpression auf den Verlauf einer anti-viralen CD8 T-Zell-Antwort untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte das aus dem ersten Model erlangte Wissen auf eine HBV Infektion übertragen werden, bei der HBV1.3-Genome in murine Hepatozyten mittels adenoviralen Vektoren eingebracht werden. Dabei sollte das bisher publizierte Model Ad-HBV1.3 um einen Luziferase-Biomarker erweitert werden, um den Infektionsverlauf *in vivo* genauer verfolgen zu können. Darüber hinaus sollte detailliert untersucht werden, welchen Einfluss die Antigemenge bzw. die Infektionsdosis auf den Infektionsverlauf nimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Bildung der adenoviralen Leberinfektion

Zur Infektion der Leber wurden rekombinante replikationsdefiziente Adenoviren des Serotyp 5 generiert. Als Transgene wurden Ovalbumin (O) als immunologisches Antigen und eGFP (G), Luziferase (L) und/oder iRFP720 (iR) als Reporterproteine unter einem ubiquitären CMV-Promoter oder einem Hepatozyten-spezifischen TTR-Promoter exprimiert (Abb. 1). Somit wurden die Adenoviren Ad-CMV-GOL, Ad-TTR-GOL, Ad-CMV-GiRO und Ad-TTR-GiRO generiert. Die Sequenzen für pEntr-CMV-GOL und pEntr-TTR-GOL und die jeweiligen Viren standen bereits zur Verfügung (Abb. 1 A, B). pEntr-CMV-GiRO und pEntr-TTR-GiRO wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert (Abb. 1 C). Zur Klonierung der Expressionskassette wurden die Transgene zunächst in ein pEntr-Plasmid kloniert und nachfolgend in den viralen pDest-Vektor rekombiniert. Die adenovirale DNA wurde in HEK293-Zellen amplifiziert und in virale Partikel verpackt. Alle Transgene wurden durch eine T2A-Sequenz getrennt, sodass die Expression der Reporterproteine mit der Ovalbumin-Expression direkt korreliert und zur Antigen-Quantifizierung herangezogen werden kann.

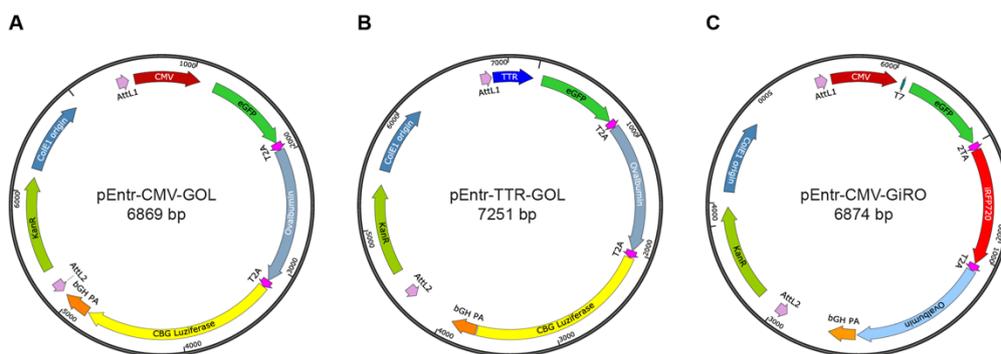


Abb. 1: Plasmidkarten von (A) pEntr-CMV-GOL, (B) pEntr-TTR-GOL und (C) pEntr-CMV-GiRO. (A) Expression von eGFP, Ovalbumin und Luziferase unter CMV-Promoter. (B) Expression von eGFP, Ovalbumin und Luziferase unter TTR-Promoter. (C) Expression von eGFP, Ovalbumin und iRFP720 unter CMV-Promoter. (A-C) Die Transgene wurden jeweils durch eine T2A-Sequenz getrennt.

Es ist bekannt, dass intravenös verabreichte Adenoviren des Serotyp 5 hauptsächlich Hepatozyten infizieren [164]. Zur Charakterisierung der hier generierten Adenoviren wurden C57BL/6 Mäuse mit jeweils 10^9 pfu Ad-CMV-GOL, Ad-TTR-GOL, Ad-CMV-GiRO und Ad-TTR-GiRO intravenös infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden den Tieren Leber, Milz, Lunge, Herz, Niere sowie Darm entnommen und mittels Fluoreszenz- und Biolumineszenzmessung auf Expression der Virus-kodierten Markerproteine untersucht (Abb. 2). Es konnte gezeigt werden, dass nach Infektion mittels Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL die Biolumineszenz des Markerproteins Luziferase spezifisch in der Leber detektiert werden kann (Abb. 2 A). Auch nach Infektion mittels Ad-CMV-GiRO bzw. Ad-TTR-

GiRO konnte die iRFP720-Fluoreszenz spezifisch in der Leber detektiert werden (Abb. 2 A, B). Nach absoluter Quantifizierung der iRFP720-Fluoreszenz nach einer Ad-CMV-GiRO Infektion konnte zusätzlich Fluoreszenz in der Milz detektiert werden, was auf eine Infektion der Milz hindeutet, jedoch signifikant weniger im Vergleich zur Infektion der Leber (Abb. 2 B). Es konnte belegt werden, dass die hier generierten Adenoviren hepatotrop sind und sich zur Untersuchung einer Infektion der Leber eignen.

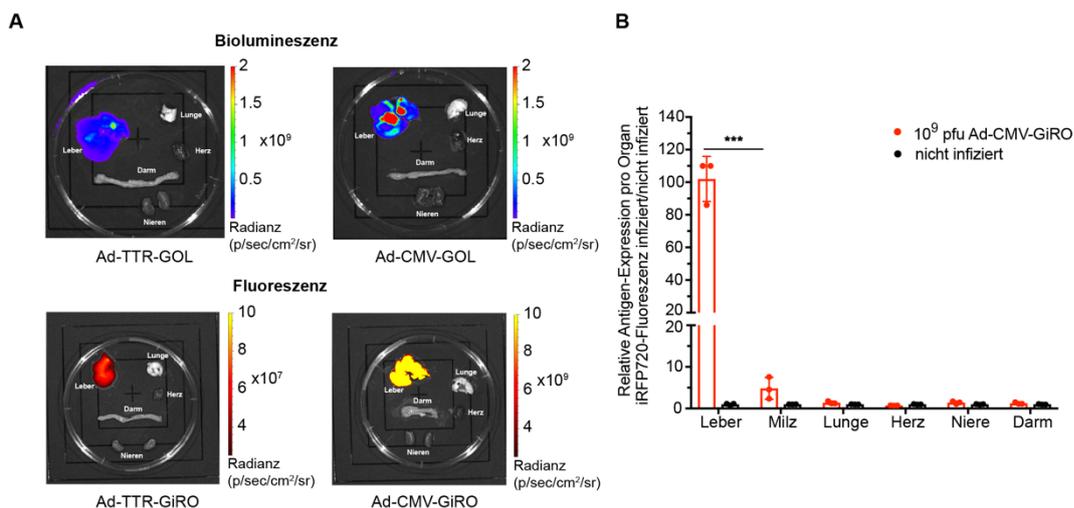


Abb. 2: Hepatotropismus der adenoviralen Infektion. (A) Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Bildgebung von angegebenen Organen 2 Tage nach Infektion der Mäuse mittels 10⁹ pfu Ad-CMV-GOL, Ad-TTR-GOL, Ad-CMV-GiRO bzw. Ad-TTR-GiRO. Detektion der Biolumineszenz erfolgte anhand von Luziferase. Fluoreszenzmessung erfolgte anhand von iRFP720. (B) Quantifizierung der iRFP720-Fluoreszenz in den angegebenen Organen 2 Tage nach Infektion mit 10⁹ pfu Ad-CMV-GiRO (n=3). (A) Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Um zu vergleichen, welchen Einfluss die Expression der Transgene unter dem ubiquitären CMV- bzw. dem Hepatozyten-spezifischen TTR-Promoter hat, wurden C57BL/6 Mäuse mit 10⁹ pfu Ad-CMV-GOL oder Ad-TTR-GOL infiziert und 2 Tage danach die Biolumineszenz in der Leber detektiert (Abb. 3 A). Es konnte gezeigt werden, dass trotz gleicher Infektionsdosis unter dem TTR-Promoter 100-mal weniger Luziferase exprimiert und detektiert werden kann als unter dem CMV-Promoter. Um zu zeigen, dass die Luziferase sich als Marker für eine adenovirale Infektion eignet, wurden Mäuse mit aufsteigenden Dosen von 10⁴ bis 10⁹ pfu Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL infiziert. 2 Tage nach Infektion wurde die Biolumineszenz in der Leber quantifiziert (Abb. 3 B). Dabei korrelierte die Infektionsdosis mit der Biolumineszenz. Damit konnte die Luziferase zur Quantifizierung der Leberinfektion sowie zur Quantifizierung der Antigenexpression in diesem Modellsystem herangezogen werden.

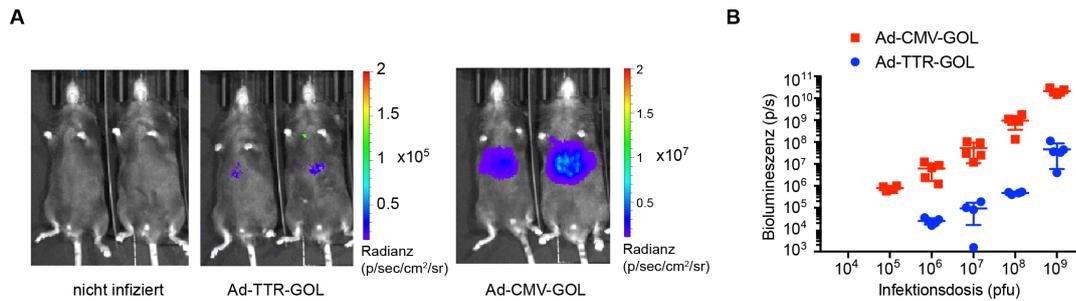


Abb. 3: Korrelation zwischen Infektionsdosis und Biolumineszenz. (A) Biolumineszenz-Bildgebung 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GOL und Ad-TTR-GOL (10^9 pfu). (B) Biolumineszenz in Mäusen in Abhängigkeit der Infektionsdosis 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GOL (rot) und Ad-TTR-GOL (blau) ($n=5$). (A-B) Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

4.2 Rolle der Antigenexpression für eine chronische Leberinfektion

Bisher ist nicht vollständig verstanden, welche Rolle die Expression des Antigens bei einer Leberinfektion in Bezug auf Expressionsort und Quantität spielt. Deshalb wurden hier die Viren Ad-CMV-GOL und Ad-TTR-GOL über einen Zeitraum von 50 bzw. 90 Tagen in C57BL/6 Mäusen titriert. Hierfür wurden die Mäuse mit aufsteigenden Dosen 10^5 bis 10^9 pfu Ad-CMV-GOL bzw. 10^6 bis 10^9 pfu Ad-TTR-GOL infiziert und die Viruseliminierung mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung verfolgt (Abb. 4). Da die Antigenexpression unter dem TTR-Promoter schwächer ist als unter dem CMV-Promoter und die Biolumineszenz-Messung an ihr Detektionslimit gelangt, wurde auf die Infektion mit 10^5 pfu Ad-TTR-GOL verzichtet. Es zeigte sich, dass nach einer Ad-CMV-GOL Infektion mit 10^5 bis 10^8 pfu und ubiquitärer Antigenexpression das Virus eliminiert werden konnte (Abb. 4 A). Eine Infektion mit 10^9 pfu Ad-CMV-GOL konnte dagegen aufgrund eines initialen und unspezifischen Leberschadens (nicht veröffentlichte Daten) in Zusammenhang mit der hohen Expression an Transgenen nicht eliminiert werden und persistierte. Im Gegensatz dazu konnte keine der Infektionsdosen des Ad-TTR-GOL, bei dem die Antigene Hepatozyten-spezifisch exprimiert werden, eliminiert werden. Damit zeigte sich, dass eine Hepatozyten-spezifische Antigenexpression, trotz geringer Antigenlast, zwangsläufig zu einer chronischen Infektion führte.

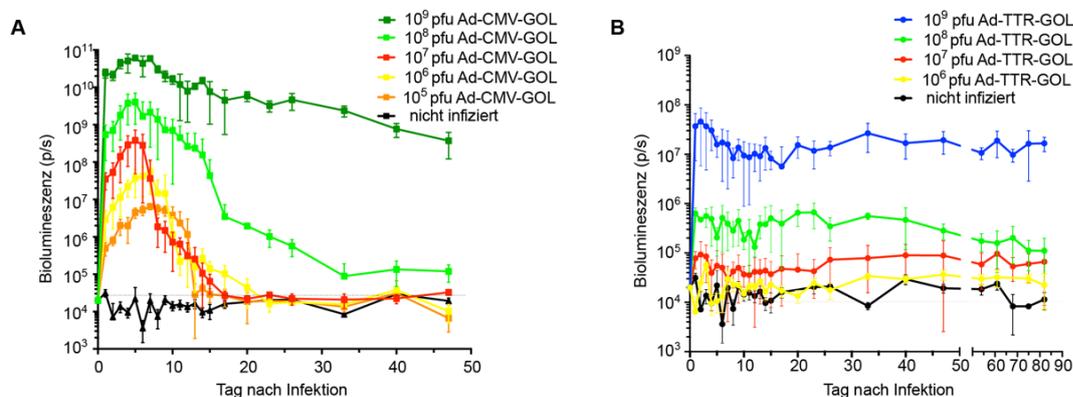


Abb. 4: Einfluss der Antigenexpression auf die Viruseliminierung. (A) Quantifizierung der Biolumineszenz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit den angegebenen Dosen des Ad-CMV-GOL ($n=5$). (B) Quantifizierung der Biolumineszenz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit den angegebenen Dosen des Ad-TTR-GOL ($n=5$). (A-B) Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Im Folgenden wurde geklärt, welche Zellen für die Eliminierung einer akut selbst-limitierten Infektion verantwortlich sind. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit 10^7 pfu Ad-CMV-GOL infiziert und jeweils CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen oder NK1.1 Zellen depletiert (Abb. 5 A, B). Die erfolgreiche Zelldepletion wurde in Leber, Milz und Blut durchflusszytometrisch überprüft (Abb. 5 A). Verfolgung der Viruseliminierung mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung über die Zeit nach Infektion und Depletion zeigte, dass CD8 T-Zellen für die Eliminierung einer akut selbst-limitierten Dosis des Ad-CMV-GOL unerlässlich sind, wohingegen CD4 T-Zellen und NK1.1 Zellen nicht zwangsläufig benötigt werden (Abb. 5 B).

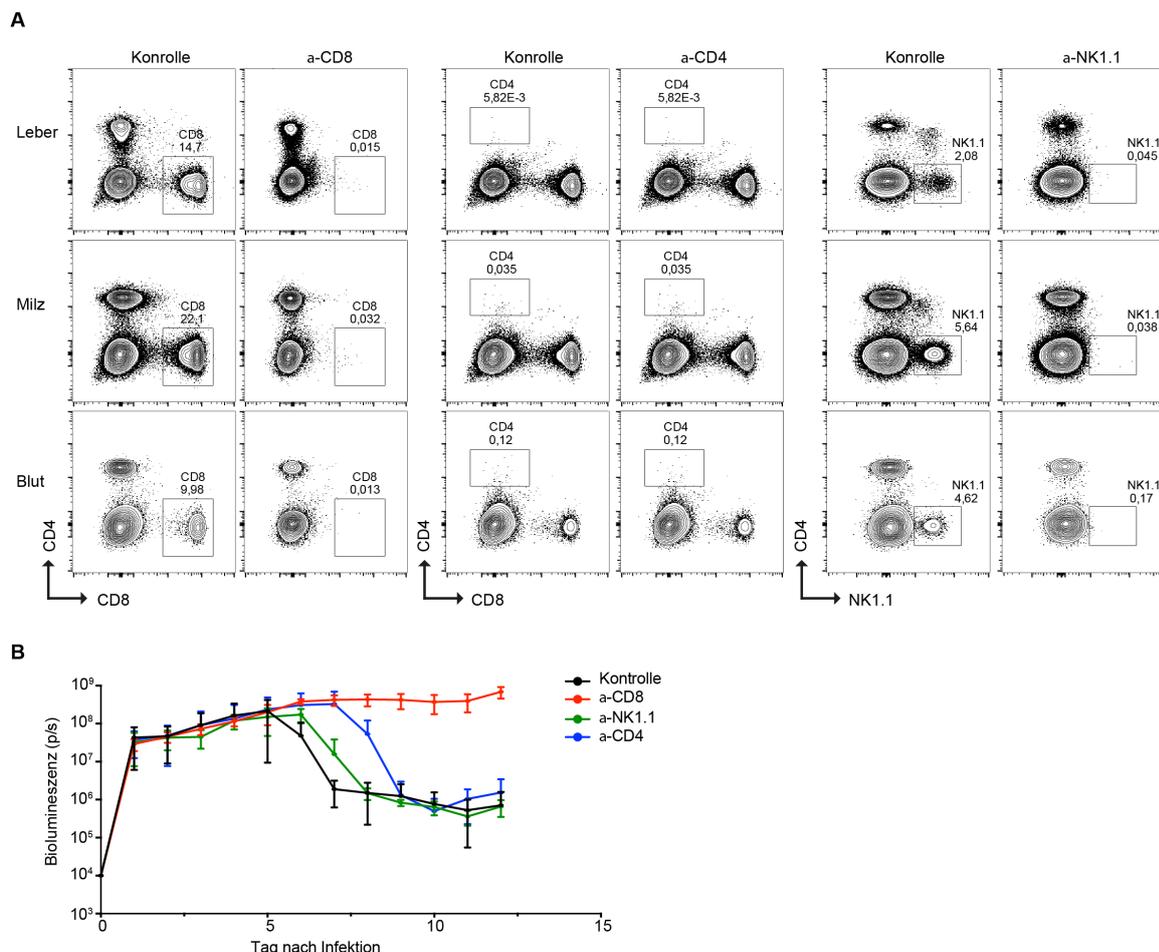


Abb. 5: Verantwortliche Zellpopulationen für die Eliminierung einer akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion. (A) Durchflusszytometrische Analyse von Leber, Milz und Blut nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 10^7 pfu Ad-CMV-GOL und angegebener Zelldepletion. (B) Quantifizierung der Biolumineszenz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 10^7 pfu Ad-CMV-GOL und angegebener Zelldepletion (n=5). Die Depletion erfolgte mit 30 μ g anti-Maus CD8 α (Klon 2.43), 300 μ g anti-Maus CD4 (Klon GK1.5) oder 300 μ g anti-Maus NK1.1 (Klon PK136). (A-B) Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Es wurde identifiziert, dass CD8 T-Zellen die Hauptpopulation darstellt, die bei der Immunantwort gegen eine akut selbst-limitierte Ad-CMV-GOL Infektion beteiligt ist. Nachfolgend wurde eine akut selbst-limitierte Ad-CMV-GOL und eine chronische Ad-TTR-GOL Infektion gegenübergestellt und untersucht, welchen Einfluss der Infektionsverlauf auf die Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen hat. Da die Antigenexpression unter dem CMV- und TTR-Promoter sich 100-fach unterscheidet, wurden für eine akut selbst-

limitierte und eine chronische Infektion mit Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL die jeweiligen Infektionsdosen so gewählt, dass das exprimierte Antigen vergleichbar ist. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit 10^7 pfu Ad-CMV-GOL oder 10^9 pfu Ad-TTR-GOL infiziert. Mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung konnte sichergestellt werden, dass die dabei exprimierte Antigenlast an Tag 2 nach Infektion vergleichbar ist (Abb. 6 A). Da die im Adenovirus kodierten Transgene eGFP, Ovalbumin und Luziferase jeweils durch eine T2A-Sequenz getrennt sind, ist anzunehmen, dass vergleichbar zur Luziferase-Expression auch die Expression von eGFP und Ovalbumin durch die verschiedenen Infektionsdosen angeglichen wurde. Mithilfe einer quantitativen PCR auf adenovirale Genome konnte belegt werden, dass die 100-fache Infektionsdosis mit Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) auch zur 100-fachen adenoviralen Kopien in der Leber nach Infektion führt im Vergleich zur einer Ad-CMV-GOL Infektion (10^7 pfu) (Abb. 6 B). Zusätzlich konnte mithilfe der quantitativen PCR (qPCR) mit einer weiteren Methode, neben der Biolumineszenz-Bildgebung, gezeigt werden, dass die akut selbst-limitierte Dosis von Ad-CMV-GOL eliminiert wird, während Ad-TTR-GOL persistiert. In Zusammenhang mit der Eliminierung von Ad-CMV-GOL konnten erhöhte Alanin-Aminotransferase (ALT)-Werte im Serum gemessen werden, die auf ein Abtöten infizierter Hepatozyten und eine CD8 T-Zell-Effektorfunktion deuten (Abb. 6 C). Nach einer Ad-TTR-GOL Infektion konnten dagegen keine erhöhten ALT-Werte gemessen werden, was mit einer Viruspersistenz korreliert und auf eine abwesende Immunantwort hindeutet. Immunhistochemische Analyse der eGFP-positiven, infizierten Hepatozyten in Leberproben an Tagen 3, 5, 7 und 18 nach Infektion bestätigte nochmals die Eliminierung von Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) (Abb. 6 D). Bei der Analyse von Leberproben nach einer Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) Infektion konnten lediglich an Tag 3 vereinzelt schwach eGFP-positive Hepatozyten detektiert werden. Diese waren an Tagen 5, 7 und 18 nicht mehr sichtbar. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der Biolumineszenz-Bildgebung, in denen die Biolumineszenz nach einer Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) Infektion bis Tag 7 wieder leicht abnimmt (Abb. 6 A). Damit zeigte sich die Biolumineszenz als eine deutlich sensitivere Detektionsmethode der Infektion als die immunhistochemische Analyse der infizierten Hepatozyten mittels eGFP-Färbung, die aufgrund der 100-fach geringeren Expression unter dem TTR-Promoter auf Einzelzellebene nicht detektierbar war.

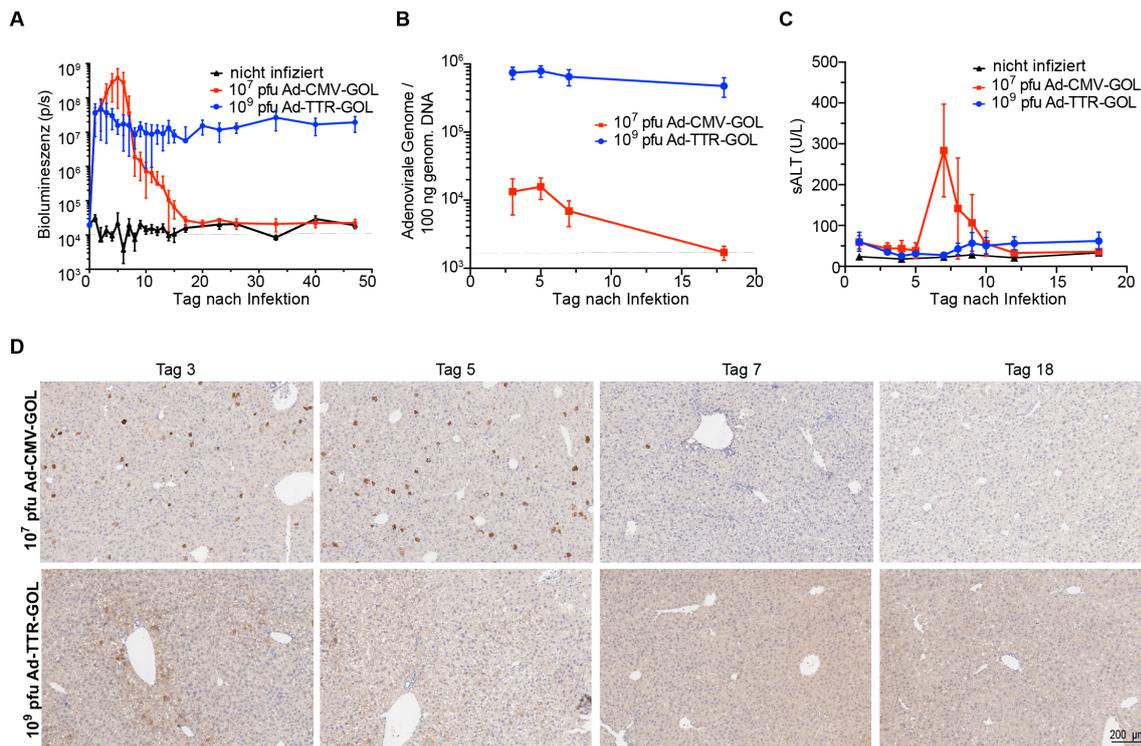


Abb. 6: Charakterisierung der akut selbst-limitierten und chronischen Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL Infektion. (A) Quantifizierung der Biolumineszenz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 10⁷ pfu Ad-CMV-GOL (rot) oder 10⁹ pfu Ad-TTR-GOL (blau) (n=5). (B) Adenovirale Genomkopien in der Leber zu angegebenen Zeitpunkten aus C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 10⁷ pfu Ad-CMV-GOL (rot) oder 10⁹ pfu Ad-TTR-GOL (blau) (n=5). (C) sALT-Werte in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 10⁷ pfu Ad-CMV-GOL (rot) oder 10⁹ pfu Ad-TTR-GOL (blau) (n=5). (D) Immunhistochemische Analyse der eGFP-Expression in der Leber zu den angegebenen Zeitpunkten aus C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 10⁷ pfu Ad-CMV-GOL oder 10⁹ pfu Ad-TTR-GOL. (A-D) Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Nachdem bewiesen wurde, dass eine Expression der Antigene unter einem Hepatozyten-spezifischen Promoter zur Persistenz der adenoviralen Infektion führt, stellte sich die Frage, ob Antigen-spezifische CD8 T-Zellen in diesem Model aktiviert werden können. Während nach einer Ad-CMV-GOL Infektion die Antigene ubiquitär exprimiert werden können und CD8 T-Zellen in lymphoiden Organen aktiviert werden können, ist dies bei einer Expression der Antigene unter dem TTR-Promoter unklar. Um die Aktivierung in einem lymphoiden Organ zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit 10⁹ pfu Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL intravenös infiziert und 2 Tage später die Milz entnommen. Die Milzen wurde auf Infektion bzw. Antigenexpression mittels Biolumineszenz-Bildgebung untersucht (Abb. 7 A). Es zeigte sich, dass nach einer Ad-CMV-GOL Infektion signifikant mehr Luziferase in der Milz exprimiert wurde als nach einer Ad-TTR-GOL Infektion. Verglichen jedoch mit einer nicht infizierten Kontrolle, war dennoch Luziferase-Expression nach einer Ad-TTR-GOL Infektion messbar. Dies kann entweder auf Infektion der Milz und Hepatozyten-unspezifische Antigenexpression oder eine Antigenaufnahme aus der Blutzirkulation zurückgeführt werden. Während Ovalbumin als sekretorisches Antigen beschrieben wurde, gilt Luziferase jedoch als nicht sekretorisch. Dennoch ist in Anbetracht dessen, dass unter dem TTR-Promoter 100-fach weniger Ovalbumin exprimiert wird, welches in die Zirkulation gelangen kann, anzunehmen, dass die aufgenommene Ovalbumin-Menge in der Milz während einer Ad-TTR-GOL Infektion

deutlich geringer ist als während einer Ad-CMV-GOL Infektion ist. Damit bleibt die Fragestellung nach einer intakten CD8 T-Zell-Aktivierung während der chronischen Ad-TTR-GOL Infektion relevant. Deshalb wurden C57BL/6 Mäuse mit 10^9 pfu Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL infiziert und 2 Tage danach CD11c DCs aus der Milz isoliert. Diese wurden mit naiven Ovalbumin-spezifischen CD45.1 OT-I T-Zellen ko-kultiviert. Einen Tag nach Ko-Kultur wurden die CD45.1 OT-I T-Zellen auf Aktivierung durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 7 B). Es wurde gezeigt, dass CD11c DCs aus Ad-TTR-GOL infizierten Tieren, vergleichbar zu CD11c DCs aus nicht infizierten Kontroll-Tieren, die CD45.1 OT-I T-Zellen nicht aktiviert haben, da die CD45.1 OT-I T-Zellen negativ für CD44 und CD25 waren. Im Gegenzug dazu wurden CD45.1 OT-I T-Zellen von CD11c DCs, isoliert aus Ad-CMV-GOL infizierten Tieren, erfolgreich aktiviert und exprimierten CD44 sowie CD25 vergleichbar zur Positiv-Kontrolle, bei der nicht infizierte CD11c DCs mit Ovalbumin beladen und mit naiven CD45.1 OT-I T-Zellen ko-kultiviert wurden.

Damit konnte gezeigt werden, dass nach einer Ad-TTR-GOL Infektion die Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nicht in der Milz aktiviert werden, anders als bei einer Ad-CMV-GOL Infektion.

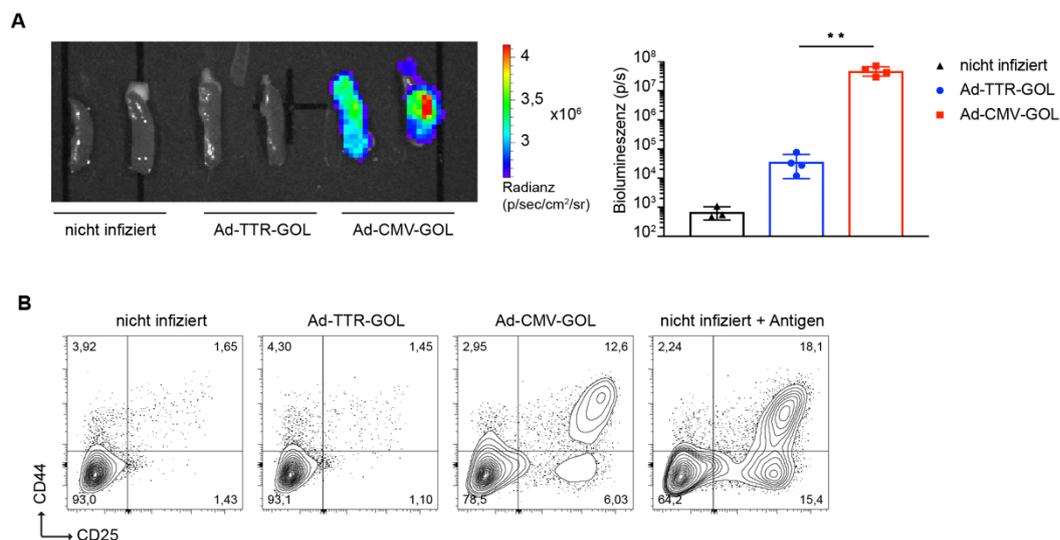


Abb. 7: CD8 T-Zell-Aktivierung nach akut selbst-limitierter und chronischer Leberinfektion. (A) Biolumineszenz-Bildgebung und Quantifizierung in Milzen aus C57BL/6 Mäusen 2 Tage nach Ad-CMV-GOL oder Ad-TTR-GOL Infektion (10^9 pfu) (n=4). (B) Durchflusszytometrische Analyse von CD44 und CD25 auf Ovalbumin-spezifischen OT-I T-Zellen nach Ko-Kultur mit CD11c-positiven Splenozyten, isoliert aus C57BL/6 Mäusen 2 Tage nach Ad-CMV-GOL oder Ad-TTR-GOL Infektion (10^9 pfu) (n=4). Für die Positiv-Kontrolle wurden nicht infizierte CD11c-positiv Splenozyten mit 200 µg/ml Ovalbumin und OT-I T-Zellen kultiviert. Experiment durchgeführt von Verena König. (A-B) Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

4.3 Dynamik der CD8 T-Zell-Antwort während akut selbst-limitierter und chronischer Leberinfektion

Nachdem bekannt war, dass während einer chronischen Ad-TTR-GOL Infektion die Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nicht in den lymphoiden Organen, wie der Milz, aktiviert werden, stellte sich die Frage, ob überhaupt eine adaptive Immunantwort generiert wird und welchen

Phänotyp sie aufweist. Deshalb wurden C57BL/6 Mäusen 100 Ovalbumin-spezifische CD45.1 OT-I T-Zellen transferiert und einen Tag danach 10^7 pfu Ad-CMV-GOL, 10^7 pfu bzw. 10^9 pfu Ad-TTR-GOL intravenös injiziert. An den Tagen 5, 7 und 18 nach Infektion wurden Lymphozyten aus Milz und Leber isoliert und die transferierten Antigen-spezifischen CD45.1 OT-I T-Zellen anhand ihres kongenen CD45.1-Markers durchflusszytometrisch quantifiziert. Während der akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) Infektion waren CD45.1 OT-I T-Zellen in der Milz zu finden, die von Tag 5 bis Tag 7 nach Infektion expandierten (8×10^5 CD45.1 OT-I T-Zellen pro Milz), einhergehend mit ansteigenden ALT-Werten (Abb. 6 C), und von Tag 7 auf Tag 18 wieder kontrahierten (Abb. 8 A). Dieselbe Kinetik der CD45.1 OT-I T-Zellen wurde auch in der Leber beobachtet mit einer Expansionsphase bis Tag 7 (2×10^6 CD45.1 OT-I T-Zellen pro Leber) und einer Kontraktionsphase auf Tag 18, an dem die Infektion eliminiert wurde (Abb. 8 B). Im Gegensatz dazu expandierten die CD45.1 OT-I T-Zellen bei einer chronischen Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) Infektion, trotz gleicher Antigenmenge in der Leber, lediglich auf 10^3 CD45.1 OT-I T-Zellen pro Milz (Abb. 8 A). Auch in der Leber zeigten die CD45.1 OT-I T-Zellen bei einer chronischen Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) Infektion eine deutlich langsamere Expansion, im Vergleich zur Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) Infektion, und eine absolute Zellzahl von 10^3 CD45.1 OT-I T-Zellen pro Leber an Tag 7 (Abb. 8 B). Anders als bei der Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) Infektion, wiesen die CD45.1 OT-I T-Zellen bei einer chronischen Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) Infektion keine Kontraktionsphase auf und expandierten an Tag 18 auf 3×10^4 CD45.1 OT-I T-Zellen pro Leber. Bei der Kontrolle mit Infektion von 10^7 pfu Ad-TTR-GOL, bei der gleich viele Hepatozyten infiziert wurden wie bei der akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) Infektion, sind die 100 adoptiv transferierten CD45.1 OT-I T-Zellen in der Milz sowie in der Leber kaum expandiert (Abb. 8 A, B). Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse eine langsamere und schwächere Expansion von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen während der chronischen Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) Infektion, verglichen mit der akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) Infektion.

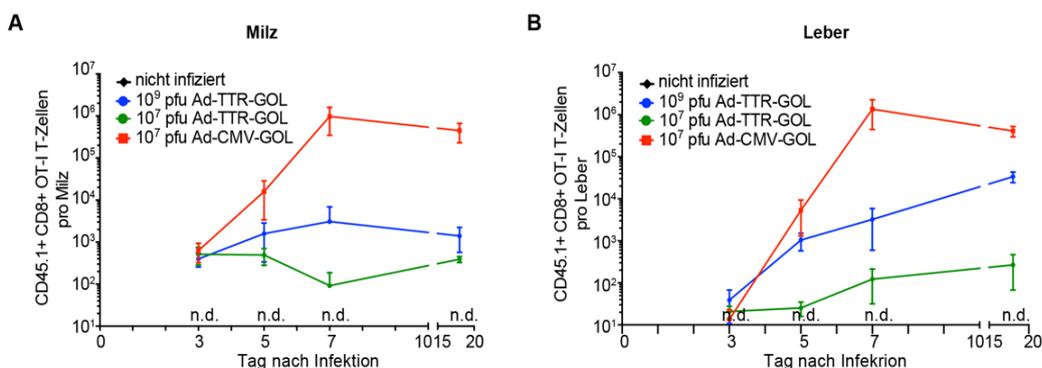


Abb. 8: Expansion von Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen nach adenoviraler Leberinfektion. (A-B) Quantifizierung von CD45.1 OT-I T-Zellen in Milz (A) und Leber (B) nach Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) oder Ad-TTR-GOL (10^7 pfu, 10^9 pfu) Infektion (n=4). Einen Tag vor Infektion wurden 100 naive CD44^{neg} CD62L^{pos} CD45.1 OT-I T-Zellen adoptiv transferiert. Analyse von lebenden CD44-positiven CD45.1 CD8 T-Zellen. Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Trotz Persistenz von Ad-TTR-GOL und der eingeschränkten CD8 T-Zell-Aktivierung in der Milz, konnten expandierte Antigen-spezifische CD45.1 OT-I T-Zellen in der Leber gefunden werden (Abb. 8 B). Da sowohl während der akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL als auch der chronischen Ad-TTR-GOL Infektion eine adaptive Immunantwort generiert wurde, wurde nachfolgend der Phänotyp der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen charakterisiert. Hierfür wurden die einen Tag vor Infektion transferierten CD45.1 OT-I T-Zellen an den Tagen 5, 7 und 18 nach Infektion mit Ad-CMV-GOL (10^7 pfu) bzw. mit Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenmarker untersucht (Abb. 9). Aufgrund der geringen Expansion konnten während einer Infektion mit 10^7 pfu Ad-TTR-GOL nicht genug CD45.1 OT-I T-Zellen detektiert werden, um phänotypisch charakterisiert zu werden.

5 Tage nach akut selbst-limitierter und chronischer Infektion konnten Antigen-erfahrene CD44-positive CD45.1 OT-I T-Zellen sowohl in Leber als auch in Milz detektiert werden (Abb. 9 A). CD45.1 OT-I T-Zellen, isoliert aus der Milz von akut selbst-limitiert und chronisch infizierten Mäusen, exprimierten im geringen Ausmaß die γ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche, was auf eine Aktivierung der CD8 T-Zellen hindeutete. Eine CD25-Expression auf OT-I T-Zellen, isoliert aus der Leber, konnte weder nach Ad-CMV-GOL noch nach Ad-TTR-GOL Infektion gezeigt werden. Interessanterweise wiesen CD45.1 OT-I T-Zellen bereits an Tag 5 nach chronischer Ad-TTR-GOL Infektion eine hohe Expression von CD62L (L-Selectin) in der Milz und zum geringen Anteil in der Leber auf, die während einer Ad-CMV-GOL Infektion abwesend war (Abb. 9 A). Sowohl 5 Tage nach akut selbst-limitierter als auch nach chronischer Infektion wurden in Leber und Milz die Aktivierungs- bzw. Erschöpfungs-Marker PD-I und LAG-3 auf CD45.1 OT-I T-Zellen exprimiert, was früh nach Infektion zunächst eine Aktivierung der CD8 T-Zellen vermuten ließ. Im Gegensatz zu LAG-3, wurde PD-I in der Milz auf nur der Hälfte der CD45.1 OT-I T-Zellen an Tag 5 nach chronischer Infektion exprimiert.

Nach einer akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion wurden von Tag 5 auf Tag 7 und 18 die Expression von PD-I und LAG-3 auf CD45.1 OT-I T-Zellen, isoliert aus der Leber, immer weiter herunter reguliert (Abb. 9 B, C). Im Gegensatz dazu wurden nach der chronischen Ad-TTR-GOL Infektion an Tag 7 eine erhöhte PD-I und LAG-3 Expression auf Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen detektiert, die sich bis Tag 18 weiter steigerte. Im Vergleich zur Leber wurde in der Milz auf CD45.1 OT-I T-Zellen weniger PD-I und LAG-3 exprimiert. Dennoch reduzierte sich diese Expression von Tag 5 auf Tag 7 und weiterhin auf Tag 18 sowohl während der akut selbst-limitierten als auch der chronischen Infektion (Abb. 9 B, C). Die PD-I-positive CD45.1 OT-I T-Zell-Population in der Milz nach einer Ad-TTR-GOL Infektion reduzierte sich an Tag 7 auf ein Drittel, im Vergleich zu Tag 5, und war an Tag 18 nicht mehr detektierbar. Im Gegensatz dazu nahm die Expression von CD62L auf CD45.1 OT-I T-Zellen in der Milz während der chronischen Ad-TTR-GOL Infektion von Tag 5 auf Tag 7 und 18 immer

weiter zu. Während der akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion war an keinem der analysierten Tage CD62L auf Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen in der Milz stark exprimiert. Zusammenfassend wurde während einer akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion ein aktivierter Phänotyp der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen an Tagen 5 und 7 entwickelt, der sich nach Virus-Eliminierung an Tag 18 wieder zurückbildete. Im Gegensatz dazu manifestierte sich mit der hohen PD-I und LAG-3 Expression in der Leber ein erschöpfter CD8 T-Zell-Phänotyp über die Dauer der chronischen Ad-TTR-GOL Infektion. Darüber hinaus zeichnete sich während der Ad-TTR-GOL Infektion aufgrund der hohen CD62L-Expression auf CD45.1 OT-I T-Zellen in der Milz eine Aktivierung der CD8 T-Zellen in der Leber durch LSECs ab.

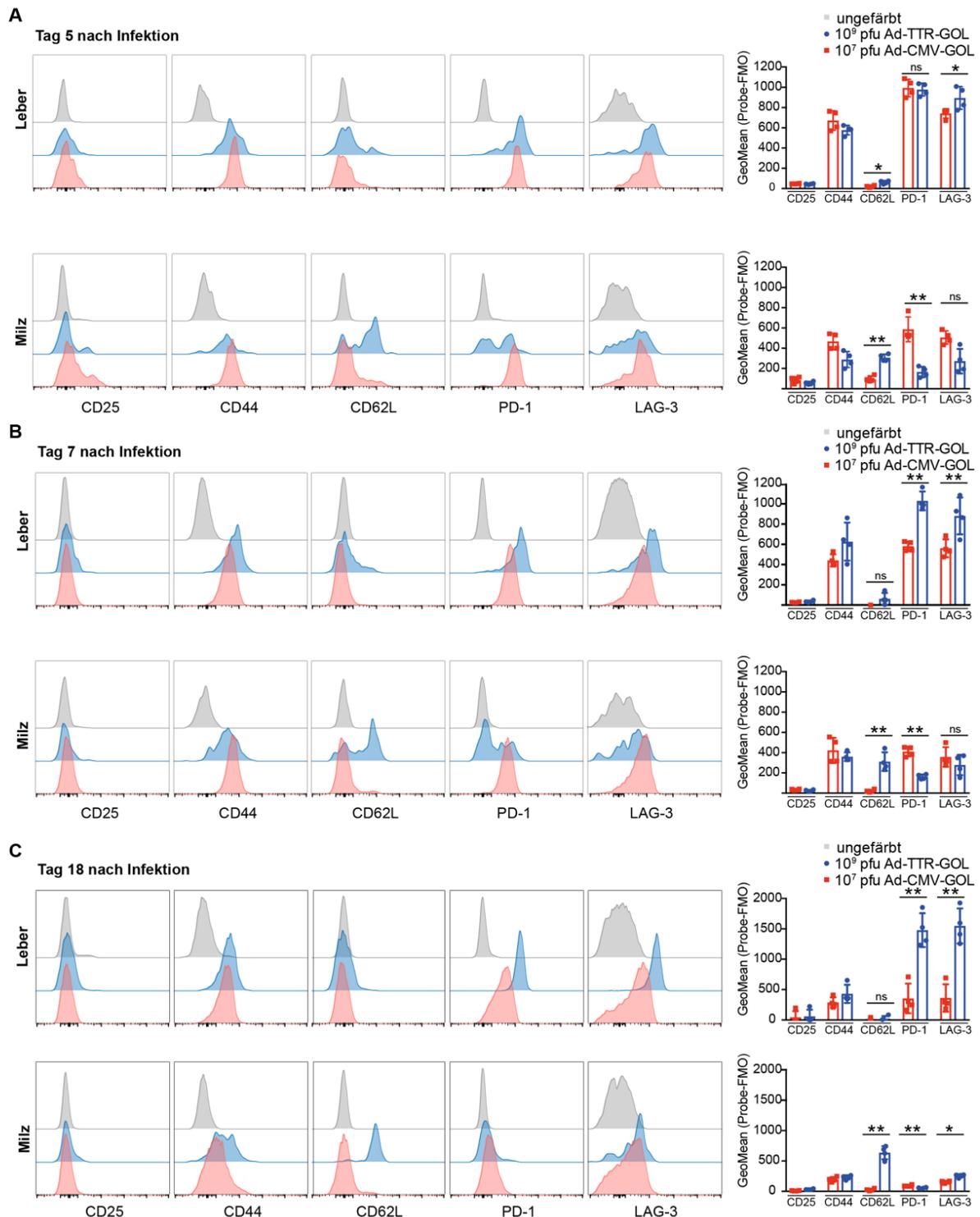


Abb. 9: Phänotyp von Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen nach adenoviraler Leberinfektion. Durchflusszytometrische Analyse und Quantifizierung von Oberflächenmarkern auf Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen (A) Tag 5, (B) Tag 7 und (C) Tag 18 nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 10⁷ pfu Ad-CMV-GOL (rot) oder 10⁹ pfu Ad-TTR-GOL (blau). Einen Tag vor Infektion wurden 100 CD45.1 OT-I T-Zellen adoptiv transferiert. Analyse von lebenden CD45.1 CD8 T-Zellen (n=4). Jedes Histogramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis. Als Negativkontrolle dient eine ungefärbte Probe des jeweiligen Markers (grau). Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Die durchflusszytometrische Analyse der Leber ergab eine Ko-Expression der Erschöpfungsmarker PD-1 mit Tim-3, CD160 oder CTLA-4 auf Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen an Tag 18 nach chronischer Infektion mit Ad-TTR-GOL (Abb. 10). Dabei korrelierte die Expression von PD-1 und LAG-3 am stärksten. KLRG-1 (*engl.* killer cell lectin-

like receptor subfamily G member 1) wurde lediglich während der akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion in der Leber auf Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen auf der PD-1 negativen Population detektiert und deutete auf zytotoxische CD8 T-Zellen hin, die für die Eliminierung der Infektion zuständig waren.

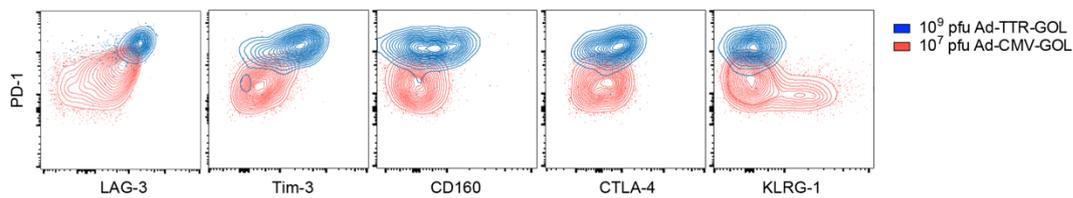


Abb. 10: Ko-Expression von Aktivierungs- und Erschöpfungs-Markern auf Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nach adenoviraler Leberinfektion. Durchflusszytometrische Analyse von CD45.1 OT-I T-Zellen 18 Tage nach Infektion mit 10^7 pfu Ad-CMV-GOL (rot) oder 10^9 pfu Ad-TTR-GOL (blau). Einen Tag vor Infektion wurden 100 CD45.1 OT-I T-Zellen adoptiv transferiert. Analyse von lebenden CD45.1 CD8 T-Zellen (n=4). Jedes Histogramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis. Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Zusätzlich zur KLRG-1-Expression exprimierten Antigen-spezifische CD8 T-Zellen, isoliert aus der Leber, an Tag 18 nach Ad-CMV-GOL Infektion TNF und IFN γ (Abb. 11). Im Gegensatz dazu fehlte der funktionelle Phänotyp auf CD8 T-Zellen nach der chronischen Ad-TTR-GOL Infektion und bestätigte den erschöpften Zustand der Zellen.

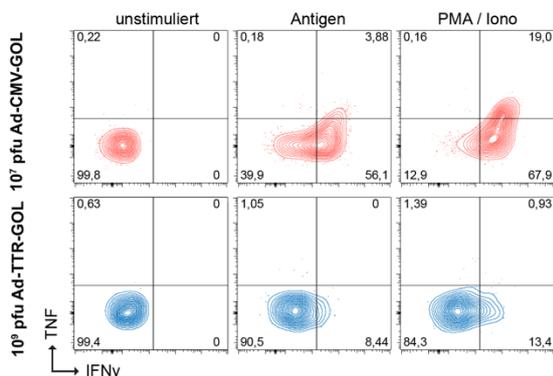


Abb. 11: Re-Stimulation von Leber-assoziierten Lymphozyten nach adenoviraler Leberinfektion. Durchflusszytometrische Analyse von CD45.1 OT-I T-Zellen aus der Leber an Tag 18 nach Infektion. C57BL/6 Mäusen wurden 100 naive CD45.1 OT-I T-Zellen adoptiv transferiert und einen Tag danach 10^7 pfu Ad-CMV-GOL (rot) oder 10^9 pfu Ad-TTR-GOL (blau) intravenös injiziert (n=4). 18 Tage nach Infektion wurden Leber-assoziierte Lymphozyten isoliert und mit Ovalbumin-Peptid (SIINFEKL) bzw. PMA / Ionomycin 9 h re-stimuliert. Analyse von lebenden CD44-postiven CD45.1 OT-I T-Zellen. Jedes Histogramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis. Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

4.4 Hepatozyten-Schutzmechanismus gegen eine CD8 T-Zell-Effektorfunktion

Bisher zeigten die Ergebnisse eine eingeschränkte CD8 T-Zell-Aktivierung während der chronischen Leberinfektion. Dennoch konnten Antigen-spezifische CD8 T-Zellen während einer Ad-TTR-GOL Infektion expandieren, wiesen jedoch einen erschöpften Phänotyp mit fehlender zytotoxischer Effektorfunktion auf. Damit stellte sich die Frage, ob eine Ad-TTR-GOL Infektion eliminiert werden kann, wenn eine vollständige T-Zell-Aktivierung stattfindet, vergleichbar einer Ad-CMV-GOL Infektion. Hierfür wurden beide Adenoviren ko-infiziert. Um den jeweiligen Infektionsverlauf voneinander unterscheiden zu können, wurden die Mäuse mit Ad-CMV-GiRO (10^7 pfu) und/oder Ad-TTR-GOL (10^8 pfu) (ko-)infiziert (Abb. 12). Ad-CMV-GiRO kodiert, im Vergleich zum bisher untersuchten Ad-CMV-GOL Virus, ebenfalls für eGFP und Ovalbumin unter dem CMV-Promoter. Statt des Markes Luziferase wird jedoch iRFP720 unter dem CMV-Promoter exprimiert (Abb. 1 C). Damit konnte die Ad-TTR-GOL

Infektion wie bisher mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung und die Ad-CMV-GiRO Infektion mithilfe der immunhistochemischen Analyse von eGFP in der Leber verfolgt werden. Zwar kodieren beide Viren, Ad-CMV-GiRO und Ad-TTR-GOL, für eGFP, in der immunhistochemischen Analyse der Leber ließ sich allerdings eGFP, exprimiert unter dem TTR-Promoter, aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze nicht detektieren (Abb. 6 D). Da in diesem Experiment zwei Adenoviren ko-infiziert wurden, wurde eine Infektionsdosis von 10^8 pfu Ad-TTR-GOL gewählt, um einen Leberschaden auszuschließen.

C57BL/6 Mäuse wurden jeweils mit Ad-CMV-GiRO (10^7 pfu) und/oder Ad-TTR-GOL (10^8 pfu) (ko-)infiziert. Einen Tag vor Infektion wurden 100 Antigen-spezifische CD45.1 OT-I T-Zellen adoptiv transferiert (Abb. 12). Anhand des Luziferase-Markers konnte gezeigt werden, dass eine Ko-Infektion mit Ad-CMV-GiRO / Ad-TTR-GOL die Persistenz von Ad-TTR-GOL nicht verhindern konnte (Abb. 12 A). Mithilfe der immunhistochemischen Analyse von eGFP-positiven Hepatozyten konnte eine erfolgreiche Ko-Infektion mit Ad-CMV-GiRO bestätigt werden (Abb. 12 B). Wie erwartet konnten keine eGFP-positiven Hepatozyten nach einer Ad-TTR-GOL (10^8 pfu) mithilfe der Immunhistochemie detektiert werden. Damit wurde gezeigt, dass Ad-CMV-GiRO (10^7 pfu) sowohl nach einer Einfach-Infektion als auch nach einer Ko-Infektion mit Ad-TTR-GOL (10^8 pfu) an Tag 18 eliminiert wurde. Während an Tag 2 nach Infektion 30 eGFP-positive Hepatozyten pro mm^2 Leber detektiert wurden, konnten an Tag 18 nach Infektion keine eGFP-positiven Hepatozyten identifiziert werden (Abb. 12 B). Damit stimmte die Kinetik der Ad-CMV-GiRO-Eliminierung mit der Eliminierung von Ad-CMV-GOL überein (Abb. 4 A).

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass während einer Ko-Infektion mit Ad-CMV-GiRO/Ad-TTR-GOL eine anti-virale Immunantwort gebildet wurde, diese aber nur mit einer Eliminierung von Ad-CMV-GiRO assoziiert war, während Ad-TTR-GOL persistierte.

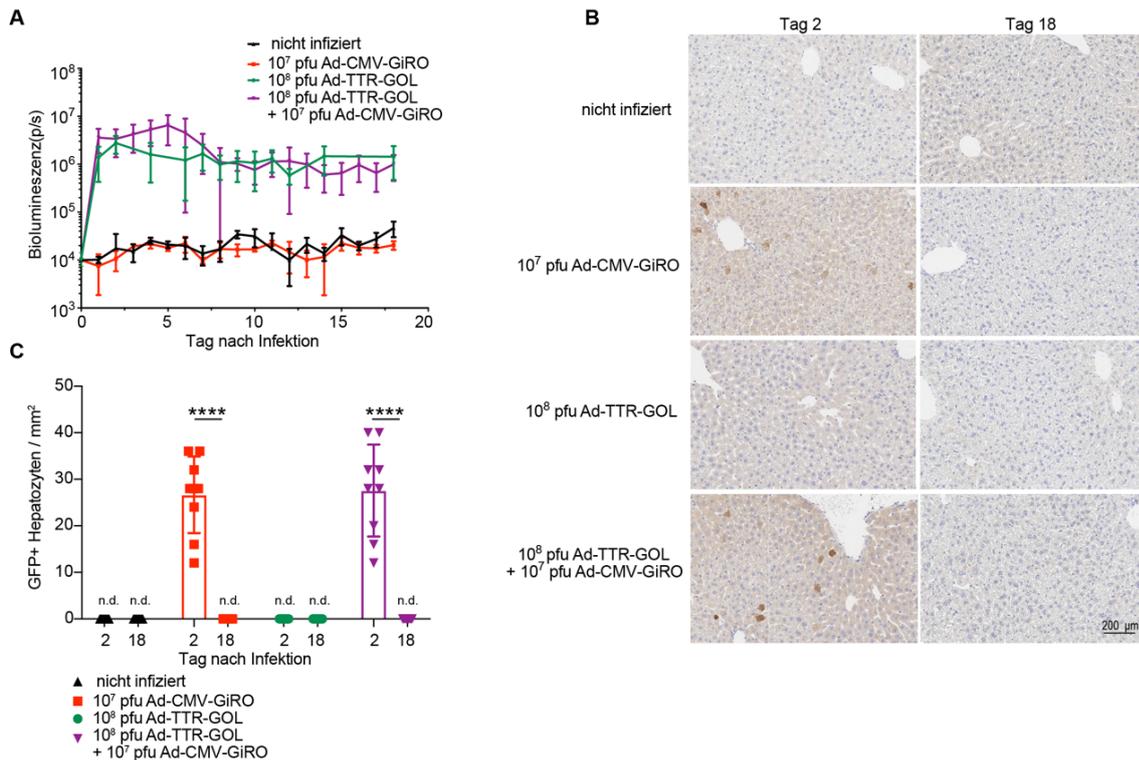


Abb. 12: Einfluss von funktioneller Aktivierung von CD8 T-Zellen auf eine chronischen Ad-TTR-GOL Infektion. (A) Quantifizierung der Biolumineszenz zur Verfolgung der Infektion in Abhängigkeit der Zeit nach Infektion. (B) Immunhistochemische Analyse der eGFP-Expression in der Leber an Tag 2 und 18 nach Infektion. (C) Quantifizierung der eGFP-positiven Hepatozyten aus (C). (A-C) C57BL/6 Mäuse wurden mit 10⁷ pfu Ad-CMV-GiRO (rot), 10⁸ pfu Ad-TTR-GOL (grün) oder 10⁷ pfu Ad-CMV-GiRO + 10⁸ pfu Ad-TTR-GOL (violett) infiziert (n=5). Einen Tag vor Infektion wurden 100 CD45.1 OT-I T-Zellen transferiert. Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Um eine CD8 T-Zell-Antwort während der Ko-Infektion mit Ad-CMV-GiRO / Ad-TTR-GOL nachzuweisen, wurden die endogenen OT-I T-Zellen an Tag 18 nach Infektion in der Leber untersucht (Abb. 13). Nach einer Ko-Infektion mit Ad-CMV-GiRO / Ad-TTR-GOL konnten ähnlich viele Antigen-spezifische CD8 T-Zellen in der Leber quantifiziert werden wie nach einer Einfach-Infektion mit Ad-CMV-GiRO (Abb. 13 A). Darüber hinaus war die Anzahl mit $2-8 \times 10^5$ endogenen OT-I T-Zellen pro Leber vergleichbar mit der Anzahl der 100 adoptiv transferierten CD45.1 OT-I T-Zellen nach einer Ad-CMV-GOL Infektion an Tag 18 (4×10^5 CD45.1 OT-I T-Zellen) (Abb. 8 B). Nach einer Einfach-Infektion mit Ad-TTR-GOL (10⁸ pfu) konnten dagegen keine expandierten endogenen OT-I T-Zellen im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle detektiert werden. Trotz der erfolgreichen Aktivierung und der Expansion, zeigten die endogenen OT-I T-Zellen während Ko-Infektion einen erschöpften Phänotyp (Abb. 13 B). Die Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen ko-exprimierten PD-I mit LAG-3, Tim-3 und CTLA-4 vergleichbar zu einer chronischen Ad-TTR-GOL Infektion. Interessanterweise gab es während der Ko-Infektion eine Sub-Population, die kein PD-I, aber KLRG-1 auf ihrer Oberfläche exprimierte. Diese Effektor-T-Zellen ließen sich sowohl während der Ad-CMV-GiRO (Abb. 13 B) als auch während einer akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion (Abb. 10) finden.

Dieses Experiment zeigte, dass trotz einer effizienten Aktivierung und ausreichender CD8 T-Zell-Expansion eine chronische Ad-TTR-GOL Infektion nicht überwunden werden konnte. Zusätzlich zeigte sich, dass während einer akut selbst-limitierten und chronischen Ko-Infektion (Ad-CMV-GiRO/Ad-TTR-GOL), jeweils eine aktivierte und eine erschöpfte CD8 T-Zell-Population in der Leber ko-existierten. Es war allerdings nicht klar, ob die aktivierte und die erschöpfte CD8 T-Zell-Population bereits früh nach Infektion gleichzeitig gebildet wurde, oder ob sich die erschöpfte CD8 T-Zell-Population nach Eliminierung der akut selbst-limitierten Infektion entwickelte. Damit blieb die Frage ungeklärt, ob die Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen während einer Ko-Infektion ausreichend aktiviert werden konnten.

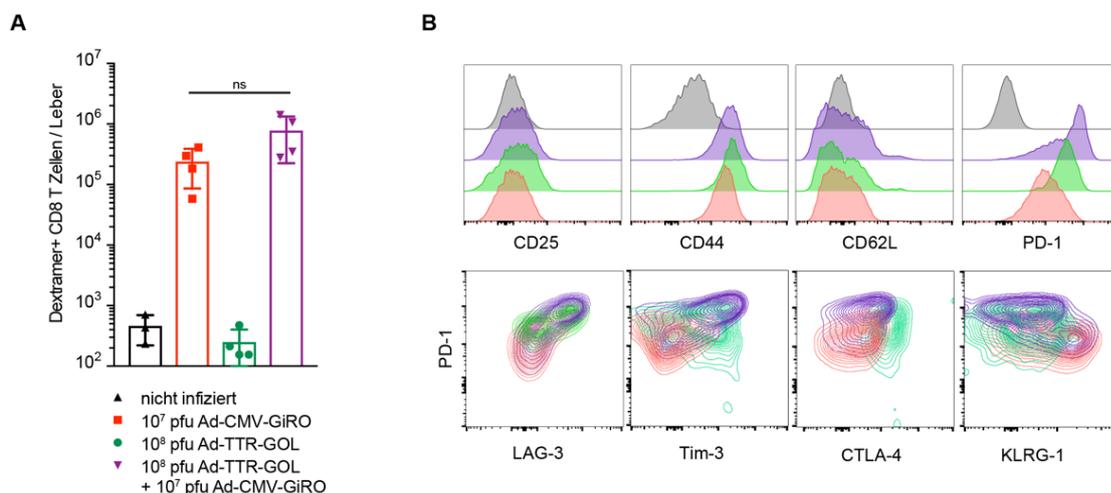


Abb. 13: CD8 T-Zell-Antwort nach funktioneller CD8 T-Zell-Aktivierung während chronischer Ad-TTR-GOL Infektion. (A) Quantifizierung der endogenen Antigen-spezifischen OT-I T-Zellen in der Leber an Tag 18 nach Infektion. (B) Durchflusszytometrische Analyse der endogenen OT-I T-Zellen, isoliert aus der Leber an Tag 18 nach Infektion. (A-B) C57BL/6 Mäuse wurden mit 10^7 pfu Ad-CMV-GiRO (rot), 10^8 pfu Ad-TTR-GOL (grün) oder 10^7 pfu Ad-CMV-GiRO + 10^8 pfu Ad-TTR-GOL (violett) infiziert (n=5). Einen Tag vor Infektion wurden 100 CD45.1 OT-I T-Zellen transferiert. Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Um zu untersuchen, ob eine chronische Ad-TTR-GOL Infektion durch vollständig aktivierte Antigen-spezifische CD8 T-Zellen eliminiert werden kann, wurden zytotoxische CD8 T-Zellen (*engl.* cytotoxic T lymphocytes, CTLs) *in vitro* generiert. C57BL/6 Mäuse wurden mit Ad-TTR-GOL (10^9 pfu) infiziert und somit eine chronische Infektion etabliert. 31 Tage nach Infektion wurden 10^7 Ovalbumin-spezifische CTLs adoptiv transferiert (Abb. 14). Die Infektion wurde mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung verfolgt. Trotz Transfer vollständig aktivierter Antigen-spezifischer CD8 T-Zellen konnte die chronische Ad-TTR-GOL Infektion nicht eliminiert werden vergleichbar mit der Ad-TTR-GOL infizierten Kontrolle ohne CTL-Transfer. Die Funktionalität der transferierten CTLs wurde überprüft. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit 10^7 pfu Ad-CMV-GOL infiziert und am darauffolgenden Tag, bevor die endogene Immunantwort einsetzt, 10^6 Ovalbumin-spezifische CTLs transferiert. Mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung konnte gezeigt werden, dass nach Transfer von CTLs die

Ad-CMV-GOL Infektion eliminiert werden konnte, im Gegensatz zur Ad-CMV-GOL infizierten Kontrolle ohne CTLs Transfer.

Damit zeigte sich, dass eine mögliche dysfunktionale CD8 T-Zell-Antwort nicht alleine für die Persistenz einer adenoviralen Infektion mit Hepatozyten-spezifischer Antigenexpression verantwortlich ist, sondern weitere Mechanismen eine Rolle spielen.

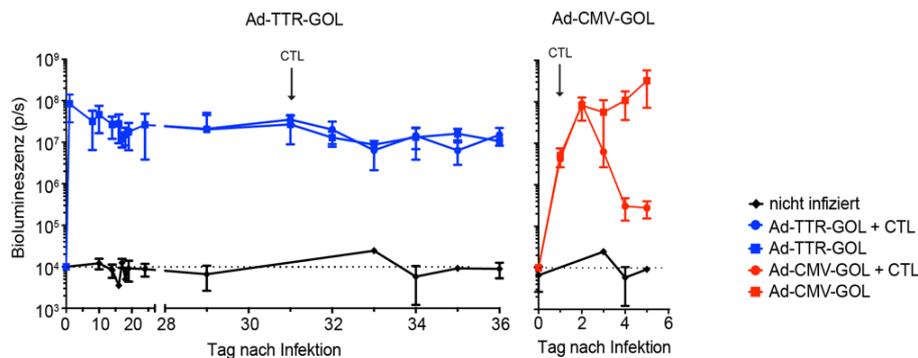


Abb. 14: Einfluss zytotoxischer CD8 T-Zellen auf eine chronische Ad-TTR-GOL Infektion. Quantifizierung der Biolumineszenz in der Leber nach einer 10⁹ pfu Ad-TTR-GOL (blau) bzw. 10⁷ pfu Ad-CMV-GOL (rot) Infektion (n=5). An angegebenen Zeitpunkten wurden 10⁷ *in vitro* aktivierte Ovalbumin-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) adoptiv transferiert. Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

Da die eingeschränkte CD8 T-Zell-Aktivierung nicht allein für die Persistenz einer Ad-TTR-GOL Infektion verantwortlich war, stellte sich die Frage, ob die Zielzellen, die infizierten Hepatozyten, einer erfolgreichen Eliminierung des Virus indirekt entgingen. Unter dem TTR-Promoter wird auf Einzelzellebene 100-fach weniger Antigen exprimiert als unter dem CMV-Promoter. Deshalb entwickelte sich die Hypothese, dass nach einer Ad-TTR-GOL Infektion auch weniger Peptid auf der Oberfläche einzelner infizierter Hepatozyten präsentiert werden konnte im Vergleich zu einer Ad-CMV-GOL Infektion. Diese Peptid-Menge, präsentiert auf H2-Kb MHC-I Molekülen könnte nicht ausreichend sein, um von anti-viralen CD8 T-Zellen erkannt zu werden oder eine Effektorfunktion auslösen zu können. Um dies zu prüfen, wurden primäre murine Hepatozyten aus C57BL/6 Mäusen kultiviert und mit Ad-TTR-GOL bzw. Ad-CMV-GOL infiziert. 2 Tage nach Infektion wurden die primären murinen Hepatozyten mit *in vitro* aktivierten Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen ko-kultiviert und die Effektorfunktion gegen infizierte Hepatozyten mittels Impedanz-basiertem *xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) System, ACEA Biosciences, Inc.* in Abhängigkeit der Zeit verfolgt (Abb. 15). Ähnlich zu den *in vivo* Daten (Abb. 14) zeigte sich, dass die CTLs Ad-CMV-GOL infizierte primäre murine Hepatozyten lysierten. Im Gegensatz dazu wurden lediglich 40 % der Ad-TTR-GOL infizierten primären murinen Hepatozyten eliminiert, im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle. Um die geringe intrazelluläre Antigenbeladung zu steigern, wurden die infizierten Hepatozyten zusätzlich mit Ovalbumin-entstammenden Peptid Ova257-264 (SIINFEKL) beladen. Dabei zeigte sich, dass Ad-TTR-GOL / SIINFEKL-beladene und Ad-CMV-GOL /

SIINFEKL-beladene Hepatozyten ähnlich gut von den CTLs eliminiert wurden wie Ad-CMV-GOL infizierte Hepatozyten ohne zusätzliche Peptid-Beladung (Abb. 15).

Mit diesem Experiment konnte schließlich belegt werden, dass zusätzlich zu einer erschöpften CD8 T-Zell-Antwort, die infizierten Hepatozyten indirekt einer Immunantwort entkommen durch geringe Peptid-Präsentation auf MHC-I Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen.

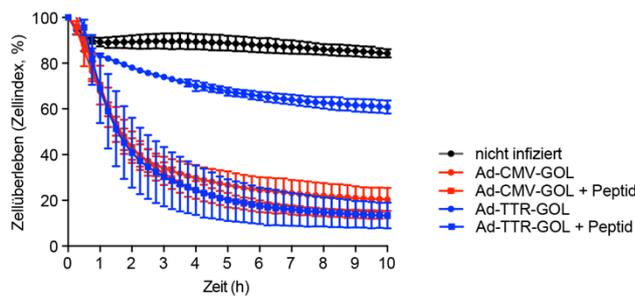


Abb. 15: Eliminierung von primären murinen Hepatozyten nach adenoviraler Infektion und Antigenbeladung. Zytotoxizitätsassay von primären murinen Hepatozyten und *in vitro* aktivierten Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen (Verhältnis 1:10). Die Hepatozyten wurden mit MOI = 5 mit Ad-CMV-GOL (rot) oder Ad-TTR-GOL (blau) infiziert. Die Hepatozyten wurden mit 200 nM Ova257-264 Peptid beladen. Die CD8 T-Zell-Zytotoxizität wurde mittels *xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) Systems, ACEA Biosciences, Inc.* indirekt verfolgt. Experiment durchgeführt gemeinsam mit Annika Schneider. Abbildung modifiziert aus Manske *et al.*, Hepatology, 2018.

4.5 Transfer von HBV-Genomen in murine Hepatozyten mittels adenoviraler Infektion

In den vorherigen Kapiteln wurde untersucht, welche Ursachen für eine chronische Leberinfektion verantwortlich sind, bei der Antigene unter einem Hepatozyten-spezifischen TTR-Promoter exprimiert werden. Das vorherige Mausmodell stellte ein artifizielles Infektionsmodell der Leber dar. Dabei fungierte das replikations-defiziente und vom Immunsystem nicht erkennbare Adenovirus Serotyp 5 aufgrund der deletierten E1 und E3 Regionen lediglich als Shuttle-System von Transgenen. In diesem System diente das Ovalbumin als immunstimulatorisches Antigen, das trotz seiner starken Immunogenität nach einer Hepatozyten-spezifischen Expression persistierte. Das vorherige Modellsystem zeigte bereits mögliche Mechanismen auf, welche zu einer chronischen viralen Leberinfektion führen können. Diese Ergebnisse sollten nachfolgend auf das HBV übertragen werden.

Das humane HBV wurde als streng Spezies-spezifisch beschrieben und infiziert gezielt Hepatozyten [165, 166]. Dadurch ist es nicht möglich, murine Hepatozyten mit dem HBV direkt zu infizieren. Um jedoch das HBV-Genom in Maus-Hepatozyten einzubringen, das dort replizieren kann, wurde das adenovirale Shuttle-System verwendet. Hierfür wurde ein System verwendet, in dem das HBV1.3 Überlängengenom in einen adenoviralen Vektor kloniert ist, welcher die HBV-Sequenzen in Hepatozyten einbringt [160]. Dabei kodiert das HBV1.3 Genom in überlappenden Leserastern, kloniert in ein pEntr-Plasmid, für das HBx Protein, HBcore Protein, HBs Protein, Polymerase, ein zweites HBx Protein und ein zweites unvollständiges HBcore Protein (Abb. 16 A). Zur Herstellung des Adenovirus wurde das pEntr-HBV1.3 in den viralen pDest-Vektor rekombiniert und das Virus Ad-HBV1.3 in HEK293-Zellen produziert. Nach Infektion mit Ad-HBV1.3 kann das Virus *in vivo* anhand von HBeAg oder HBsAg im Blut nachgewiesen werden.

Um den Infektionsverlauf in der Maus besser verfolgen zu können, wurde ein weiteres Konstrukt generiert, in dem im pEntr-Plamid an das HBV1.3 Überlängengenom hinter das zweite anfängliche HBcore Protein eine Luziferase-Sequenz kloniert wurde (Abb. 16 B). Dadurch wurde gewährleistet, dass die Luziferase unter dem HBcore Promoter exprimiert wird. Da die Sequenzen für die Luziferase und das zweite unvollständige HBcore Protein durch einen T2A-Linker getrennt wurden, ist anzunehmen, dass die Luziferase und das HBcore Protein äquimolar exprimiert werden.

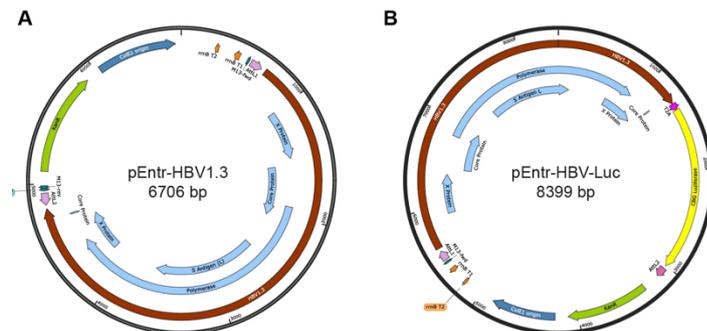


Abb. 16: Plasmidkarten von (A) pEntr-HBV1.3 und (B) pEntr-HBV-Luc. (A) Das pEntr-Plasmid kodiert für die Sequenz des HBV1.3 Überlängengenoms. (B) Im pEntr-HBV-Luc wurde an das HBV1.3 Überlängengenom mithilfe der T2A-Sequenz eine Luziferase-Sequenz an das zweite unvollständige HBcore Protein gekoppelt.

4.6 Quantität der HBV-spezifischen Antigene bestimmt den Infektionsverlauf

Hohe Antigenlast ist mit erschöpfter CD8 T-Zell-Antwort und chronischer HBV Infektion assoziiert [73, 167]. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Infektionsdosis auf die Eliminierung des hier generierten Ad-HBV-Luc hat, wurden C57BL/6 Mäuse mit aufsteigenden Dosen von 10^5 pfu bis 10^9 pfu Ad-HBV-Luc intravenös infiziert (Abb. 17). Die Viruseliminierung wurde nachfolgend mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung (Abb. 17 A) und anhand von HBeAg-Level im Blut (Abb. 17 B) verfolgt. Es zeigte sich, dass die einzige Infektionsdosis, die eliminiert werden konnte, 10^7 pfu Ad-HBV-Luc war. Dabei wurde das Virus zwischen Tag 15 und Tag 21 eliminiert. Es konnte dieselbe Eliminierungskinetik gezeigt werden, gemessen am HBeAg-Level im Blut, als auch an der Biolumineszenz in der Leber. Trotz limitierter Anzahl an Blutentnahmen am selben Tier für die HBeAg-Bestimmung, schien die Expression des HBcore Proteins mit der Expression der Luziferase zu korrelieren. Damit eignete sich die Biolumineszenz-Bildgebung zur Messung der Infektion und machte eine engmaschige und zuverlässige Detektion der Virus-Eliminierung möglich.

Im Gegensatz dazu konnten alle anderen Infektionsdosen darunter ($10^5 / 10^6$ pfu) und darüber ($10^8 / 10^9$ pfu) nicht eliminiert werden und persistierten über einen Zeitraum von mindestens 60 Tagen (Abb. 17 A, B). Während 10^5 pfu Ad-HBV-Luc mittels HBeAg-Bestimmung nicht mehr detektiert werden konnten, war diese Infektionsdosis mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung noch über dem Hintergrundsignal messbar. Für eine noch sensitivere Biolumineszenz-Bildgebung erfordert es jedoch eine noch sensitivere als die hier verwendete *Click-Beetle-Green*-Luziferase. Die Auftragung der Biolumineszenz in Abhängigkeit der Infektionsdosis an

Tag 2 nach Infektion zeigte eine positive Korrelation der beiden Parameter, wodurch sich die Biolumineszenz zur Quantifizierung der viralen Infektion *in vivo* eignete und auf Blutentnahmen zur HBeAg-Bestimmung verzichtet werden konnte (Abb. 17 C).

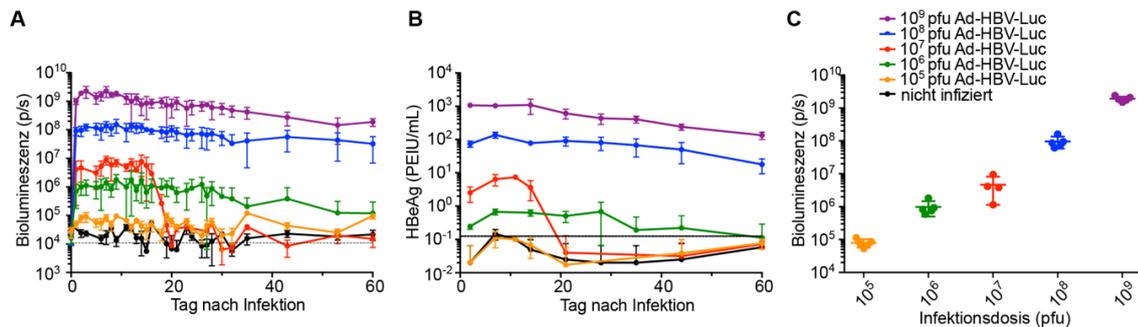


Abb. 17: Eliminierung des Ad-HBV-Luc in Abhängigkeit der Infektionsdosis. (A) Quantifizierung der Biolumineszenz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit den angegebenen Dosen des Ad-HBV-Luc (n=5). (B) Quantifizierung des HBeAg im Blut nach Infektion wie in (A) zu angegebenen Zeitpunkten (n=5). (C) Korrelation zwischen Biolumineszenz und Infektionsdosis an Tag 2 nach Infektion mit Ad-HBV-Luc.

Um den Einfluss von Antigenlast auf die Immunantwort zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit 10^7 pfu oder 10^8 pfu Ad-HBV-Luc infiziert und der Infektionsverlauf mithilfe der Biolumineszenz verfolgt (Abb. 18 A). Während der chronischen Infektion mit 10^8 pfu Ad-HBV-Luc zeigten sich rasch nach Infektion ein basaler Leberschaden, gemessen am ALT-Level im Blut um die 90 U/l (Abb. 18 B). Während der akut selbst-limitierten Infektion mit 10^7 pfu Ad-HBV-Luc stiegen die ALT-Werte dagegen während der Eliminierung des Virus auf 135 U/l an Tag 14 an und kehrten danach in den Normalbereich von 40 U/l zurück. Somit war der dauerhafte ALT-Anstieg während der chronischen Infektion mit der erhöhten Antigenlast und während der akut selbst-limitierten Infektion mit dem Zugrundegehen von infizierten Hepatozyten im Zusammenhang der Viruseliminierung assoziiert.

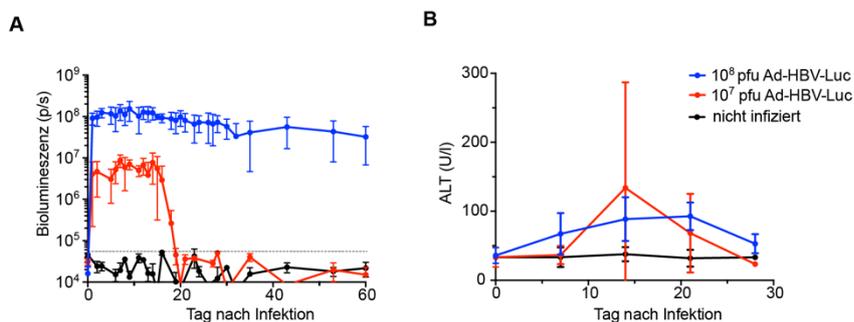


Abb. 18: Gegenüberstellung einer akut selbst-limitierten und chronischen Ad-HBV-Luc Infektion. (A) Quantifizierung der Biolumineszenz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 10^7 pfu (rot) oder 10^8 pfu (blau) Ad-HBV-Luc (n=5). (B) Leberschaden gemessen anhand von ALT im Blut nach Infektion wie in (A) (n=5).

4.7 Adaptive Immunantwort gegen Ad-HBV-Luc

Es wurde beschrieben, dass eine HBV Infektion durch das adaptive Immunsystem, hauptsächlich durch die CD8 T-Zell-Antwort eliminiert wird [46, 168, 169]. Um zu untersuchen, welche Immunzellen im Ad-HBV-Luc System eine Rolle spielen, wurden C57BL/6 Mäuse mit der akut selbst-limitierten Dosis von 10^7 pfu Ad-HBV-Luc infiziert und jeweils CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen oder NK1.1 Zellen depletiert (Abb. 19). Der Infektionsverlauf wurde anhand der Biolumineszenz verfolgt und mit 10^7 pfu Ad-HBV-Luc infizierten immunkompetenten Mäusen verglichen. Es zeigte sich, dass alle drei untersuchten Zellpopulationen während der Eliminierung der Ad-HBV-Luc Infektion in der Maus beteiligt waren. Während NK1.1 Zellen im Rahmen des innate Immunsystems das Virus inhibieren können, so können sie ähnlich den CD4 T-Zellen als Helfer-Zellen dienen, um CD8 T-Zellen zu aktivieren [169-171]. Während ein Teil der Mäuse die Ad-HBV-Luc Infektion (10^7 pfu) ohne die Hilfe von NK1.1 Zellen eliminieren konnte, war die CD4-T-Zell-Hilfe als auch die CD8 T-Zell-Antwort für das Ausheilen der Infektion absolut notwendig. Da jedoch CD8 T-Zellen dafür verantwortlich sind, infizierte Hepatozyten direkt zu eliminieren, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die CD8 T-Zell-Antwort gegen das HBV näher untersucht.

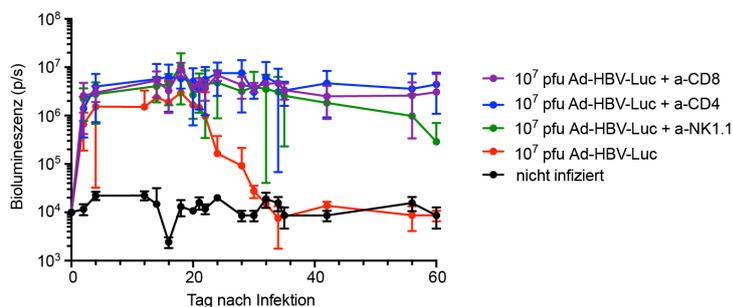
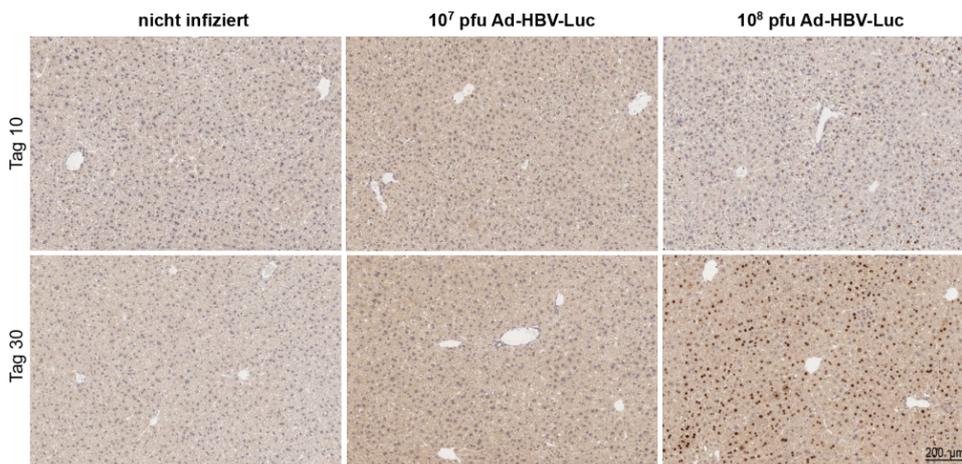


Abb. 19: Rolle der CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und NK1.1 Zellen während Eliminierung einer akut selbst-limitierten Ad-HBV-Luc Infektion. Quantifizierung der Biolumineszenz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 10^7 pfu Ad-HBV-Luc und Depletion von CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen oder NK1.1 Zellen (n=5). Die Depletion erfolgte mit 30 μ g anti-Maus CD8 α (Klon 2.43), 300 μ g anti-Maus CD4 (Klon GK1.5) oder 300 μ g anti-Maus NK1.1 (Klon PK136).

CD8 T-Zellen sind für die Eliminierung HBV infizierter Hepatozyten verantwortlich [46, 172]. Um die Infektion auf Einzelzellebene nachzuweisen, wurden C57BL/6 Mäuse mit der akut selbst-limitierten (10^7 pfu) oder chronischen (10^8 pfu) Dosis des Ad-HBV-Luc infiziert und die Leber an Tagen 10 und 30 nach Infektion immunhistochemisch auf die Expression des viralen HBcore Proteins untersucht (Abb. 20). 10 Tage nach Infektion, bevor die adaptive Immunantwort einsetzt, waren sowohl in den Lebern von akut selbst-limitierten als auch von chronisch infizierten Mäusen HBcore-positive Hepatozyten detektierbar (Abb. 20 A). Während bei akut selbst-limitiert infizierten Tieren 35 infizierte Hepatozyten pro mm^2 Leber positiv für HBcore Protein waren, waren es bei chronisch infizierten Tieren 215 HBcore-positive Hepatozyten pro mm^2 Leber (Abb. 20 B). Durch die mögliche Mehrfach-Infektion pro Hepatozyt

mit der höheren Dosis von 10^8 pfu Ad-HBV-Luc war die Färbung der HBcore-positiven Hepatozyten deutlich stärker als nach einer Infektion mit 10^7 pfu Ad-HBV-Luc (Abb. 20 A). Durch die Akkumulation der Gen-Expression und Virus-Persistenz verstärkte sich die Färbung der HBcore-positiven Hepatozyten nach der chronischen Infektion (10^8 pfu) nochmals von Tag 10 auf Tag 30. Im Gegensatz dazu wurden an Tag 30 die Virus-infizierten Hepatozyten nach einer Infektion mit 10^7 pfu Ad-HBV-Luc eliminiert und die Leberproben waren vergleichbar zu der nicht infizierten Kontrolle (Abb. 20 A). Dabei sank die Anzahl der infizierten Hepatozyten nach Eliminierung der akut selbst-limitierten Dosis auf 0 HBcore-positive Hepatozyten pro mm^2 Leber, während nach der chronischen Infektion und Akkumulation der Genexpression über die Zeit 316 HBcore-positive Hepatozyten pro mm^2 Leber detektierbar waren (Abb. 20 B). Diese Analyse auf Einzelzellebene spiegelt die Ergebnisse der sensitiveren, aber pro Organ gemessenen Biolumineszenz wider (Abb. 18 A).

A



B

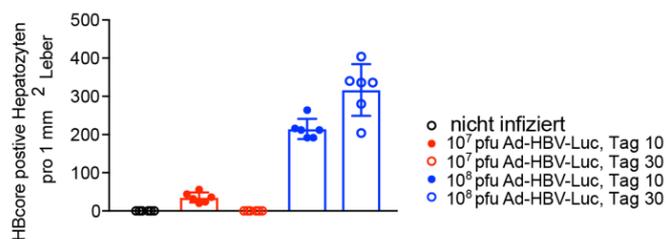


Abb. 20: Immunhistochemische Analyse der Leber nach einer akut selbst-limitierten vs. chronischen Ad-HBV-Luc Infektion. (A) Immunhistochemische Analyse der HBcore Protein Expression in der Leber an Tag 10 und 30 nach Infektion mit 10^7 pfu oder 10^8 pfu Ad-HBV-Luc. (B) Quantifizierung der HBcore-positiven Hepatozyten aus (A) (n=5).

Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Infektion mit 10^7 pfu Ad-HBV-Luc das Virus eliminiert werden konnte, während es nach Infektion mit der höheren Dosis von 10^8 pfu persistierte. Dabei stellte sich die Frage, ob die persistente Infektion auf einen erschöpften CD8 T-Zell-Zustand zurückgeführt werden kann und ob überhaupt eine anti-virale CD8 T-Zell-Antwort gebildet werden konnte. Um die anti-virale CD8 T-Zell-Antwort zu quantifizieren,

wurden C57BL/6 Mäuse mit jeweils 10^7 pfu oder 10^8 pfu Ad-HBV-Luc infiziert und die Antigen-spezifischen Cor93 T-Zellen, CD8 T-Zellen die das HBcore Protein assoziierte Peptid HBcore93-100 (MGLKFRQL) auf infizierten Hepatozyten erkennen, durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 21 A). Dabei expandierten die Cor93 T-Zellen während der akut selbst-limitierten Infektion (10^7 pfu) von Tag 10 auf Tag 15 auf bis zu 20.000 Cor93 T-Zellen pro Leber, übereinstimmend mit dem Zeitpunkt, an dem die Viruseliminierung beginnt (Abb. 18). Nachdem das Virus (10^7 pfu Ad-HBV-Luc) erfolgreich eliminiert wurde, kontrahierten die Cor93 T-Zellen wieder und zeigten somit eine typische Kinetik einer akut selbst-limitierten Infektion. Im Gegensatz dazu waren nach einer chronischen Ad-HBV-Luc Infektion (10^8 pfu) die meisten Cor93 T-Zellen, mit 3.000 Cor93 T-Zellen pro Leber, an Tag 10 detektierbar (Abb. 21 A). Trotz früh expandierter Antigen-spezifischer Cor93 T-Zellen, konnte die Infektion mit 10^8 pfu Ad-HBV-Luc nicht eliminiert werden (Abb. 18) und die Cor93 T-Zellen kontrahierten teilweise wieder an Tag 15 und 30 (Abb. 21 A).

4.8 Einfluss der Antigenmenge auf die HBV-spezifische CD8 T-Zell-Antwort

Um zu charakterisieren, warum die früh expandierten Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen das Ad-HBV-Luc (10^8 pfu) trotz erfolgreicher Aktivierung nicht eliminieren konnten, wurden die Cor93 T-Zellen phänotypisch untersucht (Abb. 21 B-D). Dabei zeigte die durchflusszytometrische Analyse der Leber-assoziierten Lymphozyten nach Infektion mit der chronischen Dosis des Ad-HBV-Luc (10^8 pfu), dass die Cor93 T-Zellen zwar früh nach Infektion an Tag 10 einen leicht zytotoxischen Phänotyp aufwiesen, gemessen an der Granzym B Expression, die Cor93 T-Zellen jedoch auch die Marker PD-I, TIGIT (T-Zell-Immunezeptor mit Ig und ITIM Domänen) und TOX exprimierten (Abb. 21 B). TIGIT, exprimiert auf CD8 T-Zellen, kann durch Interaktion mit dem Liganden CD155 die Ko-Stimulation via CD226 auf den CD8 T-Zellen verhindern und somit ihre Aktivierung negativ regulieren [173, 174]. TOX stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der unter anderem die Expression von PD-I reguliert [53]. Während akuter viraler Infektionen wird TOX transient exprimiert [51]. Während chronischer viraler Infektionen wie mit LCMV und HCV wurde TOX hingegen beschrieben, für die Entwicklung und Erhaltung der erschöpften T-Zell-Population erforderlich zu sein [51]. Da die Expression von PD-I, TIGIT und TOX im weiteren Verlauf der Infektion (Tag 15 und Tag 30) weiter anstieg, zeigten die Cor93 T-Zellen während der chronischen Infektion (10^8 pfu) einen zunehmend erschöpften Phänotyp auf (Abb. 21 C, D). Im Gegensatz dazu exprimierten Cor93 T-Zellen, isoliert aus den Lebern von akut selbst-limitiert infizierten Mäusen (10^7 pfu) zum Teil zum frühen Zeitpunkt (Tag 10) und hauptsächlich zum Zeitpunkt der Viruseliminierung (Tag 15) PD-I, TIGIT und TOX und deuteten damit auf die Aktivierung der Cor93 T-Zellen hin (Abb. 21 B). An Tag 15 exprimierten Cor93 T-Zellen aus akut selbst-limitiert infizierten Mäusen KLRG1 und Granzym B signifikant mehr als in chronisch infizierten Mäusen und zeigten

dadurch einen zytotoxischen CD8 T-Zell-Phänotyp (Abb. 21 C), der mit dem Zeitpunkt der Viruseliminierung korrelierte (Abb. 18).

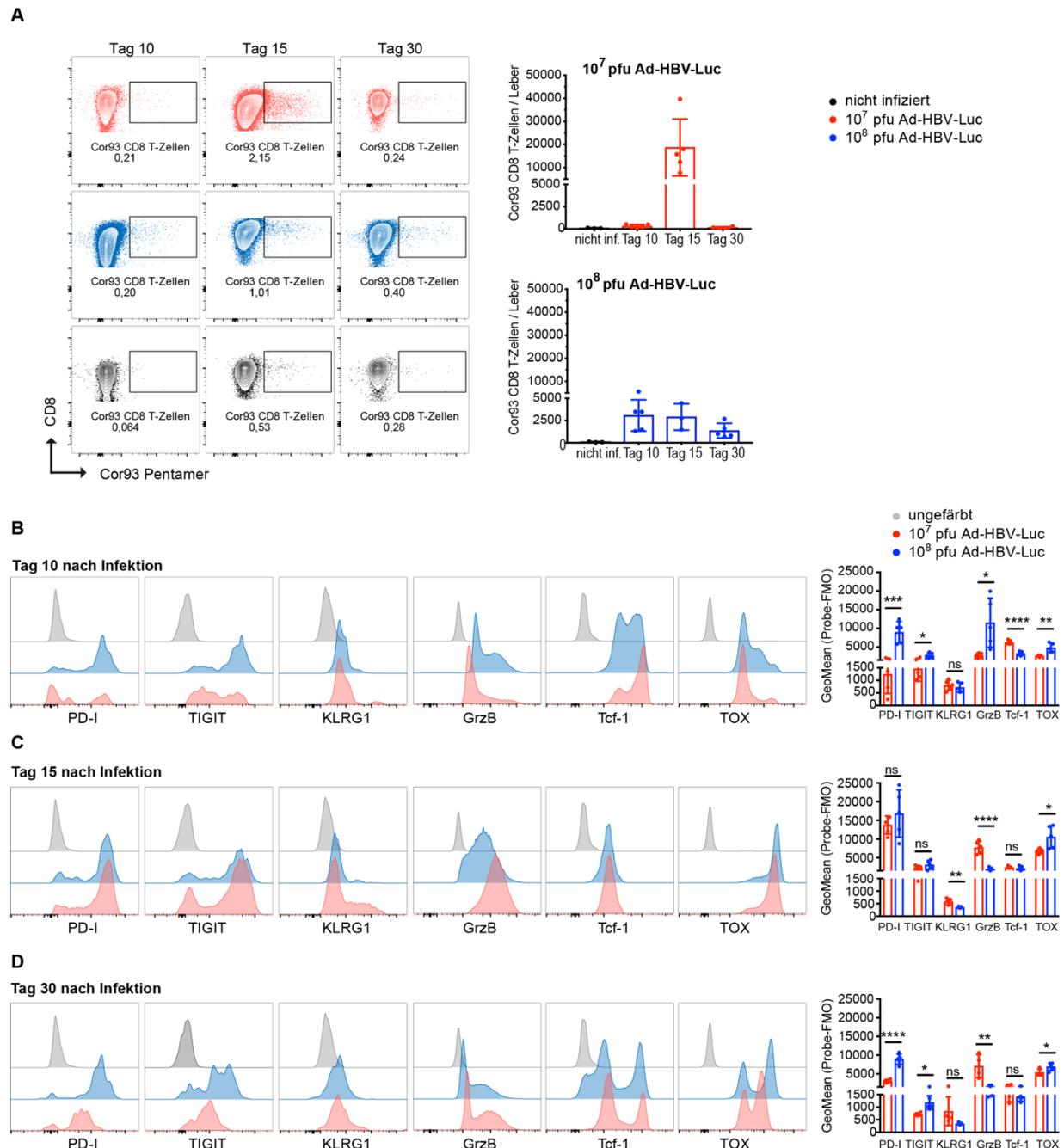


Abb. 21: Quantifizierung und Phänotypisierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zell-Antwort gegen eine Ad-HBV-Luc Infektion. (A) Durchflusszytometrische absolute Quantifizierung der Cor93 T-Zellen pro Leber an Tag 10, 15 und 30 nach Infektion mit 10^7 pfu (rot) oder 10^8 pfu (blau) Ad-HBV-Luc ($n=5$). Es sind beispielhafte Plots für Ko-Expression von CD8 und Cor93 T-Zell-Rezeptor auf lebenden CD8 T-Zellen gezeigt. (B-D) Phänotypische Analyse der Cor93 T-Zellen aus (A) an Tag 10 (B), Tag 15 (C) und Tag 30 (D) nach Infektion. (B-D) Durchflusszytometrische Analyse und Quantifizierung von lebenden Cor93 CD8 T-Zellen auf Expression von PD-I, TIGIT, KLRG1 bzw. von lebenden CD8 T-Zellen auf Expression von Granzym B (GrzB), Tcf-1 und TOX ($n=5$). Jedes Histogramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis. Als Negativkontrolle dient eine ungefärbte Probe des jeweiligen Markers (grau).

Nach Reduktion der Viruslast und T-Zell-Kontraktion nach einer akut selbst-limitierten Ad-HBV-Luc Infektion (10^7 pfu) regulierten die CD8 T-Zellen PD-I, TIGIT, KLRG1, Granzym B und TOX wieder herunter (Abb. 21 D). Cor93 T-Zellen bzw. Leber-assoziierte CD8 T-Zellen nach

einer chronischen Ad-HBV-Luc Infektion (10^8 pfu) exprimierten hingegen weiterhin die Erschöpfungsmarker PD-I, TIGIT und TOX zum späten Zeitpunkt (Tag 30) (Abb. 21 D). Des Weiteren regulierten CD8 T-Zellen während einer chronischen Ad-HBV-Luc Infektion (10^8 pfu) zunehmend den Transkriptionsfaktor Tcf-1 runter, dessen Abnahme mit einer geringen Plastizität assoziiert ist [175] (Abb. 21 B-D, Abb. 22 A). Interessanterweise exprimierten Leber-assoziierte CD8 T-Zellen zum frühen Zeitpunkt (Tag 10) der chronischen Ad-HBV-Luc Infektion (10^8 pfu) mehr Granzym B als während der akut selbst-limitierten Ad-HBV-Luc Infektion (10^7 pfu) und deuteten damit auf eine frühzeitige T-Zell-Aktivierung hin, die jedoch nicht ausreichte, um das Virus zu eliminieren (Abb. 21 B).

Im Vergleich der Leber-assoziierten CD8 T-Zellantwort während einer akut selbst-limitierten und einer chronischen Ad-HBV-Luc Infektion (10^7 pfu vs. 10^8 pfu) ergaben sich 5 verschiedene Zell-Populationen, die durch Expression der beiden Transkriptionsfaktoren Tcf-1 und TOX bestimmt wurden (Abb. 22 A). Die Populationen konnten zusammengefasst werden als: (P1) Tcf-1^{hi} TOX^{low}, (P2) Tcf-1^{hi} TOX^{hi}, (P3) Tcf-1^{dim} TOX^{low}, (P4) Tcf-1^{dim} TOX^{hi} und (P5) Tcf-1^{neg} TOX^{hi} (Abb. 22 A). Die (P1) wurde in der Literatur als Ausgangspopulation beschrieben, die den höchsten Grad an Plastizität aufweist, aus der sich Effektorzellen, Gedächtniszellen und erschöpfte Zellen entwickeln können [176]. So war die (P1) negativ für die Marker PD-I und Granzym B (Abb. 22 B). (P3) weist aufgrund der Expression von Granzym B, aber der fehlenden PD-I Expression, einen Effektor-ähnlichen [177, 178] bzw. Gedächtnis-ähnlichen [176, 178] Phänotyp auf, während (P4) durch Expression von PD-I und Granzym B als terminale Effektorzellen fungieren [178] (Abb. 22 B). Terminal erschöpfte T-Zellen (P5) bildet sich an Tag 30 nach chronischer Ad-HBV-Luc Infektion aus (10^8 pfu) und zeichneten sich durch Fehlen des Transkriptionsfaktors Tcf-1, aber Expression von PD-I, Granzym B und TOX aus [41, 179, 180] (Abb. 22 B). Die (P2) könnte durch gleichzeitige Expression von TCF-1^{hi} TOX^{hi} und PD-I als eine Stammzell-ähnliche Population dienen, aus der sich der erschöpfte Pool an T-Zellen während der chronischen Infektion erneuert [52, 176, 181, 182] (Abb. 22 B).

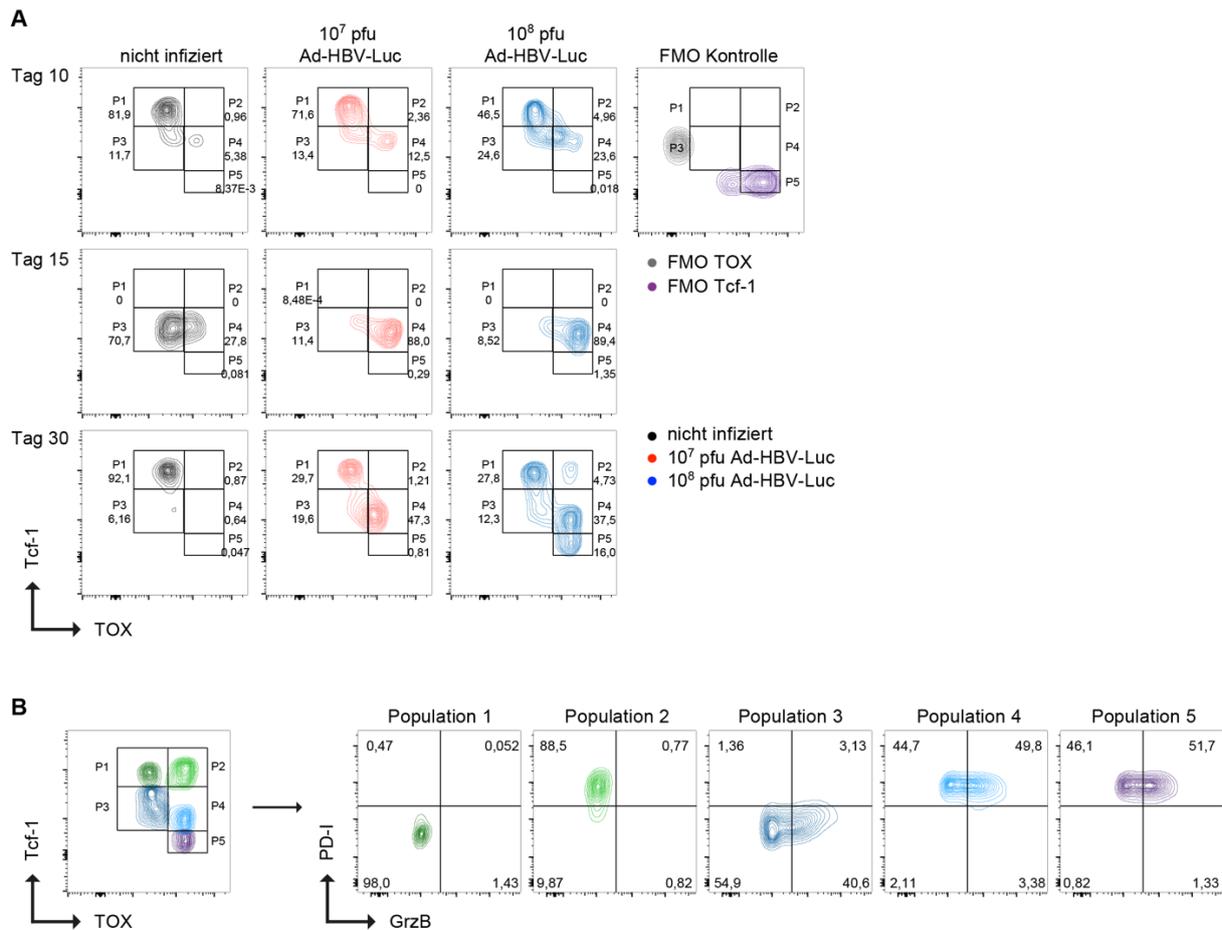


Abb. 22: Korrelation der Transkriptionsfaktoren Tcf-1 und TOX und der Expression von PD-I und Granzym B. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Ko-Expression von Tcf-1 und TOX in lebenden Leber-assoziierten CD8 T-Zellen an Tag 10, 15 und 30 nach Infektion mit 10^7 pfu (rot) oder 10^8 pfu (blau) Ad-HBV-Luc bzw. in nicht infizierten (schwarz) C57Bl5/J Mäusen. Es sind beispielhafte Plots von $n=5$ gezeigt. (B) Durchflusszytometrische Analyse der Ko-Expression von PD-I und Granzym B in Tcf-1 und TOX exprimierenden Leber-assoziierten CD8 T-Zellen, unterteilt in Population 1-5, beispielhaft an Tag 30 nach Infektion mit 10^8 pfu Ad-HBV-Luc.

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen während einer chronischen Ad-HBV-Luc Infektion (10^8 pfu) im Vergleich zu einer akut selbst-limitierten Infektion (10^7 pfu Ad-HBV-Luc) schwächer expandieren, eine veränderte Expansionskinetik aufweisen und sich durch einen erschöpften CD8 T-Zell-Phänotyp charakterisieren lassen (Abb. 21 A-D, Abb. 22 A-B). Die Funktionalität bzw. Zytotoxizität dieser Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen wurde jedoch noch nicht untersucht, um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, ob die chronische Ad-HBV-Luc Infektion nicht eliminiert werden kann, weil die Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nicht funktionell sind. Um die Funktionalität der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit 10^7 pfu bzw. 10^8 pfu Ad-HBV-Luc infiziert und an Tag 15 nach Infektion, wenn die Immunantwort gegen die akut selbst-limitierte Infektion einsetzt (Abb. 21), die Leber-assoziierten CD8 T-Zellen isoliert und *ex vivo* funktionell untersucht. Hierfür wurden die Leber-assoziierten CD8 T-Zellen mit Ad-HBV1.3 infizierten primären murinen Hepatozyten, ebenfalls aus C57BL/6 Mäusen, ko-kultiviert und die Zytotoxizität indirekt anhand der Hepatozyten-Lyse mithilfe des

Impedanz-basierten *xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) Systems, ACEA Biosciences, Inc.* bestimmt (Abb. 23). Zwar wurden alle Leber-assoziierten CD8 T-Zellen nach der Infektion isoliert und funktionell untersucht, und nicht nur Antigen-spezifische T-Zellen, so wurde jedoch eine Luziferase-gerichtete Immunantwort ausgeschlossen indem die primären murinen Hepatozyten mit Ad-HBV1.3 infiziert wurden, das keine Luziferase kodiert. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Assay eine HBV-spezifische CD8 T-Zell-Zytotoxizität bestimmt wurde, auch wenn diese nicht ausschließlich gegen das HBcore Protein (HBcore93-100) gerichtet war. Einhergehend mit der vorherigen Charakterisierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen zeigte sich, dass CD8 T-Zellen, isoliert aus der Leber nach einer akut selbst-limitierten Ad-HBV-Luc Infektion (10^7 pfu), erfolgreich Ad-HBV1.3 infizierte primäre Hepatozyten *ex vivo* eliminieren konnten. Somit wurden 80 % der Hepatozyten durch CD8 T-Zellen, isoliert nach einer akut selbst-limitierten Infektion (10^7 pfu Ad-HBV-Luc), eliminiert im Vergleich zur nicht infizierten Hepatozyten-Kontrolle (Abb. 23). Im Gegensatz dazu konnten jedoch nur 30 % der Hepatozyten durch CD8 T-Zellen eliminiert werden, die nach einer chronischen Infektion (10^8 pfu Ad-HBV-Luc) isoliert wurden. Damit zeigte sich, dass die Infektion mit 10^8 pfu Ad-HBV-Luc durch ihre hohe Antigenlast einen erschöpften und nicht funktionellen CD8 T-Zell-Zustand generierte, wodurch das Virus nicht eliminiert werden konnte und persistierte.

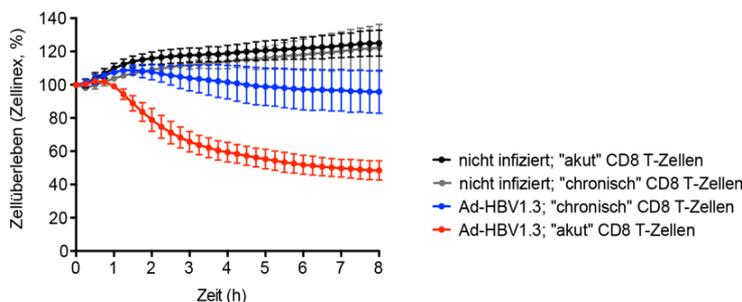


Abb. 23: Zytotoxizität von Leber-assoziierten CD8 T-Zellen nach einer Ad-HBV-Luc Infektion.

Zytotoxizitätsassay von primären murinen Hepatozyten und CD8 T-Zellen, isoliert aus den Lebern von 10^7 pfu (rot) oder 10^8 pfu (blau) Ad-HBV-Luc infizierten C57BL/6 Mäusen. Die Hepatozyten wurden aus einer nicht infizierten Leber einer C57BL/6 Maus isoliert, kultiviert und mit einer MOI=5 Ad-HBV1.3 infiziert. 2 Tage nach Infektion wurden die primären murinen

Hepatozyten mit CD8 T-Zellen ko-kultiviert, die an Tag 15 nach Infektion mit Ad-HBV-Luc isoliert wurden (Verhältnis 1:50). Die CD8 T-Zell-Zytotoxizität wurde mittels *xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) Systems, ACEA Biosciences, Inc.* indirekt verfolgt.

5. Diskussion

Chronische Hepatitis B stellt nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation [1] ein globales Gesundheitsproblem dar, da von den weltweit 257 Mio. chronischen Erkrankungen nur 1 % mit konventioneller anti-viraler Therapie, wie Nukleos(t)idanaloga und (pegyliertem) IFN α , geheilt werden können [95, 96]. Der Grund für die geringe Heilungsfrequenz ist dem Umstand geschuldet, dass durch die konventionelle Therapie die HBV-Replikation lediglich gehemmt wird, aber die virale cccDNA, das Templat für die virale DNA-Replikation und RNA-Synthese, in infizierten Hepatozyten weiter persistieren kann [97-99]. Um neue Behandlungsstrategien zu entwickeln, die auch die cccDNA bzw. die sie enthaltende infizierte Hepatozyten eliminieren, ist es jedoch notwendig, Mechanismen der viralen Persistenz vollständig zu verstehen. Bisher ist nicht vollständig bekannt, warum während einer chronischen Hepatitis CD8 T-Zellen, die die Infektion eliminieren sollen, ausgeschaltet werden.

Zur Untersuchung der viralen Infektion der Leber und der anti-viralen CD8 T-Zell-Antwort wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere rekombinante replikationsdefiziente Adenoviren des Serotyp 5 generiert, die intravenös verabreicht im murinen System hauptsächlich die Leber infizieren [160, 164]. Mithilfe der hier etablierten Modellsysteme konnten verschiedene Mechanismen identifiziert werden, die zur viralen Persistenz in der Leber führen können. Zum einen kann eine Hepatozyten-spezifische Antigenexpression und die damit verbundene fehlende Aktivierung durch CD11c-positive DCs zu einer verzögerten oder ausbleibenden CD8 T-Zell-Antwort führen. Zum anderen ist die Menge des viralen Antigens für eine Effektorfunktion entscheidend. Während Hepatozyten durch schwache Antigenexpression einer CD8 T-Zell-Effektorfunktion direkt entkommen können, kann eine hohe Antigenlast in der Zirkulation und in der Leber eine dysfunktionale CD8 T-Zell-Antwort durch erschöpfte Effektorzellen auslösen, die mit chronischer Infektion verbunden ist.

5.1 Hepatozyten-spezifische Antigenexpression führt zur viralen Persistenz in der Leber

In der Leber wird die Balance zwischen Toleranz und Immunität streng reguliert [9, 183, 184]. Für eine effektive anti-virale CD8 T-Zell-Antwort gegen Hepatozyten-spezifisch exprimierte Antigene ist auf der einen Seite eine Aktivierung durch direkte Antigenpräsentation auf Hepatozyten sowie auf der anderen Seite eine Kreuz-Präsentation von viralem Antigen durch myeloide DCs erforderlich [25, 185]. Dabei kann die T-Zell-Aktivierung über Kreuz-Präsentation in Abhängigkeit der sekretierten Antigen-Menge sowie der zeitlichen Verteilung des Antigens beeinflusst werden. Um die Auswirkungen einer viralen Leberinfektion mit schwacher Antigenexpression zu untersuchen, wurden zwei identische Adenoviren kloniert, die in äquimolaren Mengen das Antigen Ovalbumin sowie die Reporter-Proteine eGFP und Luziferase jeweils unter dem ubiquitären CMV-Promoter (Ad-CMV-GOL) oder dem

Hepatozyten-spezifischen TTR-Promoter (Ad-TTR-GOL) exprimieren. Stabenow *et al.* konnten bereits zeigen, dass eine Infektion mit Ad-CMV-GOL zur Infektion der Leber führt. Darüber hinaus zeigten sie, dass durch die im Virus-kodierte Luziferase die virale Infektion als auch indirekt die CD8 T-Zell-Effektorfunktion sich langfristig, engmaschig und sensitiv *in vivo* mithilfe der Biolumineszenz-Bildgebung verfolgen lassen [186]. Während nach einer Ad-CMV-GOL Infektion die Antigene sowohl in der Leber als auch in der Milz exprimiert werden können, können die Antigene nach einer Ad-TTR-GOL Infektion aufgrund der Promoter-Spezifität ausschließlich in der Leber, in den Hepatozyten, produziert werden.

Eine ubiquitäre Ovalbumin-Expression nach einer Ad-CMV-GOL ($10^5 - 10^8$ pfu) Infektion führte zu einer Eliminierung des Virus, mit Ausnahme der höchsten Infektionsdosis von 10^9 pfu, die aufgrund der hohen Antigenlast mit einem antigen-unspezifischen Leberschaden und erschöpften Antigen-spezifischen T-Zellen verbunden war (nicht veröffentlichte Daten). Im Gegensatz dazu war der Krankheitsverlauf nach einer Infektion mit Ad-TTR-GOL unabhängig von der verabreichten Infektionsdosis ($10^6 - 10^9$ pfu) zwangsläufig chronisch. Zwar führte die Kontrolle unter dem TTR-Promoter im Vergleich zum CMV-Promoter zu einer 100-fach schwächeren Antigenexpression, dennoch konnte auch die höchste Dosis von 10^9 pfu Ad-TTR-GOL, welche gleich viel Antigen wie 10^7 pfu Ad-CMV-GOL produzierte, nicht eliminiert werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass zusätzlich zur Menge der Leber-spezifischen Antigenexpression, die Verteilung des Antigens in der Zirkulation bzw. die Infektion der lymphoiden Organe eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der anti-viralen Immunität eine Rolle spielen können.

5.2 Chronische Ad-TTR-GOL Infektion ist mit einer eingeschränkten Aktivierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zell-Antwort verbunden

Meist werden nach Infektionen naive CD8 T-Zellen durch APCs in Lymphknoten und lymphoiden Organen wie der Milz aktiviert, wo sie zunächst expandieren bevor sie zum Ort der Infektion migrieren [187]. Bei viralen Leberinfektionen, bei denen die Antigene nur in Hepatozyten exprimiert werden können, wurde berichtet, dass eine Antigenpräsentation durch Hepatozyten an naive CD8 T-Zellen zu klonaler Anergie und Deletion führen [30, 188-191]. Dies könnte ein Mechanismus sein, der zur viralen Persistenz beiträgt. CD8 T-Zellen können jedoch auch in der Leber aktiviert werden [28, 152]. Eine Studie von Murata *et al.* ergab, dass für die Expansion funktionaler zytotoxischer anti-viraler CD8 T-Zellen in der Leber, unabhängig von den lymphoiden Organen, eine Präsentation der Antigene auf infizierten Hepatozyten und Kreuz-Präsentation auf intrahepatischen myeloiden DCs notwendig sind [25]. Dies schließt jedoch ein, dass die DCs unter inflammatorischen Bedingungen zunächst reifen müssen, um CD8 T-Zellen aktivieren zu können [37]. Murata *et al.* konnten zeigen, dass die Präsentation des Antigens auf Hepatozyten für die vollständige Aktivierung von HBV-spezifischen

CD8 T-Zellen sogar unerlässlich ist. Im Gegensatz dazu, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD11c-positive DCs, isoliert aus der Milz nach einer Ad-TTR-GOL Infektion, keine naiven transgenen Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen (CD45.1 OT-I T-Zellen) aktivieren konnten. Während die CD45.1 OT-I T-Zellen nach Aktivierung mit CD11c-positiven DCs, isoliert aus der Milz nach einer Ad-CMV-GOL Infektion, expandierten und CD25 sowie CD44 exprimierten, blieb eine Aktivierung nach einer Ad-TTR-GOL Infektion aus. Die Studie von Murata *et al.* basiert allerdings auf akuten und chronischen HBV Modellen, bei dem zwei verschiedene Modelle verglichen wurden. Bei akuter Infektion wurde das HBV1.3 Plasmid hydrodynamisch injiziert und bei chronischer Infektion wurden HBV-transgene Mäuse verwendet [25, 137, 153]. Da bei der hydrodynamischen Injektion das Lebergewebe geschädigt wird und in HBV-transgenen Mäusen eine höhere Antigenlast vorliegt, ist unklar, welche Rolle die Kreuz-Präsentation durch DCs sowohl in der Leber als auch in lymphoiden Organen während einer Infektion ohne Leberschaden tatsächlich spielt [137, 154-156]. Darüber hinaus transferierten Murata *et al.* eine nicht physiologische Anzahl an transgenen HBV-spezifischen CD8 T-Zellen (2×10^6 Cor93 T-Zellen), deren Aktivierung und Zytotoxizität untersucht wurden. Dabei könnte das Verhältnis zwischen APCs und naiven CD8 T-Zellen für die Aktivierung entscheidend sein [25]. In der hier untersuchten Ad-TTR-GOL Infektion wurden lediglich 100 Antigen-spezifische CD8 T-Zellen (CD45.1 OT-I T-Zellen) adoptiv transferiert. Die hier verwendete Anzahl an naiven Vorläufer-Zellen ist ähnlich dem natürlich vorkommenden Pool in der Maus, bei dem 15 bis 1220 naive CD8 T-Zell-Vorläufer für eine Spezifität existieren [192, 193].

Zusammenfassend verursachte die Ad-TTR-GOL Infektion durch Hepatozyten-spezifische Expression der Antigene und der dadurch resultierend fehlenden Aktivierung durch CD11c-positive DCs in der Milz eine schwache Expansion der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen. Obwohl Virus-kodiertes Ovalbumin löslich ist und sekretiert wird, schien eine Kreuz-Präsentation des assoziierten Peptids (Ova257-264) nicht effizient genug zu sein, um Ovalbumin-spezifische CD8 T-Zellen zu aktivieren, da lösliches endogenes Antigen ohne Inflammation nicht zu einer Reifung von DCs führt [194, 195]. Im Ad-TTR-GOL System können die DCs zwar durch das Adenovirus infiziert werden, was mit inflammatorischen Stimuli verbunden ist, für eine Kreuz-Aktivierung von CD8 T-Zellen muss das virale Antigen jedoch zusätzlich von DCs kreuz-präsentiert werden [196]. Da nach einer Ad-TTR-GOL Infektion das Ovalbumin nur in Hepatozyten exprimiert werden kann, muss es zeitnah in ausreichenden Mengen produziert und sekretiert werden, sodass es von den infizierten DCs aufgenommen werden kann, um kreuz-präsentiert zu werden. Lymphoide DCs verfügen jedoch über eine kurze Lebensdauer [197], weshalb die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass eine Adenovirus-infizierte und gereifte DC gleichzeitig lösliches Ovalbumin kreuzpräsentiert.

Während nicht gereifte DCs T-Zell Deletion, Suppression oder Anergie auslösen, können LSECs unter nicht inflammatorischen Bedingungen T-Gedächtniszellen generieren, die der Deletion entgehen [38, 198-200]. Diese durch LSECs generierten T-Gedächtniszellen, welche durch die Expression von CD44 und CD62L gekennzeichnet sind, können nach einem erneuten Antigenkontakt auf gereiften DCs unter inflammatorischen Bedingungen zu zytotoxischen CD8 T-Zellen differenzieren [38]. Zusätzlich ist bekannt, dass LSECs durch Kreuz-Präsentation das Überleben der anti-viralen CD8 T-Zellen unterstützen können [197]. In der Tat exprimierten anti-virale CD8 T-Zellen in der Milz nach einer Ad-TTR-GOL Infektion ebenfalls CD44 und CD62L, im Gegensatz zu einer Ad-CMV-GOL Infektion, was auf eine Aktivierung der CD8 T-Zellen in der Leber durch LSECs deutet [38]. Damit konnten nach einer Ad-TTR-GOL Infektion, trotz Hepatozyten-spezifischer Antigenexpression und Virus-Persistenz, anti-virale CD8 T-Zellen generiert werden, wenn auch in geringerem Ausmaß als nach einer akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion.

5.3 Ad-TTR-GOL infizierte Hepatozyten entkommen einer CD8 T-Zell-Effektorfunktion durch geringe Antigenpräsentation auf MHC-I Molekülen

Es wurde beschrieben, dass die Menge an präsentiertem viralem Antigen auf Hepatozyten die CD8 T-Zell-Effektorfunktion beeinflussen kann [201]. So kann zum Beispiel eine hohe Antigenpräsentation eine nicht zytolytische Effektorfunktion durch Sekretion von TNF und IFN γ durch CD8 T-Zellen steuern, während eine geringe Antigenpräsentation zur Degranulation der CD8 T-Zellen führen kann [45, 201]. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass die räumliche Verteilung von Peptid-MHC-Komplexen die Bindung mit den T-Zell-Rezeptoren und somit Aktivierung der CD8 T-Zellen bestimmt [202]. Eine räumlich seltene Präsentation der Antigene innerhalb eines T-Zell-Rezeptor-Clusters kann zum Ausbleiben der T-Zell-Antwort führen [202]. Damit kann die Menge bzw. Verteilung des präsentierten Antigens auf MHC-I Molekülen sowohl die Qualität der CD8 T-Zell-Effektorfunktion sowie die Anfälligkeit der infizierten Zellen gegenüber ihrer Eliminierung bestimmen [203]. Es fehlen geeignete Methoden, um die Präsentation vom Ovalbumin-assoziierten Peptid (Ova257-264, SIINFEKL) auf C57BL/6-spezifischen MHC-I H2-Kb Molekülen auf Hepatozyten direkt zu messen bzw. zu quantifizieren. Immunhistologische Färbung der Leber auf viral exprimiertes eGFP, das äquimolar zu Ovalbumin exprimiert wird, zeigte jedoch eine sehr schwache bis nicht detektierbare Expression unter dem TTR-Promoter. Eine schwache virale Antigenexpression führt zwangsläufig zur geringen Peptidpräsentation auf der Oberfläche der infizierten Zellen [204]. In der Tat konnten Ad-TTR-GOL infizierte Hepatozyten weder (1) während einer Ko-Infektion mit den Viren Ad-TTR-GOL und Ad-CMV-GiRO, bei der Ovalbumin-spezifische CD8 T-Zellen zu Effektorzellen aktiviert werden, noch (2) nach einem adoptiven Transfer von *in vitro* generierten Ovalbumin-spezifischen zytotoxischen CD8 T-Zellen eliminiert werden.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass nicht nur die spät aktivierten bzw. ausgeschalteten OT-I T-Zellen für die chronische Infektion der Leber verantwortlich waren, sondern auch die Zielzellen selbst. Die infizierten Hepatozyten schienen, nicht von den Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen erkannt zu werden. So konnten *in vitro* Ad-TTR-GOL-infizierte Hepatozyten während einer Ko-Kultur mit aktivierten OT-I T-Zellen einer Effektorfunktion entgehen, während Ad-TTR-GOL infizierte Hepatozyten, nach zusätzlicher Peptid-Beladung von den OT-I T-Zellen erkannt und lysiert wurden. Damit entkamen die Ad-TTR-GOL infizierten Hepatozyten einer CD8 T-Zell-Effektorfunktion durch schwache Antigenpräsentation. In Zusammenhang mit Infektionen wurde dieser Mechanismus noch nicht beschrieben und stellt eine neue Form zur Induktion der viralen Persistenz dar.

5.4 Einfluss der geringen Antigenlast auf den Verlauf einer Ad-HBV-Luc Infektion

Nach Analyse des Ad-CMV-GOL/Ad-TTR-GOL Systems im Zusammenhang mit der viralen Persistenz in der Leber wurde ein weiterführendes klinisch relevantes Modellsystem generiert, das eine humane HBV Infektion reflektieren soll. Hierfür wurde ein rekombinantes Adenovirus generiert, welches für das HBV1.3 Überlängengenom kodiert und um eine Luziferase-Sequenz erweitert wurde (Ad-HBV-Luc) [160, 163]. Unter Verwendung des gleichen Virus, aber unterschiedlichen Infektionsdosen, konnte gezeigt werden, dass Infektionen mit hoher und niedriger Dosis des Ad-HBV-Luc persistieren, während eine moderate Infektionsdosis zur funktionalen anti-viralen CD8 T-Zell-Antwort und Viruseliminierung führt.

Eine geringe Antigenlast konnte mit der Persistenz von HBV Infektionen in Verbindung gebracht werden [205]. Diese Ergebnisse konnten in immunkompetenten Mäusen mit unterschiedlichen HBV Genotypen gemacht werden, die aufgrund der unterschiedlichen Peptid-MHC-I-Bindung zu variierenden Antigenpräsentation bzw. T-Zell-Rezeptor-Bindung führten [205]. Auch in Patienten kann das HBV mit niedriger viraler Last persistieren [206]. Dabei ist die erschöpfte CD8 T-Zell-Antwort nicht nur in Abhängigkeit der viralen Menge, sondern auch in Abhängigkeit der unterschiedlich oft vorkommenden Antigen-Spezifitäten beeinflusst [206, 207]. So konnten zum Beispiel HBeAg-spezifische CD8 T-Zellen in Patienten mit chronischer Hepatitis B nur sporadisch detektiert werden und könnten somit zu eingeschränkter HBV-spezifischer T-Zell-Antwort beitragen [206]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass niedrige Infektionsdosen von Ad-HBV-Luc (10^5 / 10^6 pfu) zu einer abwesenden Immunität und viralen Persistenz führen. Diese Ergebnisse waren ähnlich zu denen nach einer Ad-TTR-GOL Infektion, die mit schwacher Antigenexpression, langsamen Antigenverteilung und Kreuz-Aktivierung sowie ineffizienter Aktivierung der CD8 T-Zellen assoziiert war. Vermutlich kann die virale Persistenz hierbei auf eine mangelnde Aktivierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen zurückgeführt werden. Auch wenn es für Ad-HBV-Luc formal nicht gezeigt wurde, so zeigte sich im Ad-TTR-GOL System, dass niedrigere

Infektionsdosen zu geringeren Zahlen an aktivierten Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen führten. In diesem Zusammenhang zeigte sich auch nach Infektion mit dem Ad-CMV-GOL, dass mit abnehmender Virusdosis, sich die Inkubationszeit verlängerte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es eine minimale Menge an Antigen gibt, welche für eine effiziente Aktivierung von CD8 T-Zellen nötig ist. Dabei spielt die Antigenmenge nicht nur für die Expansion, sondern auch für den Phänotyp von CD8 T-Zellen eine entscheidende Rolle. Bei nicht rechtzeitiger Eliminierung der Infektion kann eine andauernde geringe Antigenlast ohne Ko-Stimulation negative Effekte auf die Funktion von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nehmen [208]. Fehlende Ko-Stimulation der CD8 T-Zellen wie beispielsweise über CD28 oder OX40 führt zu einer mangelnden Induktion des Transkriptionsfaktor AP1 (*engl.* activator protein 1) und dem Ausbleiben der Dimerbildung der beiden Transkriptionsfaktoren AP1 und NFAT1 (*engl.* nuclear factor of activated T cells 1) [208, 209]. Es konnte gezeigt werden, dass eine schwache und andauernde Stimulation des T-Zell-Rezeptors, ohne Aktivierung des AP1, zur Aktivierung von NFAT1 führt, welcher als Monomer zur Expression der inhibitorischen Moleküle PD-I, Tim-3 und LAG-3 führt [208]. Auch hier zeigte sich nach einer andauernden geringen Antigenlast nach einer Ad-TTR-GOL Infektion ein erschöpfter CD8 T-Zell-Phänotyp, der von Expression von PD-I, LAG3, Tim-3, und CTLA-4 geprägt war.

5.5 Hohe Antigenlast führt während einer Ad-HBV-Luc Infektion zu CD8 T-Zellerschöpfung

Eine zu hohe Antigenlast während viraler Leberinfektionen führt ebenfalls häufig zur Etablierung einer Persistenz [50, 55, 210, 211]. Hierbei scheint, die exzessive Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch häufig vorkommende Epitope zum erschöpften Phänotyp und eingeschränkter Funktionalität von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen zu führen [59, 206, 211, 212]. Dabei könnte dieser Mechanismus helfen, vor einer starken Organschädigung und einer Immunpathologie zu schützen. Interessanterweise konnte im LCMV-Model gezeigt werden, dass Antigen-spezifische CD8 T-Zellen, die nur eine Woche der persistenten hohen Antigenstimulation ausgesetzt waren, nach Antigenentzug zu funktionalen CD8 T-Gedächtniszellen differenzieren konnten [60, 61]. Im Gegensatz dazu konnte der funktionelle Phänotyp der CD8 T-Zellen, die langfristig einer hohen Antigenmenge ausgesetzt waren, nicht reversiert werden [60, 61]. Damit ist nicht nur die Antigenmenge, sondern auch die Expositionsdauer ein wichtiger Faktor der T-Zell-Erschöpfung.

Auch während einer HBV Infektion führt eine hohe Antigenlast zum Abschalten der anti-viralen CD8 T-Zell-Antwort und kann zur viralen Persistenz führen [62, 84, 85, 213]. Während einer HBV Infektion kann die Antigenlast auf CD8 T-Zellen über die Peptidpräsentation auf MHC-I Molekülen entweder auf infizierten Hepatozyten oder durch zirkulierende HBeAg und HBsAg, die von anderen Zellen kreuz-präsentiert werden, wirken [214]. In dieser Arbeit verursachte

eine hohe Infektion mit Ad-HBV-Luc (10^8 / 10^9 pfu) eine virale Persistenz mit abwesender Immunität. Zwar konnten nach Infektion mit hoher Dosis des Ad-HBV-Luc (10^8 pfu) HBcore-spezifische CD8 T-Zellen generiert werden, diese wurden jedoch funktional ausgeschaltet. Diese dysfunktionalen CD8 T-Zellen waren durch die hohe Expression von PD-I, TIGIT, TOX und einem Verlust der Tcf-1 Expression gekennzeichnet. Während die inhibitorischen Marker PD-I und TIGIT bereits im Zusammenhang einer chronischen HBV Infektion beschrieben wurden, ist die Regulation der der HBV-spezifischen CD8 T-Zellen durch die Transkriptionsfaktoren Tcf-1 und TOX weitgehend unbekannt [215, 216]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Tcf-1 das Überleben von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen während chronischer viraler Infektionen reguliert [52]. So konnte in chronisch mit HCV infizierten Patienten bereits eine Tcf-1^{pos}PD-I^{pos} CD8 T-Zell-Population beschrieben werden, die sowohl Merkmale von erschöpften als auch von Gedächtniszellen aufweist [217]. Diese Population scheint, nach erneuter Antigenstimulation für die Regeneration des terminal erschöpften Pools von Tcf-1^{neg}PD-I^{pos} anti-viralen CD8 T-Zellen zuständig zu sein [217]. Auch Schuch *et al.* konnten in chronisch mit HBV infizierten Patienten eine Tcf-1^{pos}PD-I^{pos} HBV-spezifische CD8 T-Zell-Population identifizieren, die nicht terminal ausgeschaltet war und Gedächtniszell-ähnlichen Phänotyp aufwies [206]. Während Tcf-1 für Plastizität des T-Zell-Phänotyps verantwortlich ist, wird durch TOX die T-Zell-Erschöpfung auf epigenetischer Ebene reguliert [180, 218]. In chronisch viralen Infektionen wie mit LCMV oder HCV konnte gezeigt werden, dass TOX in Gegenwart von andauernder Antigenstimulation des T-Zell-Rezeptors exprimiert wird und mit einem erschöpften CD8 T-Zell-Phänotyp korreliert [51]. Dabei reguliert TOX durch epigenetische Chromatin-Remodellierung die Zugänglichkeit der Protein-kodierenden DANN-Regionen und Expression weiterer inhibitorischer Proteine wie beispielsweise PD-I und TIGIT [53]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nach einer chronischen Ad-HBV-Luc Infektion (10^8 pfu) mehrere CD8 T-Zell-Populationen in der Leber identifiziert werden, die durch eine charakteristische Tcf-1 und TOX Expression gekennzeichnet waren. Aufgrund der geringen Anzahl der HBcore-spezifischen CD8 T-Zellen und der zellschädigenden durchflusszytometrischen Färbung der internukleären Transkriptionsfaktoren in Kombination mit der Färbung des T-Zell-Rezeptors konnten keine anti-viralen Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen untersucht werden. Dennoch konnte in der Leber chronisch infizierter Ad-HBV-Luc Mäuse eine CD8 T-Zell-Population gezeigt werden, die Tcf-1^{hi}TOX^{hi} (P2) war, ähnlich den erschöpften CD8 Vorläufer-T-Zellen während einer LCMV Infektion oder ähnlich den Tcf-1^{pos}PD-I^{pos} Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen während einer chronischen HCV Infektion [51, 53, 217]. Diese erschöpften CD8 Vorläufer-T-Zellen (P2) könnten durch Differenzierung in terminale Effektorzellen (P4), gekennzeichnet durch Tcf-1^{dim}/TOX^{pos}/PD-I^{pos}/Granzym B^{pos}, die minimale Kontrolle der viralen Replikation und Expansion gewährleisten [178]. Auf der anderen Seite könnten sich aus den erschöpften CD8 Vorläufer-T-Zellen (P2) oder aus den

terminalen Effektorzellen (P4) terminal erschöpfte CD8 T-Zellen (P5) bilden, die Tcf-1 verlieren und weiterhin TOX, PD-I und Granzym B exprimieren [41, 179, 180]. Alfei *et al.* konnten zeigen, dass der Verlust von TOX während einer frühen Infektion nicht nur mit Viruseliminierung, sondern auch mit zu einer Immunpathologie verbunden war [51]. Damit scheint TOX als Regulator während chronischer viraler Infektionen vor Organschädigung zu schützen.

5.6 Rolle der Antigemenge für CD8 T-Zell-Aktivierung während einer Ad-HBV-Luc Infektion

PD-I, TIGIT und TOX können nicht nur als Marker für Erschöpfung von CD8 T-Zellen herangezogen werden. Transient exprimiert während der frühen Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor können sie auch als Aktivierungsmarker dienen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Infektionsdosis mit Ad-HBV-Luc (10^8 pfu) zu einer frühen Expansion der HBcore-spezifischen CD8 T-Zellen führt. Diese CD8 T-Zellen waren durch eine frühe Granzym B Expression gekennzeichnet und der Infektionsverlauf war von erhöhten ALT-Werten sowie einem minimalen Abfall des Biolumineszenz-Markers determiniert, was auf eine frühzeitige Effektorfunktion hindeutete. Im zeitlichen Verlauf nahmen diese CD8 T-Zellen einen erschöpften Phänotyp an, charakterisiert durch die langfristige Expression von TOX, PD-1 und TIGIT, was vermutlich mit der hohen Menge an präsentierten Antigenen in Kombination mit einer hohen Anzahl an infizierten Hepatozyten assoziiert ist.

Verglichen mit dem Ad-TTR-GOL werden im Ad-HBV-Luc System das HBcore Protein bzw. die Luziferase unter Kontrolle des HBcore Promoters 10-fach stärker exprimiert als die viralen Antigene unter dem TTR-Promoter. Trotz Hepatozyten-spezifischer Expression der viralen Antigene nach einer Ad-HBV-Luc Infektion, können sich die Antigene aufgrund der Promoterbedingten stärkeren Expression besser in der Zirkulation verteilen, sodass sie von DCs aufgenommen werden könnten, um CD8 T-Zellen zu kreuz-aktivieren. Darüber hinaus könnte die verstärkte Antigenpräsentation pro infiziertem Hepatozyt im Ad-HBV-Luc System zur direkten Aktivierung der CD8 T-Zellen beitragen, denn es ist bekannt, dass während einer HBV Infektion die CD8 T-Zellen auch in der Leber von Hepatozyten aktiviert werden können, wobei die räumliche Verteilung und Frequenz der präsentierten viralen Antigene auf infizierten Zellen eine wichtige Rolle spielen können [202]. Somit könnte eine moderate Antigenpräsentation pro Hepatozyt die Eliminierung der Ad-HBV-Luc (10^7 pfu) Infektion trotz Hepatozyten-limitierter viraler Expression erklären, im Vergleich zu einer Ad-TTR-GOL Infektion. Dennoch dauerte die Aktivierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nach einer Ad-HBV-Luc Infektion mit 10 Tagen länger als die Aktivierung nach einer Ad-CMV-GOL Infektion, bei der bereits am 5. Tag aktivierte Antigen-spezifische CD8 T-Zellen detektiert werden konnten. Gründe hierfür könnten in der ubiquitären Antigenexpression unter dem CMV-Promoter liegen, das zur zügigen Verbreitung des Antigens und der damit verbundenen schnelleren Aktivierung der

Immunantwort führt. Auch in Patienten wurde nach einer HBV Infektion eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit mit durchschnittlich 75 Tagen beschrieben, verglichen mit anderen viralen Infektionen wie mit dem Influenza Virus, bei dem eine Inkubationsphase von 2 Tagen beschrieben wurde [219].

Interessanterweise konnten während chronischer HBV Infektionen selten vorkommende Epitope mit einer geringen Expansion der jeweiligen Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen korreliert werden. So konnte eine verminderte Anzahl an Polymerase- und HBeAg-spezifischen CD8 T-Zellen im Vergleich zu HBcore-spezifischen CD8 T-Zellen detektiert werden [207]. In der Tat kann die Häufigkeit der Antigenpräsentation auf Hepatozyten die T-Zell-Expansion und Funktion beeinflussen [172, 201]. Dabei könnte die höhere Häufigkeit von HBcore Protein gegenüber HBV-spezifischer Polymerase oder HBe Protein zu einer effizienteren Aktivierung von HBcore-spezifischen CD8 T-Zellen führen, die mit Kontrolle der HBV Infektion assoziiert sind [207]. Darüber hinaus können Antigenprozessierung, Antigenbindung an MHC-I Allele oder T-Zell-Rezeptor-Affinität die T-Zell-Expansion und Funktion formen [206, 220]. Zwar expandierten die HBcore-spezifischen CD8 T-Zellen während der hier untersuchten Ad-HBV-Luc Infektion mit hoher Antigenlast (10^8 pfu) zunächst schneller im Vergleich zur Infektion mit moderater Antigenlast (10^7 pfu), ihre absolute Anzahl war jedoch deutlich geringer als während der moderaten Antigenlast. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Studien mit LCMV, in denen gezeigt werden konnte, dass trotz des erschöpften Phänotyps die Expansion und Langlebigkeit von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen während chronischer Infektionen mit hoher Antigenlast nicht eingeschränkt sei [210]. Diese abweichenden Ergebnisse könnten mit den infizierten Zielzellen der jeweiligen Viren erklärt werden. Während einer HBV Infektion werden ausschließlich Hepatozyten infiziert und virale Antigene müssen zunächst sekretiert und von DCs aufgenommen werden, um kreuz-präsentiert zu werden [100]. Aufgrund der schwachen innaten Immunantwort während der HBV Infektion ist die Reifung der DCs eingeschränkt [64-67]. Eine Aktivierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen durch Hepatozyten kann jedoch zu zur Deletion, Anergie und Erschöpfung führen [221]. Im Gegensatz dazu infiziert das LCMV DCs direkt und kann somit einen anderen Einfluss auf die Aktivierung der CD8 T-Zellen nehmen, welcher nicht zur Deletion führt und damit die Expansion nicht beeinträchtigt [127-129].

5.7 Modellsysteme einer Hepatitis B Virus Infektion

Ähnliche Ergebnisse zur Dosis-abhängigen Eliminierung bzw. Persistenz des HBV konnten in einer Studie mit HBV-infizierten Schimpansen gemacht werden [83]. Dabei konnten Schimpansen, die mit hoher und moderater Dosis des HBV infiziert wurden die Infektion kontrollieren, während eine geringe Infektionsdosis zu einer mangelnden CD8 T-Zell-Aktivierung führte, was in einer viralen Persistenz resultierte [83]. Anders als in den Studien

an Schimpansen resultierte hier die höchste untersuchte Infektionsdosis in einer Persistenz des Ad-HBV-Luc in der Maus, anstatt der Viruseliminierung. Der nicht direkt übertragbare Infektionsverlauf kann zum einen an den unterschiedlichen Wirtssystemen liegen, wobei die immunologische Zellzusammensetzung in der Maus von Schimpansen und Menschen abweicht [222, 223]. Zum anderen kann sich das HBV im Schimpansen ausbreiten, im Gegensatz zum murinen System [83, 157]. Im murinen Ad-HBV-Luc System ist das HBV zwar replikationsfähig, kann jedoch keine neuen Hepatozyten infizieren [157, 160, 163]. Das Adenovirus, welches als Shuttle dient, ist dagegen replikations-defizient und wird nicht vom Empfängertier erkannt [161, 162]. Doch gerade deshalb, weil sich das HBV in murinen Hepatozyten nicht ausbreiten kann, konnten bisher niedrige Infektionsdosen aufgrund der mangelnden Sensitivität der HBeAg und HBsAg Detektion nicht untersucht werden. Zwar könnten Schimpansen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Menschen viele Aufschlüsse über die Pathogenese von HBV und anderen Infektionen liefern, Versuche an Schimpansen sind jedoch aus ethischen Gründen nicht mehr vertretbar. Deshalb sind Kleintiermodelle für HBV Infektionen dringend erforderlich. Die meisten Mausmodelle für eine Hepatitis B basieren auf einer persistenten Expression von HBV-spezifischen Proteinen. Beispiele hierfür sind HBV-replikationskompetente transgene Mäuse, MUP-(Pre)Core transgene Mäuse oder der Transfer von HBV-Genomen mithilfe Adeno-assoziiierter Vektoren [137, 138]. Durch hydrodynamische Applikation von zirkulärer HBV-DNA konnte in der Maus eine akut selbst-limitierte Hepatitis B nachgestellt werden [141, 153, 154]. Doch aufgrund des damit verbundenen Leberschadens und der Induktion des innate Immunsystems kann die Aktivierung der CD8 T-Zellantwort nicht mit einer humanen HBV Infektion verglichen werden [62, 154-156]. Die Generierung von humanisierten chimären Mäusen stellt wahrscheinlich das relevanteste HBV-Model im murinen System dar. Dabei können unter immunsuppressiven Bedingungen humane Hepatozyten in die Maus eingebracht werden, die mit HBV infiziert werden können [142-146]. Mithilfe des humanisierten Mausmodels konnten Dusséaux *et al.* zeigen, dass geringe Infektionsdosen (10^7 HBV-Kopien/ml) zu einer besseren Kontrolle des HBV durch das Immunsystem führten als höhere Infektionsdosen (10^9 HBV-Kopien/ml) [167]. Die im humanisierten Mausmodel verwendete niedrige Dosis des HBV entsprach mit HBeAg-Werten um die 10 PEIU/ml der hier verwendeten akut selbst-limitierten Dosis des Ad-HBV-Luc (10^7 pfu) [167]. Damit könnten die Ergebnisse zwischen den Modellen direkt verglichen werden und führten zu den selben Rückschlüssen, dass die Infektionsdosis, die anti-virale Immunantwort bestimmt. Das Ausmaß der Immunkontrolle bewerteten Dusséaux *et al.* an der Detektion von Antigen-spezifischen Immunglobulinen G (anti-HBs, anti-HBcore), der sogenannten Serokonversion, und der Infiltration von Immunzellen in das Lebergewebe [167]. Allerdings waren die transferierten humanen Immunzellen und die transplantierten Hepatozyten nicht vom selben Donor und nicht übereinstimmend in den

humanen Leukozyten-Antigenen (HLA), wodurch direkte Eliminierung von infizierten Hepatozyten durch CD8 T-Zellen nicht beobachtet werden konnte [167]. Um Immunreaktionen untersuchen zu können, müssen jedoch HLA-übereinstimmende Immunzellen und Hepatozyten transferiert werden [138, 148]. Da der Zugang zum humanen Donor-Material begrenzt ist, stellt der Einsatz von humanisierten Mäusen in Kombination mit HLA-übereinstimmenden Immunzellen ein sehr wertvolles, aber aufwendiges Kleintiermodell für HBV Infektionen dar.

Der Transfer von HBV-DNA mittels adenoviraler Vektoren (Ad-HBV) resultierte meist in einer chronischen Infektion [154, 163]. Zwar konnte in einer Studie von Huang *et al.* das Ad-HBV nach einer hohen Infektionsdosis mit 3×10^9 pfu teilweise eliminiert werden, dies war aber mit einem hohen Leberschaden und der damit möglichen einhergehenden Aktivierung des innate Immunsystems verbunden [154]. Unter Verwendung des Ad-HBV wurden oft hohe Infektionsdosen von 10^8 oder 10^9 pfu verabreicht und die (Re-)Aktivierung des Immunsystems untersucht. Dies hat zum einen den Grund, dass eine chronische HBV Infektion im Menschen oft mit einer hohen Antigenlast assoziiert ist, im Gegensatz zu chronischen Infektionen mit dem HCV oder dem humanen Cytomegalovirus [62, 84, 85]. Zum anderen können während einer HBV Infektion teilweise bis zu 100 % der Hepatozyten infiziert sein [9, 83]. Damit stellen höhere Infektionsdosen des Ad-HBV aufgrund der klinisch relevanten Antigenlevel einen wichtigen Parameter dar [224, 225]. Der Krankheitsverlauf nach Infektionen mit Ad-HBV unterhalb 10^8 pfu wurde jedoch bisher nicht publiziert. Zur Untersuchung der Immunaktivierung in Abhängigkeit der viralen Last stellen deshalb Konzentrationen unterhalb von 10^8 pfu des Ad-HBV eine interessante Anwendung dar. So konnten beispielsweise in chronisch HBV infizierten Patienten mit geringerer HBeAg-Last nach Behandlung mittels pegyliertem IFN α eine bessere Serokonversion von HBeAg erzielt werden als in Patienten mit hoher HBeAg-Last (>100 PEIU/ml) [224]. Bisher gibt es keine geeigneten Mausmodelle für eine HBV Infektion, die eine Charakterisierung der CD8 T-Zellantwort in Anhängigkeit der viralen Last bzw. Antigemenge erlauben.

Das Ad-HBV-Luc ermöglichte im murinen System durch Anwendung des sensitiven Biolumineszenz-Biomarkers die Untersuchung auch geringerer Infektionsdosen unterhalb von 10^8 pfu. Dadurch konnten weniger als 10.000 infizierte Hepatozyten *in vivo* verfolgt werden [186]. Dabei zeigte die Biolumineszenz-Bildgebung die gleiche Eliminierungskinetik wie die Messung des HBeAg-Levels im Serum, erlaubte jedoch auch die Quantifizierung geringerer Infektionsdosen. Aufgrund der limitierter Blutmenge, die Mäusen entnommen werden kann, konnte die Biolumineszenz-Bildgebung frequenter durchgeführt werden und ermögliche eine engmaschige und langfristige Verfolgung der Virus-Eliminierung im Vergleich zur HBeAg-Messung. Dabei ist die engmaschige Detektion des Virus für die Analyse der Immunantwort während des Infektionsverlaufs unerlässlich, um die Kinetik der CD8 T-Zell-

Antwort zu definieren. Mithilfe Ad-HBV-Luc können die Mechanismen der viralen Persistenz während einer HBV Infektion und der Einfluss des Antigens auf die CD8 T-Zell-Antwort weiterführend untersucht werden. So könnte zukünftig die Modulation der Antigenexpression nach einer Ad-HBV-Luc Infektion, bei gleicher Infektionsdosis, im Zusammenhang mit der Re-Aktivierung der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen untersucht werden. In chronischen Mausmodellen wie AAV-HBV oder HBV-transgenen Mäusen gibt es bereits Hinweise dafür, dass eine Unterdrückung der hohen Antigenlast während der Re-Aktivierung der T-Zellen eine wichtige Rolle spielt [159]. Die Persistenz aufgrund der niedrigen Antigenlast in der Leber ist jedoch weitgehend unerforscht. Dabei könnte die Quantifizierung der Antigenexpression und die demensprechend angepassten Therapie eine entscheidende Rolle für die Behandlung der chronischer Leberinfektion spielen.

6. Material

6.1 Geräte

Gerät	Model	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-System	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Brutschrank	HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer	SP6800 Analyzer	Spectral Sony Biotechnology Inc., San Jose, USA
Durchflusszytometer	LSRFortessa™	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Echtzeit-Zellanalyse-System	xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA)	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, USA
Feinwaage	Analysenwaage ABS	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius CP224S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse TE2000s	Nikon Imaging Japan Inc., Tokyo, Japan
Gel-Imaging-System	ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat	Leica ASP300 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Immunhistochemie-Färbeautomat	BondMax RXm system	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Immunoassay-Analysensystem	ARCHITECT i1000SR System	Abbott Laboratories, Chicago, USA
<i>In-vivo</i> -Bildgebungssystem (engl. <i>in vivo</i> imaging system, IVIS)	IVIS® Lumina LT Series III	PerkinElmer, Waltham, USA
Käfig-Belüftung	ScanClime Mini ^{ECO}	Scanbur A/S, Karlslunde, Dänemark
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Magnet-Säule	LS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer	Monotherm	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Mikrotom	Rotary Microtome Microm HM 355S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Perfusionspumpe	Masterflex®	Novodirekt, Kehl am Rhein, Deutschland
pH-Meter	inoLab® pH 7110	WTW (Xylem Analytics), Weilheim, Deutschland
Photometer	BioDrop	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Real-Time-PCR-System	LightCycler® 480 II System	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Reflotron	Reflotron® Plus	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Schüttelinkubator	Incubator Hood TH 15	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
Sterilbank	Heraeus® HERASafe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermozykler	ProFlex PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ultrazentrifuge	- Avanti J-25I - Optima LE-80K	Beckman Coulter, Brea, CA/USA
Waage	LSM2000	PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Wasserbad	WN45	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	- Heraeus® Fresco 17 - Heraeus® Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Rotanta 460 RC	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

6.2 Materialien

Material	Beschreibung	Hersteller
24-Well-Platten		TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
384-Well-Platten (qPCR)	LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
96-Well-Platte, V	Cellstar® Zellkulturplatten, natur	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
96-Well-Platten (xCELLigence)	E-Plate 96 PET	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, Vereinigte Staaten
96-Well-Platten, F		TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
ALT-Teststreifen	Reflotron® GPT (ALT)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Dialysekammer	Slide-a-Lyzer® G2 Dialysis Cassettes 10K MWCO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Insulin-Spritzen	Omnican® U-100 Insulin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Käfige (<i>engl.</i> Individually Ventilated Cage, IVC)	GM500 Mouse IVC Green Line	Scanbur A/S, Karlslunde, Dänemark
Kapillaren zur Blutentnahme	HIRSCHMANN® ringcaps® Li-Heparin 32 µl	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Lanzetten zur Blutabnahme	SUPRA blood lancets	megro GmbH & Co. KG, Wesel, Deutschland

Microvetten	Microvette® 500 LH-Gel	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritze, 2 ml	Injekt® 2 ml Syringe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritze, 5 ml	Injekt® 5 ml Syringe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter	Filtropur BT50, 500 ml, 0.2 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter (0.2 µm)	Filtropur BT50 500 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Ultrazentrifugen-Röhrchen	9,9 x 70 mm BL/LB, 20G X 2 3/4	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellkultur-Flaschen	Tissue Culture Flask	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Platten	Zellkulturschalen 150	TPP

6.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Biolumineszenz-Bildgebung	
Isofluran CP 1 ml/ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
XenoLight D-Luciferin - K+ Salt Bioluminescent Substrate	PerkinElmer, Waltham, USA
Durchflusszytometrie	
Count Bright absolute counting beads (FACS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
eBioscience™ Brefeldin A Solution (1000x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (500x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
UltraComp eBeads™ Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hepatozyten-Isolation	
Heparin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin 10 % (als Hydrochlorid)	MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland
Xylazin, 20 mg/ml (Rompun 2%)	Bayer AG, Leverkusen
Hexon-Titration	
DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Immunhistochemie	
Paraformaldehyd-Lösung (4 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Klonierung	
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Midori Green Advance DNA Farbstoff	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Lymphozyten-Isolation	
Pancoll, human	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Percoll™	GE Healthcare, Chicago, USA
Zellkultur	
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetal calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glucose-Lösung, 50 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glutamin-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES, 1M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydrocortison	Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland
Insulin	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin, 10 000 U/m	Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Selenium, Transferin, Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

6.4 Medien, Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
Adenovirus-Produktion	
Cäsiumchlorid-Puffer 1 (1,25 M CsCl)	1,25 M CsCl Virus-Puffer steril filtriert (0,22 µm)
Cäsiumchlorid-Puffer 2 (1,34 M CsCl)	1,34 M CsCl Virus-Puffer steril filtriert (0,22 µm)
Cäsiumchlorid-Puffer 3 (1,40 M CsCl)	1,40 M CsCl 1x Gradienten-Lösungspuffer steril filtriert (0,22 µm)
Dialysepuffer (10x)	30 % (w/v) Sucrose 1,5 M NaCl 0,1 M MgCl ₂ 0,1 M Tris –HCl pH=7,4 steril filtriert (0,22 µm)
HEK293-Expansionsmedium	DMEM, 10 % FCS 1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin
HEK293-Transduktionsmedium	DMEM, 8 % FCS 1 % Glutamin

	1 % Penicillin/Streptomycin
Virus-Puffer	10 mM Tris-HCl pH=7,4 20 mM MgCl ₂ pH=7,8 steril filtriert (0,22 µm)
Durchflusszytometrie	
FACS-Puffer	5 % FCS 2,5 % BSA PBS
Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	Invitrogen, Carlsbad, USA
IC Fixation Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
MACS-Puffer	1 % FCS 2 mM EDTA PBS
Permeabilization Buffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Immunhistochemie	
Antibody Diluent (IHC)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IHC Antigen Retrieval Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Klonierung	
FastDigest Buffer, 10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest Green Buffer, 10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4-Ligasepuffer, 10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TAE-Puffer, 50x	50 mM EDTA 1 M Acetat 2 M Tris pH 8,0
TE-Puffer	1 mM EDTA 10 mM Tris pH 8,0
Primäre murine Hepatozyten	
Anhaft-Medium	Erhaltungs-Medium 10 % FCS
Über-Nacht-Medium	Erhaltungs-Medium 1 % FCS
Erhaltungs-Medium	William's E Medium 2 mM Glutamin 0,06 % Glucose 20 mM HEPES pH 7,4 1 % Penicillin/Streptomycin 0,1 mg/mL Gentamycin 40 ng/mL Hydrocortison 5 µg/mL Insulin 1,6 % DMSO
EGTA-Puffer A	124 ml Glucose-Lösung 20 ml KH-Puffer 20 ml HEPES-Puffer I

	30 ml Aminosäure-Lösung 0,5 ml L-Glutamin (200 mM) 0,8 ml EGTA-Lösung Gesamtvolumen 195 mL
Kollagenase-Puffer B	77,5 ml Glucose-Lösung 12,5 ml KH-Puffer 12,5 ml HEPES-Puffer I 15 ml Aminosäure-Lösung 1,9 ml CaCl ₂ x 2 H ₂ O - Lösung 3,1 mL MgCl ₂ x 6 H ₂ O - Lösung 0,3 ml L-Glutamin (200 mM) Gesamtvolumen 123 mL Zugabe 0,12 U/ml frischer Kollagenase NB 4G pro 40 mL Kollagenase-Puffer B unmittelbar vor Perfusion
Suspensions-Puffer C	124 ml Glucose-Lösung 20 ml KH-Puffer 20 ml HEPES-Puffer II 30 ml Aminosäure-Lösung 0,5 ml L-Glutamin (200 mM) 1,6 ml CaCl ₂ x 2 H ₂ O - Lösung 0,8 ml MgSO ₄ x 7 H ₂ O - Lösung 0,17 % (w/v) BSA Gesamtvolumen 197 mL
Aminosäure-Lösung	0,27 g L-Alanin 0,14 g L-Asparaginsäure 0,4 g L-Asparagin 0,27 g Citrullin 0,14 g L-Cystein Hydrochloride Monohydrat 1 g L-Histidin Monohydrochlorid Monohydrate 1,0 g L-Glutaminsäure 1,0 g L-Glycin 0,4 g L-Isoleucin 0,8 g L-Leucin 1,3 g L-Lysin Monohydrochlorid 0,55 g L-Methionin 0,65 g L-Ornithin Monohydrochlorid 0,55 g L-Phenylalanin 0,55 g L-Prolin 0,65 g L-Serin 1,35 g L-Threonin 0,65 g L-Tryptophan 0,55 g L-Tyrosin 0,8 g L-Valin Zufügen 0,5 L H ₂ O Zufügen 10 N NaOH Einstellung pH 7,6

	Auffüllen auf 1 L mit H ₂ O steril filtriert (0,22 µm)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O - Lösung	0,13 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N N N'N'-tetraacetic acid (EGTA) Lösung	125 mM EGTA pH 7,6
Glucose-Lösung	50 mM Glucose
HEPES-Puffer I	0,25 M, pH 8,5
HEPES-Puffer II	0,25 M, pH 7,6
KH-Puffer	1 M NaCl 23,5 mM KCl 12 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
MgCl ₂ x 6 H ₂ O - Lösung	0,13 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O
MgSO ₄ x 7 H ₂ O - Lösung	0,1 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O
Allgemein	
0,9% NaCl (isotonische Kochsalzlösung)	Deltamedica GmbH, Reutlingen, Deutschland
Ammonium-Chlorid-Kalium (ACK) - Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 10,0 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA pH 7,4 steril filtriert (0,22 µm)
D-Luziferin-Lösung	50 mM D-Luziferin / PBS steril filtriert (0,22 µm)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GBSS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PCR-Wasser	H ₂ O PCR Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI-Medium (Glutamaxx)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA
T-Zellmedium	RPMI Medium 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 2 mM Glutamin 1 % β-Mercaptoethanol
William's Medium E	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

6.5 Kits

Kit	Hersteller
ARCHITECT HBeAg Reagent Kit	Abbott Laboratories, Chicago, USA
BOND Polymer Refine Detection Kit	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) Cell Division Tracker Kit	BioLegend Inc., San Diego, USA
CD11c MicroBeadsm, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

DAB (Polymer) Kit	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	Invitrogen, Carlsbad, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Naïve CD8+ T cell isolation Kit, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
NucleoBond® Xtra high-copy Midi Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin RNA®	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
pAd/PL-DEST™ Gateway™ Vector Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

6.6 Enzyme, rekombinante Proteine, Peptide

Enzym	Hersteller
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Kollagenase NB 4G	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gateway® LR Clonase® Enzyme mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gateway® Proteinase K-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
humanes IL-2 / Aldesleukin	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
T4-DNA-Ligase (5 U/μL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Trypsin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Restriktionsenzyme	
<i>AflII FastDigest</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>BspEI / KpnI FastDigest</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>HindII FastDigest</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>PacI FastDigest</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteine, Peptide	
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ova257-264 (SIINFEKL)	Iba Lifesciences, Göttingen, Deutschland
humanes IL-2/Aldesleukin	Novartis Pharma, Basel, Schweiz

6.7 Antikörper

Antikörper	Nummer/Lot	Hersteller
Depletion		
anti-Maus CD4	GK1.5	Bio X Cel, West Lebanon, USA
anti-Maus CD8 α	2.43	Bio X Cel, West Lebanon, USA
anti-Maus NK1.1	PK136	Bio X Cel, West Lebanon, USA
Durchflusszytometrie		
anti-CD160	7H1	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-CD25	PC61	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-CD44	IM7	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-CD45.1	A20	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-CD62L	MEL-14	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-CD69	H1.2F3	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-CD8 α	53-6.7	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-CD8 α	KT15	ProlImmune Ltd., Oxford, Vereinigtes Königreich
anti-CTLA-4	UC10-4B9	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-GrzB	GB11	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-human Granzyme B	GB11	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-IFN γ	XMG1.2	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-KLRG-1	2F1/KLRG1	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-LAG-3	C9B7W	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-NK1.1	PK136	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-PD-I	J43	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-TCF1/TCF7	C63D9	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
anti-TIGIT	1G9	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-Tim-3	RMT3-23	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-TNF	MP6-XT22	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-TOX	TXRX10	Invitrogen, Carlsbad, USA
aRabbit IgG, BV421 gekoppelt	Poly4064	BioLegend Inc., San Diego, USA
H-2 Kb/MGLKFRQL-Pentamere (HBVcore 93-100)	SP/7397-03	ProlImmune Ltd., Oxford, Vereinigtes Königreich
H-2 Kb/SIINFEKL-Dextramere (OVA 257-264)	20170703-KB3	Immudex ApS, Kopenhagen, Dänemark
Hexon-Titration		
Adenovirus Type 5 Hexon, Antikörper, polyklonal, HRP	PA1-73054	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immunhistochemie		
GFP Antikörper, polyklonal	20R-GR011	Fitzgerald Industries International, Acton, USA
HBVcore Antikörper, polyklonal	RB-1413	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

6.8 Kompetente *E.coli* Stämme

Stamm	Name	Hersteller
<i>E.coli</i> K12	One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>E.coli</i> K12	NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

6.9 Expressionsplasmide und Primer

Plasmid	Beschreibung
pENTR™ 11 Dual Selection Vector	Plasmid für Klonierung der Expressionskassette, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pAd/PL-DEST™ Gateway® Vector	Vektor kodiert für Adenovirus Serotyp 5, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pEntr-CMV-GOL	Kodierung eGFP, Ovalbumin, Luziferase unter CMV-Promoter
pEntr-TTR-GOL	Kodierung eGFP, Ovalbumin, Luziferase unter TTR-Promoter
pEntr-CMV-GiRO	Kodierung iRFP720, Ovalbumin, Luziferase unter CMV-Promoter
pEntr-HBV-Luc	Kodierung HBV1.3-Überlängengenom, Luziferase unter Core-Promoter
pAdHBVTrack	Plasmid zur Quantifizierung der absoluten adenoviralen Kopien mittels qPCR

Primer	Sequenz
Adeno forward	TAA GCG ACG GAT GTG G
Adeno reverse	CCA CGT AAA CGG TCA AAG

6.10 Mausstämme

Mausstamm	Bezeichnung	Hersteller
C57BL/6	C57BL/6J	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Crl	CD45.1 OT-I	Charles River Laboratories, Wilmington, USA

6.11 Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Republik Irland
Adobe® Acrobat® XI Version 11.0.23	Adobe Acrobat, San Jose, USA
ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
EndNote X9	Thomson Reuters Corporation, Toronto, Kanada
FlowJo 10.5.3	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Image Lab Software 5.2.1.	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Lightcycler 480 Software 1.5.1.62 SP2	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Living Image® 4.5	PerkinElmer, Waltham, USA
Microsoft® Excel für Mac Version 16.21	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word für Mac Version 16.21	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Prism für Mac OS X Version 7.0c	GraphPad Software, San Diego, USA
SnapGene® Viewer 5.0.4	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
SP6800 Spectral Analyzer	Sony Biotechnology Inc., San Jose, USA

7. Methoden

7.1 Molekularbiologische Methoden

a) Restriktionsverdau

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 200 ng Plasmid-DNA, 0,5 µl der *FastDigest* Restriktionsenzyme, 1x *FastDigest* Puffer, verdünnt mit sterilem ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 10 µl, angesetzt. Zum restriktiven Verdau wurde der Ansatz 10 min bei 37 °C inkubiert.

Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden 3 µg Plasmid-DNA, 1 µl der *FastDigest* Restriktionsenzyme und 1x *FastDigest* Puffer in einem Gesamtvolumen von 35 µL angesetzt. Es folgte eine 45 min Inkubation bei 37 °C.

Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert und nach Standardprotokoll mittels des Kits *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* isoliert.

b) Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde 1 %-iges bzw. 0,7 %-iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer hergestellt, versetzt mit *Midori Green Advance DNA* Farbstoff im Verhältnis von 1:10.000. Die DNA-Fragmente wurden bei 80 V in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Bildgebung der aufgetrennten DNA erfolgte mittels der Software *ChemIDoc™ XRS*. Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden nach Standardprotokoll mittels *Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Kit* isoliert.

c) Ligation

Für einen Ligationsansatz wurden je 150 ng der restriktiv verdauten und aus dem Agarosegel isolierten DNA-Fragmente, 10 U T4-DNA-Ligase (2 µl), 1x T4-DNA-Ligasepuffer, verdünnt mit sterilem ddH₂O, in einem Gesamtvolumen von 30 µl gemischt. Der Ligationsprozess erfolgte 1 h bei 22 °C. Zur Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Zellen wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

d) Transformation von *E.coli*

Für die Transformation wurden 50 µl *One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli* und 5 µl eines Ligationsansatzes oder 1 ng Plasmid-DNA 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellmembranpermeabilisierung erfolgte 30 sec bei 42 °C und wurde anschließend auf Eis 2 min abgestoppt. Die Bakterien wurden mit 250 µl LB-Medium (*engl.* Lysogeny Broth, LB) versetzt und 1 h bei 37 °C und 225 rpm kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend auf Agar-Platten mit Antibiotikum (50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die über Nacht gewachsenen *E.coli* Kolonien wurden für

Plasmidpräparation in LB-Medium vervielfältigt und die DNA wurde mittels *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* oder *NucleoBond® Xtra high-copy Midi Kit* isoliert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels *Nanodrop*.

7.2 Adenovirus-Produktion

In dieser Arbeit wurde ein replikationsdefizientes Adenovirus Serotyp 5 der 2. Generation, mit deletierten E1 und E3 Proteinen, produziert [160]. Zur Generierung des Virus wurde das *Gateway®* System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Hierfür wurden die Transgene in das *pEntr*-Plasmid kloniert und anschließend in den *pDest*-Vektor rekombiniert.

a) Rekombination

Für die Rekombination wurden je 150 ng des Transgen-kodierenden *pEntr*-Plasmids bzw. *pDest*-Vektors und 2 µL *Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix* in einem Gesamtvolumen von 10 µL mit TE-Puffer verdünnt. Die Rekombination erfolgte 1 h bei 25 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 µL Proteinase K-Lösung (2 µg/µL) versetzt und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion wurden 5 µL des Rekombinationsansatzes in *NEB 5-alpha Competent E. coli* transformiert und über Nacht auf Agar-Platten mit Ampicillin bei 37 °C kultiviert. Der Transgen-kodierende *pDest* Vektor wurde mittels *NucleoBond® Xtra high-copy Midi Kit* isoliert. Der *pDest* Vektor wurde anschließend mittels Restriktionsverdau linearisiert. Für den Restriktionsverdau wurden 12 µg des *pDest* Vektors, 1,6 µL *PacI FastDigest*, 1x *FastDigest* Puffer mit ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 100 µL verdünnt. Der Restriktionsverdau erfolgte 1 h bei 37 °C. Die Enzyminaktivierung erfolgte 10 min bei 65 °C. Durch die zweifach vorkommende *PacI*-Restriktionsschnittstelle wurden Adenovirus-unspezifische Sequenzen entfernen und das Konstrukt linearisiert.

b) Transfektion

Für die Transfektion wurden 9 µL *Lipofectamin2000* bzw. 3 µg des *PacI*-geschnittenen *pDest*-Vektors in jeweils 500 µL DMEM 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Lösungen wurden anschließend vermengt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mixtur wurde tropfenweise auf 50 % HEK293-Zellen, kultiviert in einer T75-Flasche (10 % FCS, 1 % Glutamin, DMEM), gegeben. Die transfizierten HEK293-Zellen wurden solange kultiviert und expandiert bis sie sich vom Zellboden abrundeten und lösten (37 °C, 5 % CO₂). Die Adenoviren-enthaltenden HEK293-Zellen und Medium wurden gesammelt und das Virus durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen bei -80 °C und 37 °C und Vortexen freigesetzt. Adenovirus-enthaltender Überstand wurde 10 min bei 3300 rpm von Zelldebris getrennt und für weitere Virusamplifikation verwendet.

c) Amplifikation und Dichtegradient-Zentrifugation

Zur Virenamplifikation wurden 80 %-konfluente HEK293-Zellen mit Adenovirus-enthaltendem Überstand (siehe 7.2 b) *Transfektion*), verdünnt im Verhältnis 1 zu 7 mit *HEK293-Transduktionsmedium* (8 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin, DMEM), transduziert. Sobald sich 50 % der HEK293-Zellen vom Plattenboden gelöst haben, wurden die Adenovirus-enthaltenden HEK293-Zellen geerntet. Die Zellen wurden 5 min bei 840 rpm vom Medium abgetrennt und das Zellpellet wurde in *Virus-Puffer* aufgenommen (6 ml *Virus-Puffer* pro maximal 40 Zellkulturplatten, 150 cm²). Das Adenovirus wurde durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen bei -80 °C und 37 °C und Vortexen aus den Zellen freigesetzt und mittels Dichtegradientenzentrifugation aufkonzentriert und isoliert.

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden 3,5 ml *Cäsiumchlorid-Puffer 1* (1,25 M CsCl) mit 3,5 ml *Cäsiumchlorid-Puffer 3* (1,40 M CsCl) unterschichtet. Anschließend wurden 8,5 ml Adenovirus, aufgefüllt mit *Virus-Puffer*, überschichtet. Die erste Ultrazentrifugation erfolgte bei langsamer Beschleunigung und Bremse 1 h bei 30.000 rpm und 10 °C. Die Virusbande wurde mit einer Kanüle und Spritze abgenommen und während einer weiteren Ultrazentrifugation nochmals aufgetrennt. Für die zweite Ultrazentrifugation wurden 11 ml *Cäsiumchlorid-Puffer 2* (1,34 M CsCl) mit Virus aus der ersten Ultrazentrifugation, verdünnt in *Virus-Puffer*, überschichtet. Das Virus wurde bei langsamer Beschleunigung und Bremse 18 h bei 30.000 rpm und 10 °C aufgereinigt. Die Adenovirusbande mit intakten Partikeln wurde mithilfe einer Kanüle und Spritze abgenommen und in *Dialysepuffer* (1x) umgepuffert (fünfmal, je 1 h). Das Adenovirus wurde aliquotiert bei - 80 °C gelagert.

d) Immunhistochemische Adenovirus-Titration

Für die Adenovirus-Titration wurden die Wells einer 24-Well-Platte mit 5 µg/ml *poly-L-Lysin* (verdünnt in PBS) beschichtet, 1 h bei 37 °C inkubiert und mit bidestilliertem sterilem Wasser ausgewaschen. Es wurden $2,5 \times 10^5$ HEK293-Zellen in 1 ml *HEK293-Kultivierungsmedium* (10 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin, DMEM) in den Wells ausplattiert und 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Danach wurde das isolierte Adenovirus (siehe 7.2 c) *Amplifikation und Dichtegradient-Zentrifugation*) in *HEK293-Kultivierungsmedium* verdünnt und auf die HEK293-Zellen gegeben (Verdünnungsfaktor 10⁻⁶, 10⁻⁷ und 10⁻⁸, je Quadruplikate). Die infizierten HEK293-Zellen wurden weitere 36-48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. HEK293-Zellen wurden mit 0,5 ml kaltem Methanol 20 min bei - 20 °C fixiert. Das Methanol wurde danach durch drei-fachen Waschschrift mittels 1 % BSA, verdünnt in PBS, 5 min unter Schwenken entfernt. Zur Färbung der adenoviralen Hexon-Proteine wurden 0,25 ml *anti-Hexon-Antikörper* (Meerrettichperoxidase-gekoppelt), verdünnt in 1 % BSA/PBS im Verhältnis 1 zu 1000, hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Der Antikörper wurde anschließend durch drei-fachen Waschschrift mittels PBS 5 min unter

Schwenken ausgewaschen. Immunhistologische Färbung infizierter HEK293-Zellen erfolgte durch Inkubation mit 0,2 ml *DAB-Lösung* (3,3'-Diaminobenzidin, DAB; 1 Tropfen *DAB-Substrat* verdünnt in 1 ml *DAB-Puffer*) 10 min bei Raumtemperatur unter Schwenken. Die Oxidationsreaktion wurde durch zwei-faches Waschen mittels PBS gestoppt. Die HEK293-Zellen wurden in PBS aufgenommen und positive Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Virus-Titer wurde durch relative Titration gegen ein Kontroll-Adenovirus, dessen Titer mittels Plaque-Assay bestimmt worden war, in Plaque-bildenden Einheiten (*engl.* plaque forming units, pfu) kalkuliert.

7.3 Adenovirale Infektion

Zur Infektion wurde das Adenovirus in isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) in einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt und nach Aufwärmen der Mäuse unter Infrarotlicht intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert.

7.4 Adoptiver T-Zell-Transfer

Zum adoptiven T-Zell-Transfer wurden CD8 T-Zellen aus Milz und Lymphknoten einer CD45.1 OT-I Maus isoliert (siehe 7.6 a) *Lymphozyten-Isolation aus Milz und Lymphknoten*). Es wurden 100 naive CD8 T-Zellen in 100 µl PBS i.v. in die Schwanzvene einer C57BL6 Empfängermaus injiziert. Zum Transfer zytotoxischer T-Zellen wurden naive CD8 T-Zellen *in-vitro* aktiviert (siehe 7.7 *In-vitro-Aktivierung von zytotoxischen OT-I T-Zellen*), in 100 µl PBS verdünnt und i.v. in die Schwanzvene einer C57BL6 Empfängermaus injiziert.

7.5 In vivo Depletion von Immunzellen

CD8 T-Zellen wurden durch i.v. Gabe von 30 µg anti-Maus CD8α (Klon 2.43), verdünnt in 100 µl PBS, einmal die Woche depletiert.

NK1.1 Zellen wurden durch i.v. Gabe von 300 µg anti-Maus NK1.1 (Klon PK136), verdünnt in 100 µl PBS, einmal die Woche depletiert.

CD4 T-Zellen wurden durch i.p. Gabe von 300 µg anti-Maus CD4 (Klon GK1.5), verdünnt in 100 µl PBS, zweimal die Woche depletiert.

7.6 Isolation primärer Zellen

a) Lymphozyten-Isolation aus Milz und Lymphknoten

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation erlöst und ihnen wurden Milz und Lymphknoten entnommen. Zur Isolation der Lymphozyten wurden Milz und Lymphknoten mechanisch durch ein Metallsieb zerkleinert und in PBS aufgenommen. Die Zellen wurden bei 1500 rpm, 4 °C und 5 min pelletiert. Erythrozyten wurden 3 min in 2 ml *ACK-Lysepuffer* lysiert. Der

ACK-Lysepuffer wurde mittels PBS ausgewaschen und die Zellen wurden durch ein Nylon-Sieb (2 µm) gefiltert.

CD8 T-Zellen wurden mithilfe magnetischer Zellseparation und des *Naiv CD8 T-Zell-Isolationskits* nach Standardprotokoll isoliert. Dendritische Zellen wurden mithilfe magnetischer Zellseparation und der *CD11c MicroBeads* nach Standardprotokoll isoliert.

b) Lymphozyten-Isolation aus Leber

Zur Isolation von Lymphozyten aus der Leber wurde die Maus durch zervikale Dislokation erlöst und die Leber durch die Pfortader und mit durchtrennter *Vena cava* mit PBS perfundiert (Flussgeschwindigkeit 6 ml/min). Die Leber wurde entnommen, mechanisch durch ein Metallsieb (100 µm) zerkleinert und mit PBS gewaschen (5 min bei 1500 rpm). Das Zellpellet wurde in 8 ml GBSS und 0,125 U/mg Kollagenase Typ 2 aufgenommen und 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kollagenase wurde durch einen Waschschrift mit PBS und Zentrifugation 5 min bei 1500 rpm entfernt. Das Zellpellet wurde in 3 ml 40 % Percoll/PBS aufgenommen und auf 3 ml 80 % Percoll/PBS geschichtet. Zur Herstellung des 100%-igen Percoll wurde das reine Percoll im Vorfeld im Verhältnis 9 zu 1 in 10x PBS angesetzt. Die Zellen wurden 20 min bei Raumtemperatur und 1400 rpm (Beschleunigung 7, Bremse 1) aufgetrennt. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurden die Lymphozyten abgenommen, in PBS gewaschen und in PBS aufgenommen.

Antigen-erfahrene CD8 T-Zellen wurden mit magnetischer Zellseparation und des *Naiv CD8 T-Zell-Isolationskits*, ohne Verwendung der *anti-CD44 MicroBeads*, nach Standardprotokoll des Herstellers angereichert.

c) Isolation und Kultivierung primärer muriner Hepatozyten

Für Isolation primärer muriner Hepatozyten wurde Mäusen 300 U Heparin in 150 µl isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl), sowie 200 µl einer 5 %-igen Ketamin- und 20 mg/mL Xylazin-Lösung, gemischt im Verhältnis 3 zu 1, intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Nach 5 min Einwirkzeit wurde die Leber mit *EGTA-Puffer A* 8 min durch die Pfortader und mit durchtrennter *Vena cava* perfundiert (Flussgeschwindigkeit 6 ml/min). Nachfolgend wurde mit 40 ml *Kollagenase-Puffer B* perfundiert und die Leber entnommen. Die Leber wurde über einem Sieb (300 µm) mit einer Pinzette geweitet und die Hepatozyten mit *Suspensions-Puffer C* ausgespült. Die Hepatozyten wurden 2 min bei 50xg pelletiert, zwei-fach mit *Suspensions-Puffer C* gewaschen und durch ein Sieb gefiltert (100 µm). Zur Abtrennung toter Hepatozyten wurde eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde Percoll im Verhältnis 1 zu 10 in PBS (10x) angesetzt. Daraus wurden eine 50 %-ige Percoll/William's E Medium-Lösung und eine 80 %-ige Percoll/PBS-Lösung hergestellt. Das Hepatozyten-Pellet wurde in 5 ml 50 %-iger Percoll/William's E Medium-Lösung

aufgenommen und mit 5,5 ml 80 %-iger Percoll/PBS-Lösung unterschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte 20 min bei 600xg. Tote Zellen wurden abgenommen und die restliche Zellsuspension zwei-fach mit *Suspensions-Puffer C* 2 min bei 50xg gewaschen.

Es wurden 10000 primäre murine Hepatozyten in *Anhaft-Medium* (10 % FCS) in einer Kollagen R-beschichteten 96-Well-Platte ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die 96-Well-Platte wurde mit Kollagen R, verdünnt im Verhältnis 1 zu 10 in bidestilliertem Wasser, 30 min bei 37 °C beschichtete und mit bidestilliertem Wasser gewaschen. 2 h nach Anhaften der Hepatozyten wurde das Medium *Über-Nacht-Medium* (1 % FCS) gewechselt. Am Folgetag wurden die Hepatozyten drei-fach mit *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) gewaschen und in *Erhaltungs-Medium* (ohne FCS) kultiviert.

7.7 In vitro Aktivierung von zytotoxischen OT-I T-Zellen

Zur Generierung zytotoxischer OT-I T-Zellen wurden Lymphozyten aus der Milz und Lymphknoten einer OT-I Maus isoliert (siehe 7.6 a) *Lymphozyten-Isolation aus Milz und Lymphknoten*). Es wurden 200 x 10⁶ Lymphozyten in T-Zellmedium und 0,25 mg/ml Ovalbumin aufgenommen und in einer Zellkulturflasche (175 cm²) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. An Tag 2 nach Isolation wurden das T-Zellmedium erneuert und Interleukin-2 (1000 U/ml) hinzugefügt. An Tag 4 nach Isolation wurden expandierte OT-I T-Zellen bei 1500 rpm 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml T-Zellmedium aufgenommen und mit 2 ml Pancoll unterschichtet. Es wurde eine Dichtegradientenzentrifugation 20 min bei Raumtemperatur und 1400 rpm (Beschleunigung 7, Bremse 1) durchgeführt. Lebende, aktivierte OT-I T-Zellen wurden nach dem Gradienten in PBS gewaschen und in PBS oder T-Zellmedium aufgenommen.

Zytotoxische OT-I T-Zellen wurden entweder adoptiv in Empfängermäuse transferiert (siehe 7.4 *Adoptiver T-Zell-Transfer*), aufgenommen in PBS, oder in für einen Zellproliferations-Assay (siehe 7.14 *CD8 T-Zellproliferations-Assay*) verwendet, aufgenommen in T-Zellmedium.

7.8 Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Bildgebung

Für Quantifikation der adenoviralen Infektion mittels Biolumineszenz wurden Mäuse mit 2,5 % Isofluran angereicherten Sauerstoff narkotisiert und es wurden 100 µl D-Luziferin-K-Salt (50 mM) i.p. injiziert. 5 min nach Injektion wurden die Mäuse mittels *IVIS Lumina LT-Series III, PerkinElmer* vermessen und Photonen pro Sekunde (photons/sec) im Leberbereich mittels der Software *Living Image*[®] 4.5, *PerkinElmer* quantifiziert.

Für Quantifikation der adenoviralen Infektion in präparierten Organen (Milz, Darm, Lunge, Niere, Leber) wurden 100 µl D-Luziferin-K-Salt (50 mM) auf die Oberfläche des jeweiligen Organs gegeben und 5 min danach die Biolumineszenz detektiert. Alternativ zur

Biolumineszenz, wurde in den Organen die adenovirale Infektion mithilfe der iRFP720-Floreszenz mittels *IVIS Lumina LT-Series III, PerkinElmer* gemessen.

7.9 Alanin-Aminotransferase-Test

Zur Detektion des Leberschadens mittels Alanin-Aminotransferase (ALT) wurde den Mäusen 32 µl Blut aus der Kaudalvene entnommen. Das Blut wurde auf die *Reflotron GPT Teststreifen, Hoffmann-La Roche* gegeben und mittels Blutanalysegerät *Reflotron, Hoffmann-La Roche* untersucht.

7.10 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der Leber wurde am Institut für Pathologie, Technische Universität München unter Leitung von Dr. Katja Steiger durchgeführt.

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation erlöst, die Leber mit PBS perfundiert und es wurden 4 mm dicke Streifen aus dem linken Leberlappen sowie *Lobus caudatus* geschnitten. Die Leberproben wurden in 4 % neutral-gepufferter Paraformaldehyd-Lösung 48 h fixiert, in PBS umgepuffert und dehydriert. Dehydrierte Leberproben wurden in Paraffin eingebettet und in 2 µm dicke Sektionen geschnitten. Färbung von GFP und HBcore Protein erfolgte am *BondMax RXm System, Leica* mit Primärantikörper gegen GFP, verdünnt im Verhältnis 1 zu 500 mit Antikörperverdünnungs-Lösung, und gegen HBcore Protein, verdünnt im Verhältnis 1 zu 50 mit Antikörperverdünnungs-Lösung. Die Leber-Sektionen wurden deparaffiniert und 30 min mit *Epitope Retrieval solution 1* vorbehandelt. Die Antikörper wurden mit *Polymer Refine detection kit* (ohne *Post Primary Reagent*) und DAB-Lösung gefärbt.

7.11 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der adenoviralen Infektion mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurden Lebern aus infizierten Mäusen isoliert und genomische DNA aus dem linken Leberlappen mithilfe des *NucleoSpin® Tissue Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* nach Standardprotokoll isoliert. Es wurden 50 ng genomischer DNA, je 5 µM Forward- und Reverse-Primer und 5 µl *Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue, Eurogentec*, verdünnt in PCR-Wasser, eingesetzt. Zur absoluten Quantifizierung der adenoviralen Kopien wurde eine Verdünnungsreihe von $10^1 - 10^{10}$ Kopien pAdHBVTrack-Plasmid angesetzt. Die PCR-Reaktion wurde am *LightCycler® 480 II System, Hoffmann-La Roche* nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Programm	Temperatur	Temperaturanstieg	Dauer
Denaturierung	95 °C	4,8 °C / sec	10 min
Zyklus (45x)			
Denaturierung	95 °C	4,4 °C / sec	20 sec
Annealing	60 °C	2,2 °C / sec	10 sec
Extension	72 °C	4,8 °C / sec	60 sec
Schmelzkurve	65 - 95 °C	0,11 °C / sec	

Kalkulation der absoluten adenoviralen Kopien in den Proben erfolgte mithilfe der Software *Lightcycler 480 Software 1.5.1.62 SP2, Hoffmann-La Roche*.

7.12 Quantifizierung HBeAg in Blutplasma

Zur Quantifizierung des Serummarkers HBeAg nach Ad-HBV-Luc Infektion wurde den Mäusen Blut aus der *Vena facialis* entnommen. Das Blut wurde in *Microvetten® 500 LH-Gel, Sarstedt AG & Co. KG* 5 min bei 10000xg zentrifugiert und das Plasma, verdünnt in PBS, am Institut für Virologie, Technische Universität München unter Leitung von Prof. Ulrike Protzer untersucht. Die Messung der Plasmaproben erfolgte am *ARCHITECT i1000SR System, Abbott Laboratories* nach Standardprotokoll des *ARCHITECT HBeAg Reagent Kits, Abbott Laboratories*.

7.13 CD8 T-Zell-Zytotoxizitätsassay

Es wurden primäre murine Hepatozyten isoliert und 10000 Zellen pro Well einer *xCELLigence-96-Well-Platte* in *Erhaltungs-Medium* bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (siehe 7.6 c) *Isolation und Kultivierung primärer muriner Hepatozyten*). 24 h nach Isolation wurden primäre murine Hepatozyten mit Multiplizität der Infektion (*engl. multiplicity of infection, MOI*) von 5 des Adenovirus infiziert. Zur Infektion wurde das Adenovirus im Verhältnis 1 zu 5 in murinem Zellplasma gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, nachfolgenden in PBS verdünnt und zu den primären murinen Hepatozyten gegeben. Zur Gewinnung des murinen Zellplasma wurde Mäusen Blut über *Vena facialis* abgenommen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Infizierte primäre murine Hepatozyten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. 48 h nach adenoviralen Infektion wurden die Hepatozyten unter Umständen mit 200 nM SIINFEKL beladen, das *Erhaltungs-Medium* gegen *T-Zellmedium* ausgetauscht und mit CD8 T-Zellen ko-kultiviert. Für die Ko-Kultur wurden entweder Antigen-erfahrene CD8 T-Zellen aus der Leber infizierter Mäuse isoliert (siehe 7.6 b) *Lymphozyten-Isolation aus Leber*) oder *in vitro* aktivierte CD8 T-Zellen (siehe 7.7 *In-vitro-Aktivierung von zytotoxischen OT-I T-Zellen*) generiert. Hepatozyten-Zelltod und indirekte CD8 T-Zell-Zytotoxizität wurden mithilfe des *xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) Systems, ACEA Biosciences, Inc.* verfolgt.

7.14 CD8 T-Zellproliferationsassay

Es wurden (1) naive CD44^{low} OT-I T-Zellen aus Milz und Lymphknoten einer nicht infizierten OT-I Maus, sowie (2) CD11c⁺ dendritische Zellen aus einer C57BL6 Maus, 6 h infiziert mit Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL, isoliert (siehe 7.6 a) *Lymphozyten-Isolation aus Milz und Lymphknoten*). Naive CD44^{low} OT-I T-Zellen wurden mit CD11c⁺ dendritischen Zellen in *CD8 T-Zellmedium* bei 37 °C und 5 % CO₂ ko-kultiviert. Als Positiv-Kontrolle wurden CD11c-positiven DCs mit 200 µg/ml Ovalbumin beladen. Für die Analyse der Zellproliferation wurden die Zellen nach Standardprotokoll des Herstellers mit CFSE markiert (Cell Division Tracker Kit, BioLegend Inc., San Diego, USA). An Tag 1 nach Ko-Kultur wurden OT-I T-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Aktivierung und Expansion analysiert (siehe 7.16 *Durchflusszytometrie*).

7.15 Ex vivo CD8 T-Zellrestimulation

Es wurden Lymphozyten aus der Leber infizierter Mäuse (siehe 7.6 b) *Lymphozyten-Isolation aus Leber*) isoliert. Es wurden 5 x 10⁵ Lymphozyten pro Well einer 96-Well-Platte (F) 18 h in T-Zellmedium, 10 nM SIINFEKL-Peptid und 3 µg/ml *Brefeldin A* bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Positiv-Kontrolle wurden Lymphozyten mit 2 µl/ml *Cell Stimulation Cocktail (500x)* und 3 µg/ml *Brefeldin A* behandelt. Nach Re-Stimulation wurden die Lymphozyten durchflusszytometrisch auf Produktion von TNF und IFN-γ untersucht (siehe 7.16 *Durchflusszytometrie, b) Intrazelluläre Färbung*).

7.16 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse wurden am (1) *SP6800 Spectral Analyzer, Sony Biotechnology Inc.* oder am (2) *LSRFortessa™, BD Biosciences* durchgeführt. Die am *SP6800 Spectral Analyzer, Sony Biotechnology Inc.* generierten Daten wurden durch *Spectral Unmixing* mithilfe der Software *SP6800 Spectral Analyzer, Sony Biotechnology Inc.* kompensiert. Die am *LSRFortessa™, BD Biosciences* aufgenommenen Daten wurden manuell mit der Software *FlowJo 10.5.3* kompensiert. Alle Daten wurden mit *FlowJo 10.5.3* ausgewertet.

a) CD8 T-Zell-Rezeptor- und Oberflächen-Färbung

Für die Detektion der Ovalbumin-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auf CD8 T-Zellen aus C57BL/6J Mäusen wurden *H-2 Kb/SIINFEKL-Dextramere, Immudex ApS* verwendet. Für Detektion der HBcore-spezifischen T-Zellezeptoren auf CD8 T-Zellen aus C57BL/6J Mäusen wurden *H-2 Kb/MGLKFRQL-Pentamere, ProImmune Ltd.* verwendet.

Für die Färbung wurden Lymphozyten in einer 96-Well-Platte (V) bei 1600 rpm 2 min palettiert und in 30 µl *H-2 Kb/SIINFEKL-Dextramer* bzw. *H-2 Kb/MGLKFRQL-Pentamer*, verdünnt im Verhältnis 1 zu 10 mit *FACS-Puffer* 40 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden Antikörper für die Oberflächen-Färbung (einschließlich Lebend/Tot-Farbstoff), verdünnt in 30 µl *FACS-Puffer*, hinzugegeben und weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Ovalbumin-spezifische CD8 T-Zellen wurden mit anti-CD8α (Klon 53-6.7), verdünnt 1 zu 200, und HBcore-spezifische CD8 T-Zellen mit anti-CD8α (Klon KT15), verdünnt 1 zu 260, gefärbt. Nach der Färbung wurden die Antikörper mit PBS bei 1500 rpm 5 min zwei-fach ausgewaschen. Ovalbumin-spezifische CD8 T-Zellen wurden in PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht. HBcore-spezifische CD8 T-Zellen wurden 30-60 min in *IC Fixation Buffer* bei Raumtemperatur fixiert, in PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

b) Intrazelluläre Färbung

Zunächst wurde auf *ex-vivo* re-stimulierten Lymphozyten (siehe 7.15 *Ex-vivo CD8 T-Zellrestimulation*) eine Oberflächen-Färbung durchgeführt (siehe 7.16 *Durchflusszytometrie, a) CD8 T-Zell-Rezeptor- und Oberflächen-Färbung*). Nachfolgend wurden die Zellen 30 min in *IC Fixation Buffer* bei Raumtemperatur fixiert. Die Lymphozyten wurden in *1x Permeabilization Buffer*, verdünnt in PBS, gewaschen (1500 rpm 5 min). Palettierte Zellen wurden mit anti-TNF und anti-IFN-γ, verdünnt in *1x Permeabilization Buffer*, 20 min bei 4 °C gefärbt, mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

c) Internukleäre Färbung

Zunächst wurde auf Lymphozyten eine Oberflächen-Färbung durchgeführt (siehe 7.16 *Durchflusszytometrie, a) CD8 T-Zell-Rezeptor- und Oberflächen-Färbung*). Die Lymphozyten wurden zwei-fach in PBS gewaschen und 30 min bei 4 °C mit *1x Fixation/Permeabilization-Lösung des Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set* permeabilisiert. Die Lymphozyten wurden in *1x Permeabilization Buffer*, verdünnt in bidestilliertem Wasser, zwei-fach gewaschen und mit anti-TCF1/TCF7 (Klon C63D9) Primärantikörper, verdünnt 1 zu 100 in *1x Permeabilization Buffer*, 1 h bei 4 °C gefärbt. Die Antikörper wurden zwei-fach mit *1x Permeabilization Buffer* ausgewaschen und mit Sekundärantikörper aRabbit IgG (Klon Poly4064, BV421 gekoppelt), anti-GrzB (Klon GB11) und anti-TOX (Klon TXRX10), verdünnt im Verhältnis 1 zu 200 in *1x Permeabilization Buffer*, 30 min bei 4 °C gefärbt. Die Antikörper wurden zwei-fach mit *1x Permeabilization Buffer* ausgewaschen und die Lymphozyten wurden 1 h in *IC Fixation Buffer* bei Raumtemperatur fixiert. Die Lymphozyten wurden anschließend in PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

7.17 Maushaltung

Die Mäuse wurden unter spezifischen Pathogen-freien (SPF) Bedingungen am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München nach „*Federation of Laboratory Animal Science Association*“ gehalten. Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen gehalten und die Klimatisierung mithilfe des Systems *ScanClime Mini^{ECO}*, *Scanbur A/S* gewährleistet. C57BL/6J Mäuse wurden von *Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich* bezogen. Es wurden männliche Mäuse zwischen 6 und 10 Wochen Alter verwendet.

7.18 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mithilfe von *Prism für Mac OS X Version 7.0c*, *GraphPad Software*. Die Datenpunkte zeigen einen Mittelwert (*engl. Mean*) einer Gruppengröße von n mit Standardabweichung (*engl. standard deviation, SD*) an. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Die Signifikanzen sind angegeben als ns nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Plasmidkarten von (A) pEntr-CMV-GOL, (B) pEntr-TTR-GOL und (C) pEntr-CMV-GiRO	14
Abb. 2: Haptotropismus der adenoviralen Infektion	15
Abb. 3: Korrelation zwischen Infektionsdosis und Biolumineszenz	16
Abb. 4: Einfluss der Antigenexpression auf die Viruseliminierung	16
Abb. 5: Verantwortliche Zellpopulationen für die Eliminierung einer akut selbst-limitierten Ad-CMV-GOL Infektion	17
Abb. 6: Charakterisierung der akut selbst-limitierten und chronischen Ad-CMV-GOL bzw. Ad-TTR-GOL Infektion	19
Abb. 7: CD8 T-Zell-Aktivierung nach akut selbst-limitierter und chronischer Leberinfektion .	20
Abb. 8: Expansion von Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen nach adenoviraler Leberinfektion	21
Abb. 9: Phänotyp von Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen nach adenoviraler Leberinfektion	24
Abb. 10: Ko-Expression von Aktivierungs- und Erschöpfungs-Markern auf Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nach adenoviraler Leberinfektion	25
Abb. 11: Re-Stimulation von Leber-assoziierten Lymphozyten nach adenoviraler Leberinfektion	25
Abb. 12: Einfluss von funktioneller Aktivierung von CD8 T-Zellen auf eine chronischen Ad-TTR-GOL Infektion	27
Abb. 13: CD8 T-Zell-Antwort nach funktioneller CD8 T-Zell-Aktivierung während chronischer Ad-TTR-GOL Infektion	28
Abb. 14: Einfluss zytotoxischer CD8 T-Zellen auf eine chronische Ad-TTR-GOL Infektion ..	29
Abb. 15: Eliminierung von primären murinen Hepatozyten nach adenoviraler Infektion und Antigenbeladung	30
Abb. 16: Plasmidkarten von (A) pEntr-HBV1.3 und (B) pEntr-HBV-Luc	31
Abb. 17: Eliminierung des Ad-HBV-Luc in Abhängigkeit der Infektionsdosis	32
Abb. 18: Gegenüberstellung einer akut selbst-limitierten und chronischen Ad-HBV-Luc Infektion	32

Abb. 19: Rolle der CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und NK1.1 Zellen während Eliminierung einer akut selbst-limitierten Ad-HBV-Luc Infektion	33
Abb. 20: Immunhistochemische Analyse der Leber nach einer akut selbst-limitierten vs. chronischen Ad-HBV-Luc Infektion	34
Abb. 21: Quantifizierung und Phänotypisierung der anti-viralen CD8 T-Zell-Antwort gegen eine Ad-HBV-Luc Infektion	36
Abb. 22: Korrelation der Transkriptionsfaktoren Tcf-1 und TOX und der Expression von PD-I und Granzym B	38
Abb. 23: Zytotoxizität von Leber-assoziierten CD8 T-Zellen nach einer Ad-HBV-Luc Infektion	39

9. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Vektor
Ad	Adenovirus
APCs	<i>engl.</i> antigen presenting cells
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumin
cccDNA	<i>engl.</i> covalently closed circular DNA
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CD62L	L-Selectin
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CMV	Cytomegalovirus
CTLA-4	<i>engl.</i> cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC	<i>engl.</i> dendritic cell
DMEM	<i>engl.</i> Duplecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> desoxyribonucleic acid
eGFP	<i>engl.</i> enhanced green fluorescent protein
Eomes	Eomesodermin
FCS	<i>engl.</i> fetal calf serum
G, eGFP	<i>engl.</i> enhanced green fluorescent protein
HBc/HBcore	Hepatitis B Core Protein
HBeAg	HBV e-Antigen
HBeAg	Hepatitis B Envelope Antigen
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEK293-Zellen	<i>engl.</i> human embryonic kidney cells 293
HLA	humanes Leukozyten-Antigenen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulinen
IL	Interleukin
iR, iRFP720	Infrarot-fluoreszierendes Protein 720
KLRG-1	<i>engl.</i> killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
L, Luc	Luziferase
LAG-3	<i>engl.</i> lymphocyte-activation gene 3
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LSECs	<i>engl.</i> liver sinusoidal endothelial cells

MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex
MOI	<i>engl.</i> multiplicity of infection
MUP	<i>engl.</i> mouse major urinary protein
NK (T)-Zelle	Natürliche Killer-(T)-Zelle
NTCP	<i>engl.</i> sodium taurocholate cotransporting polypeptide
O	Ovalbumin
ORF	<i>engl.</i> open reading frame
p	Photonen
PBS	<i>engl.</i> phosphate-buffered saline
PD-1	<i>engl.</i> programmed cell death protein 1
pfu	<i>engl.</i> plaque forming unit
pgRNA	pregenomische RNA
TOX	<i>engl.</i> Thymocyte selection-associated high mobility group box
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
qPCR	<i>engl.</i> quantitative polymerase chain reaction
rcDNA	<i>engl.</i> relaxed circular DNA
RIG-I	<i>engl.</i> retinoic acid inducible gene I
s	Sekunde
(s)ALT	(Serum-)Alanin-Aminotransferase
SPF	spezifisch Pathogen-frei
T-bet	<i>engl.</i> T-box expressed in T cells
Tcf-1	<i>engl.</i> T-cell factor 1
TGF- β	<i>engl.</i> tumor growth factor β
TIGIT	T-Zell-Immun-Rezeptor mit Ig und ITIM Domänen
Tim-3	<i>engl.</i> T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TNF	Tumornekrosefaktor
TOX	<i>engl.</i> thymocyte selection associated high mobility group box
TRAIL	<i>engl.</i> Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tregs	regulatorische T-Zellen
TTR	Transthyretin
WHO	<i>engl.</i> World Health Organization

10. Veröffentlichungen

Publikationen:

Manske K, Kallin N, König V, Schneider A, Kurz S, Bosch M, Welz M, Cheng RL, Bengsch B, Steiger K, Protzer U, Thimme R, Knolle PA, Wohlleber D. (2018): „*Outcome of antiviral Immunity in the Liver is shaped by the Level of Antigen expressed in infected Hepatocytes*“. *Hepatology*. 68(6), 2089-2105.

Welz M, Eickhoff S, Abdullah Z, Trebicka J, Gartlan KH, Spicer JA, Demetris AJ, Akhlaghi H, Anton M, **Manske K**, Zehn D, Nieswandt B, Kurts C, Trapani JA, Knolle P, Wohlleber D, Kastenmüller W. (2018): „*Perforin inhibition protects from lethal endothelial damage during fulminant viral hepatitis*“. *Nat Commun*. 9(1):4805.

Schneider A, Kurz S, **Manske K**, Janas M, Heikenwälder M, Misgeld T, Aichler M, Weissmann SF, Zischka H, Knolle P, Wohlleber D. (2019): „*Single organelle analysis to characterize mitochondrial function and crosstalk during viral infection*“. *Sci Rep*. 9(1):8492.

O'Connor T, Zhou X, Kosla J, Adili A, Garcia Beccaria M, Kotsiliti E, Pfister D, Johlke AL, Sinha A, Sankowski R, Schick M, Lewis R, Dokalis N, Seubert B, Höchst B, Inverso D, Heide D, Zhang W, Wehrich P, **Manske K**, Wohlleber D, Anton M, Hoellein A, Seleznik G, Bremer J, Bleul S, Augustin HG, Scherer F, Koedel U, Weber A, Protzer U, Förster R, Wirth T, Aguzzi A, Meissner F, Prinz M, Baumann B, Höpken UE, Knolle PA, von Baumgarten L, Keller U, Heikenwalder M. (2019): „*Age-related gliosis promotes central nervous system lymphoma through CCL19-mediated tumor cell retention*“. *Cancer Cell*. 36(3):250-26.

Vorträge an öffentlichen Tagungen:

Manske K, Schneider A, Anton M, Schmelas C, Grimm D, Ko C, Kurz S, Steiger K, Protzer U, Knolle P, Wohlleber D. „*Modulation of viral antigen expression during chronic hepatitis B facilitates control of HBV infection in mice*“. International HBV Meeting, 2019, Melbourne, Australien.

Manske K, Steiger K, Knolle P, Wohlleber D. „*Caspase-dependent and independent hepatocyte death for control of viral infection and tissue damage in the liver*“. Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGFI), 2016, Hamburg, Deutschland.

Poster-Präsentationen an öffentlichen Tagungen:

Manske K, Schneider A, Ko C, Steiger K, Protzer U, Knolle A, Wohlleber D. „*Real-time monitoring of HBV-infection in mice revealed antigen level depended outcome of acute and chronic liver infection*“. German Association of the Study of the Liver (GASL), **2019**, Heidelberg, Deutschland.

Manske K, Kallin N, Schneider A, König V, Bosch M, Bengsch B, Steiger K, Thimme R, Knolle P, Wohlleber D. „*Outcome of anti-viral immunity in the liver is shaped by the level of antigen expressed in infected hepatocytes*“. Global Hepatitis Summit (GHS), **2018**, Toronto, Kanada.

Manske K, Kallin N, Bosch M, Bengsch B, Steiger K, Thimme R, Knolle P, Wohlleber D. „*Outcome of anti-viral immunity in the liver is shaped by the level of antigen expressed in infected hepatocytes*“. The International Liver Congress (EASL), **2018**, Paris, Frankreich.

Manske K, Kallin N, Bosch M, Steiger K, Knolle P, Wohlleber D. „*Adenoviral infection with hepatocyte-restricted antigen expression leads to virus persistence*“. German Association of the Study of the Liver (GASL), **2018**, Hamburg, Deutschland.

Manske K, Böttlinger N, Bosch M, Steiger K, Knolle P, Wohlleber D. „*Viral infection with hepatocyte-restricted antigen expression leads to failure of the immune response to mount protection and consequent persistent infection*“. International HBV Meeting, **2017**, Washington DC, USA.

Manske K, Böttlinger N, Bosch M, Steiger K, Knolle P, Wohlleber D. „*Adenoviral infection with hepatocyte-restricted antigen expression leads to persistent infection*“. Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGFI), **2017**, Erlangen, Deutschland.

11. Literaturverzeichnis

1. WHO. *Hepatitis B fact sheet*. 2019 [18.07.2019 20.3.20]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
2. Lemoine, M., et al., *Acceptability and feasibility of a screen-and-treat programme for hepatitis B virus infection in The Gambia: the Prevention of Liver Fibrosis and Cancer in Africa (PROLIFICA) study*. *Lancet Glob Health*, 2016. **4**(8): p. e559-67.
3. Shankar, H., et al., *A Novel Collaborative Community-Based Hepatitis B Screening and Linkage to Care Program for African Immigrants*. *Clin Infect Dis*, 2016. **62 Suppl 4**: p. S289-97.
4. Chisari, F.V., M. Isogawa, and S.F. Wieland, *Pathogenesis of hepatitis B virus infection*. *Pathologie-biologie*, 2010. **58**(4): p. 258-66.
5. Invernizzi, P., *Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ*. *J Autoimmun*, 2013. **46**: p. 1-6.
6. Bogdanos, D.P., B. Gao, and M.E. Gershwin, *Liver immunology*. *Compr Physiol*, 2013. **3**(2): p. 567-98.
7. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*. *Hepatology*, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S54-62.
8. Protzer, U., M.K. Maini, and P.A. Knolle, *Living in the liver: hepatic infections*. *Nature reviews. Immunology*, 2012. **12**(3): p. 201-13.
9. Knolle, P.A. and R. Thimme, *Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(5): p. 1193-207.
10. Gao, B., W.I. Jeong, and Z. Tian, *Liver: An organ with predominant innate immunity*. *Hepatology*, 2008. **47**(2): p. 729-36.
11. Jacob, A.I., et al., *Endotoxin and bacteria in portal blood*. *Gastroenterology*, 1977. **72**(6): p. 1268-70.
12. Bissell, D.M., et al., *Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation*. *The Journal of clinical investigation*, 1995. **96**(1): p. 447-55.

13. Knolle, P., et al., *Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge*. J Hepatol, 1995. **22**(2): p. 226-9.
14. Ito, H., et al., *Ability of IDO to attenuate liver injury in alpha-galactosylceramide-induced hepatitis model*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4554-60.
15. Das, A., et al., *Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 2111-24.
16. Kruse, N., et al., *Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25low forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2009. **50**(6): p. 1904-13.
17. Schurich, A., et al., *Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells*. Hepatology (Baltimore, Md), 2009. **50**(3): p. 909-19.
18. Limmer, A., et al., *Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance*. Nature medicine, 2000. **6**(12): p. 1348-54.
19. Doherty, D.G. and C. O'Farrelly, *Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 5-20.
20. Gershwin, M.E., Vierling, J. M., Manns, M. P., *Liver Immunology: Principles and Practice*. 2007: Humana. 501.
21. Maini, M.K., et al., *Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1386-96.
22. Thimme, R., et al., *Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15661-8.
23. Bajenoff, M., S. Granjeaud, and S. Guerder, *The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 715-24.
24. Barinov, A., et al., *CD4/CD8/Dendritic cell complexes in the spleen: CD8+ T cells can directly bind CD4+ T cells and modulate their response*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0180644.

25. Murata, Y., et al., *Intrahepatic Cross-Presentation and Hepatocellular Antigen Presentation Play Distinct Roles in the Induction of Hepatitis B Virus-Specific CD8(+) T Cell Responses*. J Virol, 2018. **92**(21).
26. Benechet, A.P., et al., *Dynamics and genomic landscape of CD8(+) T cells undergoing hepatic priming*. Nature, 2019. **574**(7777): p. 200-205.
27. Bertolino, P., M.C. Trescol-Biemont, and C. Rabourdin-Combe, *Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival*. European journal of immunology, 1998. **28**(1): p. 221-36.
28. Bertolino, P., et al., *Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5430-8.
29. Knolle, P.A., *The liver's imprint on CD8(+) T cell priming*. J Hepatol, 2012. **57**(4): p. 718-9.
30. Holz, L.E., et al., *Intrahepatic murine CD8 T-cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death*. Gastroenterology, 2008. **135**(3): p. 989-97.
31. Benseler, V., et al., *Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011.
32. Horst, A.K., et al., *Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells*. Cell Mol Immunol, 2016. **13**(3): p. 277-92.
33. Wong, Y.C., et al., *Immune outcomes in the liver: Is CD8 T cell fate determined by the environment?* J Hepatol, 2015. **63**(4): p. 1005-14.
34. Tay, S.S., et al., *Antigen expression level threshold tunes the fate of CD8 T cells during primary hepatic immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(25): p. E2540-9.
35. Jung, K., et al., *Protective role of V-set and immunoglobulin domain-containing 4 expressed on kupffer cells during immune-mediated liver injury by inducing tolerance of liver T- and natural killer T-cells*. Hepatology, 2012. **56**(5): p. 1838-48.
36. You, Q., et al., *Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells*. Hepatology, 2008. **48**(3): p. 978-90.

37. Robson, N.C., et al., *Dendritic cell maturation enhances CD8+ T-cell responses to exogenous antigen via a proteasome-independent mechanism of major histocompatibility complex class I loading*. Immunology, 2003. **109**(3): p. 374-83.
38. Bottcher, J.P., et al., *Liver-primed memory T cells generated under noninflammatory conditions provide anti-infectious immunity*. Cell Rep, 2013. **3**(3): p. 779-95.
39. Zhang, S., H. Zhang, and J. Zhao, *The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **384**(4): p. 405-8.
40. Veiga-Parga, T., S. Sehrawat, and B.T. Rouse, *Role of regulatory T cells during virus infection*. Immunol Rev, 2013. **255**(1): p. 182-96.
41. McLane, L.M., M.S. Abdel-Hakeem, and E.J. Wherry, *CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer*. Annu Rev Immunol, 2019. **37**: p. 457-495.
42. Ng, C.T., et al., *Networking at the level of host immunity: immune cell interactions during persistent viral infections*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(6): p. 652-64.
43. Joosten, S.A., et al., *Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8029-34.
44. Peppas, D., et al., *Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion*. J Exp Med, 2013. **210**(1): p. 99-114.
45. Guidotti, L.G., et al., *Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection*. Science, 1999. **284**(5415): p. 825-9.
46. Thimme, R., et al., *CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection*. J Virol, 2003. **77**(1): p. 68-76.
47. Ando, K., et al., *Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3245-53.
48. Wohlleber, D., et al., *TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation*. Cell Rep, 2012. **2**(3): p. 478-87.
49. Bucks, C.M., et al., *Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8+ T cell exhaustion*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6697-708.

50. Mueller, S.N. and R. Ahmed, *High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(21): p. 8623-8.
51. Alfei, F., et al., *TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection*. Nature, 2019. **571**(7764): p. 265-269.
52. Utzschneider, D.T., et al., *T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8(+) T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections*. Immunity, 2016. **45**(2): p. 415-27.
53. Khan, O., et al., *TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion*. Nature, 2019. **571**(7764): p. 211-218.
54. Fuller, M.J. and A.J. Zajac, *Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 477-86.
55. Wherry, E.J., et al., *Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4911-27.
56. Fuller, M.J., et al., *Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4204-14.
57. Agnellini, P., et al., *Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8+ T cell functions during chronic viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4565-70.
58. Mackerness, K.J., et al., *Pronounced virus-dependent activation drives exhaustion but sustains IFN-gamma transcript levels*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3643-51.
59. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2205-13.
60. Brooks, D.G., D.B. McGavern, and M.B. Oldstone, *Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1675-85.
61. Angelosanto, J.M., et al., *Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection*. J Virol, 2012. **86**(15): p. 8161-70.
62. Tan, A., S. Koh, and A. Bertolotti, *Immune Response in Hepatitis B Virus Infection*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(8): p. a021428.

63. Rehermann, B. and M. Nascimbeni, *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 215-29.
64. Dunn, C., et al., *Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection*. Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1289-300.
65. Stacey, A.R., et al., *Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3719-33.
66. Wieland, S., et al., *Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6669-74.
67. Fletcher, S.P., et al., *Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 820-30.
68. Peppas, D., et al., *Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection*. PLoS Pathog, 2010. **6**(12): p. e1001227.
69. Zhang, Z., et al., *Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 73-85.
70. Tan, A.T., et al., *Reduction of HBV replication prolongs the early immunological response to IFNalpha therapy*. J Hepatol, 2014. **60**(1): p. 54-61.
71. Micco, L., et al., *Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B*. J Hepatol, 2013. **58**(2): p. 225-33.
72. Isogawa, M., Y. Furuichi, and F.V. Chisari, *Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 53-63.
73. Boni, C., et al., *Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 4215-25.
74. Lopes, A.R., et al., *Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1835-45.
75. Rehermann, B., *Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells*. Nat Med, 2013. **19**(7): p. 859-68.

76. Schurich, A., et al., *Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-Prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection*. Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1494-503.
77. Fisicaro, P., et al., *Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 682-93, 693 e1-4.
78. Maini, M.K., et al., *The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection*. J Exp Med, 2000. **191**(8): p. 1269-80.
79. Zhang, J.Y., et al., *Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 81-91.
80. Yang, G., et al., *Association of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B*. Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 133-40.
81. Xu, D., et al., *Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 739-47.
82. Billerbeck, E., et al., *Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3006-11.
83. Asabe, S., et al., *The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection*. J Virol, 2009. **83**(19): p. 9652-62.
84. Bertoletti, A. and C. Ferrari, *Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection*. Hepatology, 2003. **38**(1): p. 4-13.
85. Wieland, S.F. and F.V. Chisari, *Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9369-80.
86. Alberti, A., et al., *Detection of a new antibody system reacting with Dane particles in hepatitis B virus infection*. Br Med J, 1978. **2**(6144): p. 1056-8.
87. Chisari, F.V., M. Isogawa, and S.F. Wieland, *Pathogenesis of hepatitis B virus infection*. Pathol Biol (Paris), 2010. **58**(4): p. 258-66.

88. Linnemann, C.C., Jr., L.W. Kramer, and P.A. Askey, *Familial clustering of hepatitis B infections in gorillas*. *Am J Epidemiol*, 1984. **119**(3): p. 424-30.
89. Warren, K.S., et al., *A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (Pongo pygmaeus)*. *J Virol*, 1999. **73**(9): p. 7860-5.
90. Zuckerman, A.J., et al., *Hepatitis B outbreak among chimpanzees at the London Zoo*. *Lancet*, 1978. **2**(8091): p. 652-4.
91. Bancroft, W.H., et al., *Transmission of hepatitis B virus to gibbons by exposure to human saliva containing hepatitis B surface antigen*. *J Infect Dis*, 1977. **135**(1): p. 79-85.
92. Dupinay, T., et al., *Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among Macaca fascicularis from Mauritius Island*. *Hepatology*, 2013. **58**(5): p. 1610-20.
93. Peeridogaheh, H., et al., *Current concepts on immunopathogenesis of hepatitis B virus infection*. *Virus Res*, 2018. **245**: p. 29-43.
94. WHO, *Global hepatitis report*. 2017.
95. Gehring, A.J. and U. Protzer, *Targeting Innate and Adaptive Immune Responses to Cure Chronic HBV Infection*. *Gastroenterology*, 2019. **156**(2): p. 325-337.
96. WHO, *Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection*, in *Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection*. 2015: Geneva.
97. Grossi, G., et al., *Hepatitis B virus long-term impact of antiviral therapy nucleot(s)ide analogues (NUCs)*. *Liver Int*, 2017. **37 Suppl 1**: p. 45-51.
98. Lucifora, J. and U. Protzer, *Attacking hepatitis B virus cccDNA--The holy grail to hepatitis B cure*. *J Hepatol*, 2016. **64**(1 Suppl): p. S41-S48.
99. Bock, C.T., et al., *Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome*. *J Mol Biol*, 2001. **307**(1): p. 183-96.
100. Yan, H., et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*. *Elife*, 2012. **3**.

101. Tu, T., et al., *Hepatitis B Virus DNA Integration Occurs Early in the Viral Life Cycle in an In Vitro Infection Model via Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide-Dependent Uptake of Enveloped Virus Particles*. J Virol, 2018. **92**(11).
102. Seeger, C. and W.S. Mason, *Molecular biology of hepatitis B virus infection*. Virology, 2015. **479-480**: p. 672-86.
103. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet, 1970. **1**(7649): p. 695-8.
104. Robinson, W.S. and R.L. Greenman, *DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate*. J Virol, 1974. **13**(6): p. 1231-6.
105. Bayer, M.E., B.S. Blumberg, and B. Werner, *Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis*. Nature, 1968. **218**(5146): p. 1057-9.
106. Kramvis, A., *Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus*. Intervirology, 2014. **57**(3-4): p. 141-50.
107. Chen, M.T., et al., *A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14913-8.
108. Ganem, D. and A.M. Prince, *Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences*. N Engl J Med, 2004. **350**(11): p. 1118-29.
109. Prince, A.M., et al., *A case/control study of the association between primary liver cancer and hepatitis B infection in Senegal*. Int J Cancer, 1975. **16**(3): p. 376-83.
110. Beasley, R.P., et al., *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan*. Lancet, 1981. **2**(8256): p. 1129-33.
111. Purcell, R.H. and J.L. Gerin, *Hepatitis B subunit vaccine: a preliminary report of safety and efficacy tests in chimpanzees*. Am J Med Sci, 1975. **270**(2): p. 395-9.
112. Buynak, E.B., et al., *Vaccine against human hepatitis B*. JAMA, 1976. **235**(26): p. 2832-4.
113. Jones, S.A. and J. Hu, *Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention*. Emerg Microbes Infect, 2013. **2**(9): p. e56.

114. Lucifora, J., et al., *Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection*. J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 996-1003.
115. Slagle, B.L. and M.J. Bouchard, *Hepatitis B Virus X and Regulation of Viral Gene Expression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(3): p. a021402.
116. Kagi, D., et al., *Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 31-7.
117. Doherty, P.C. and R.M. Zinkernagel, *H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus*. J Exp Med, 1975. **141**(2): p. 502-7.
118. Bocharov, G., J. Argilaguet, and A. Meyerhans, *Understanding Experimental LCMV Infection of Mice: The Role of Mathematical Models*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 739706.
119. Zehn, D. and E.J. Wherry, *Immune Memory and Exhaustion: Clinically Relevant Lessons from the LCMV Model*. Adv Exp Med Biol, 2015. **850**: p. 137-52.
120. Buchmeier, M.J., et al., *The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection*. Adv Immunol, 1980. **30**: p. 275-331.
121. Zinkernagel, R.M., *Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **263**: p. 1-5.
122. Woopen, C., et al., *Immunological tolerance to LCMV antigens differently affects control of acute and chronic virus infection in mice*. Eur J Immunol, 2018. **48**(1): p. 120-127.
123. Althaus, C.L., V.V. Ganusov, and R.J. De Boer, *Dynamics of CD8+ T cell responses during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection*. J Immunol, 2007. **179**(5): p. 2944-51.
124. Ahmed, R., et al., *Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence*. J Exp Med, 1984. **160**(2): p. 521-40.
125. Wilson, E.B., et al., *Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection*. Science, 2013. **340**(6129): p. 202-7.

126. Teijaro, J.R., et al., *Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling*. Science, 2013. **340**(6129): p. 207-11.
127. Smelt, S.C., et al., *Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 448-57.
128. Sevilla, N., et al., *Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1249-60.
129. Ng, C.T., B.M. Sullivan, and M.B. Oldstone, *The role of dendritic cells in viral persistence*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(3): p. 160-6.
130. Belnoue, E., et al., *Protracted course of lymphocytic choriomeningitis virus WE infection in early life: induction but limited expansion of CD8+ effector T cells and absence of memory CD8+ T cells*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7338-50.
131. Koch, C., et al., *A comparison of the immunogenicity of the native and denatured forms of a protein*. APMIS, 1996. **104**(2): p. 115-25.
132. Derkow, K., et al., *Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis*. Hepatology, 2007. **46**(4): p. 1155-65.
133. Cebula, M., et al., *An inducible transgenic mouse model for immune mediated hepatitis showing clearance of antigen expressing hepatocytes by CD8+ T cells*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68720.
134. Bertholet, S., et al., *Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by Leishmania major-infected dendritic cells*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6620-8.
135. Welz, M., et al., *Perforin inhibition protects from lethal endothelial damage during fulminant viral hepatitis*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4805.
136. Yang, T.C., et al., *On the role of CD4+ T cells in the CD8+ T-cell response elicited by recombinant adenovirus vaccines*. Mol Ther, 2007. **15**(5): p. 997-1006.
137. Guidotti, L.G., et al., *High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6158-69.
138. Iannacone, M. and L.G. Guidotti, *Mouse Models of Hepatitis B Virus Pathogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(11).

139. Julander, J.G., et al., *Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus*. Antiviral Res, 2003. **59**(3): p. 155-61.
140. Weber, O., et al., *Inhibition of human hepatitis B virus (HBV) by a novel non-nucleosidic compound in a transgenic mouse model*. Antiviral Res, 2002. **54**(2): p. 69-78.
141. Protzer, U., *Viral hepatitis: The bumpy road to animal models for HBV infection*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(6): p. 327-328.
142. Dandri, M. and M. Lutgehetmann, *Mouse models of hepatitis B and delta virus infection*. J Immunol Methods, 2014. **410**: p. 39-49.
143. Grompe, M. and S. Strom, *Mice with human livers*. Gastroenterology, 2013. **145**(6): p. 1209-14.
144. Dandri, M., et al., *Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus*. Hepatology, 2001. **33**(4): p. 981-8.
145. Azuma, H., et al., *Robust expansion of human hepatocytes in Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} mice*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(8): p. 903-10.
146. Kosaka, K., et al., *A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(1): p. 230-5.
147. Guidotti, L.G., et al., *Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells*. Cell, 2015. **161**(3): p. 486-500.
148. Wisskirchen, K., et al., *T cell receptor grafting allows virological control of Hepatitis B virus infection*. J Clin Invest, 2019. **129**(7): p. 2932-2945.
149. Riedl, P., et al., *Elimination of immunodominant epitopes from multispecific DNA-based vaccines allows induction of CD8 T cells that have a striking antiviral potential*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 370-80.
150. Guidotti, L.G., et al., *Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 5469-75.
151. Chisari, F.V., *Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **206**: p. 149-73.
152. Isogawa, M., et al., *CD40 activation rescues antiviral CD8(+) T cells from PD-1-mediated exhaustion*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003490.

153. Yang, P.L., et al., *Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13825-30.
154. Huang, L.R., et al., *Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice*. Gastroenterology, 2012. **142**(7): p. 1447-50 e3.
155. Yokoo, T., et al., *Liver-targeted hydrodynamic gene therapy: Recent advances in the technique*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(40): p. 8862-8868.
156. Wu, Y., et al., *The dynamic impact of hydrodynamic gene transfer on the immune system*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(6): p. 8540-50.
157. Lempp, F.A., et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes*. Hepatology, 2017. **66**(3): p. 703-716.
158. Lucifora, J., et al., *Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector*. Antiviral Res, 2017. **145**: p. 14-19.
159. Michler, T., et al., *Knockdown of Virus Antigen Expression Increases Therapeutic Vaccine Efficacy in High-titer HBV Carrier Mice*. Gastroenterology, 2020.
160. Sprinzl, M.F., et al., *Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier*. J Virol, 2001. **75**(11): p. 5108-18.
161. Saha, B. and R.J. Parks, *Human adenovirus type 5 vectors deleted of early region 1 (E1) undergo limited expression of early replicative E2 proteins and DNA replication in non-permissive cells*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0181012.
162. Kovetski, I. and S.J. Hedley, *Adenoviral producer cells*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1681-703.
163. von Freyend, M.J., et al., *Sequential control of hepatitis B virus in a mouse model of acute, self-resolving hepatitis B*. Journal of viral hepatitis, 2011. **18**(3): p. 216-26.
164. Waddington, S.N., et al., *Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer*. Cell, 2008. **132**(3): p. 397-409.
165. Schulze, A., et al., *Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus*. Hepatology, 2012. **55**(2): p. 373-83.

166. Dandri, M. and J. Petersen, *Mechanism of Hepatitis B Virus Persistence in Hepatocytes and Its Carcinogenic Potential*. Clin Infect Dis, 2016. **62 Suppl 4**: p. S281-8.
167. Dusseaux, M., et al., *Viral Load Affects the Immune Response to HBV in Mice With Humanized Immune System and Liver*. Gastroenterology, 2017. **153**(6): p. 1647-1661 e9.
168. Li, H.J., et al., *The Role of Immune Cells in Chronic HBV Infection*. J Clin Transl Hepatol, 2015. **3**(4): p. 277-83.
169. Bauer, T., M. Sprinzl, and U. Protzer, *Immune control of hepatitis B virus*. Dig Dis, 2011. **29**(4): p. 423-33.
170. Zheng, M., et al., *NK Cells Help Induce Anti-Hepatitis B Virus CD8+ T Cell Immunity in Mice*. J Immunol, 2016. **196**(10): p. 4122-31.
171. Eickhoff, S., et al., *Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions*. Cell, 2015. **162**(6): p. 1322-37.
172. Bertoletti, A. and C. Ferrari, *Adaptive immunity in HBV infection*. J Hepatol, 2016. **64**(1 Suppl): p. S71-S83.
173. Attanasio, J. and E.J. Wherry, *Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1052-68.
174. Tauriainen, J., et al., *Perturbed CD8(+) T cell TIGIT/CD226/PVR axis despite early initiation of antiretroviral treatment in HIV infected individuals*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 40354.
175. Germar, K., et al., *T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(50): p. 20060-5.
176. Jadhav, R.R., et al., *Epigenetic signature of PD-1+ TCF1+ CD8 T cells that act as resource cells during chronic viral infection and respond to PD-1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(28): p. 14113-14118.
177. Chen, Z., et al., *TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision*. Immunity, 2019. **51**(5): p. 840-855 e5.
178. Ahn, E., et al., *Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(18): p. 4749-4754.

179. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
180. Blank, C.U., et al., *Defining 'T cell exhaustion'*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(11): p. 665-674.
181. Im, S.J., et al., *Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy*. Nature, 2016. **537**(7620): p. 417-421.
182. Wu, T., et al., *The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness*. Sci Immunol, 2016. **1**(6).
183. Jenne, C.N. and P. Kubes, *Immune surveillance by the liver*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 996-1006.
184. Protzer, U., M.K. Maini, and P.A. Knolle, *Living in the liver: hepatic infections*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 201-13.
185. Gehring, A.J., et al., *Mobilizing monocytes to cross-present circulating viral antigen in chronic infection*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3766-76.
186. Stabenow, D., et al., *Bioluminescence imaging allows measuring CD8 T cell function in the liver*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1430-7.
187. Sprent, J. and C.D. Surh, *T cell memory*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 551-79.
188. Chen, M., et al., *Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 3016-27.
189. Bertolino, P., M.C. Trescol-Biemont, and C. Roubourdin-Combe, *Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 221-36.
190. Morimoto, J., et al., *Induction of tolerance in CD8+ T cells to a transgenic autoantigen expressed in the liver does not require cross-presentation*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6849-60.
191. Bowen, D.G., et al., *The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity*. J Clin Invest, 2004. **114**(5): p. 701-12.
192. Obar, J.J., K.M. Khanna, and L. Lefrancois, *Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 859-69.

193. Jenkins, M.K. and J.J. Moon, *The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude*. J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4135-40.
194. Robinson, A., C. Meredith, and B.M. Austen, *Isolation and properties of the signal region from ovalbumin*. FEBS Lett, 1986. **203**(2): p. 243-6.
195. Meek, R.L., K.A. Walsh, and R.D. Palmiter, *The signal sequence of ovalbumin is located near the NH2 terminus*. J Biol Chem, 1982. **257**(20): p. 12245-51.
196. Vega-Ramos, J., et al., *Inflammation conditions mature dendritic cells to retain the capacity to present new antigens but with altered cytokine secretion function*. J Immunol, 2014. **193**(8): p. 3851-9.
197. Kamath, A.T., et al., *Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1734-41.
198. Redmond, W.L. and L.A. Sherman, *Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 275-84.
199. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
200. Zhang, N. and M.J. Bevan, *CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 161-8.
201. Gehring, A.J., et al., *The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function*. J Virol, 2007. **81**(6): p. 2940-9.
202. Manz, B.N., et al., *T-cell triggering thresholds are modulated by the number of antigen within individual T-cell receptor clusters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9089-94.
203. Boulanger, D.S.M., et al., *A Mechanistic Model for Predicting Cell Surface Presentation of Competing Peptides by MHC Class I Molecules*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1538.
204. Wherry, E.J., et al., *The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3735-45.
205. Kawashima, K., et al., *Type I Interferon Signaling Prevents Hepatitis B Virus-Specific T Cell Responses by Reducing Antigen Expression*. J Virol, 2018. **92**(23).

206. Schuch, A., et al., *Phenotypic and functional differences of HBV core-specific versus HBV polymerase-specific CD8+ T cells in chronically HBV-infected patients with low viral load*. Gut, 2019. **68**(5): p. 905-915.
207. Webster, G.J., et al., *Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5707-19.
208. Martinez, G.J., et al., *The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells*. Immunity, 2015. **42**(2): p. 265-278.
209. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
210. Utzschneider, D.T., et al., *High antigen levels induce an exhausted phenotype in a chronic infection without impairing T cell expansion and survival*. J Exp Med, 2016. **213**(9): p. 1819-34.
211. Ochel, A., et al., *Effective intrahepatic CD8+ T-cell immune responses are induced by low but not high numbers of antigen-expressing hepatocytes*. Cell Mol Immunol, 2016. **13**(6): p. 805-815.
212. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(8): p. 486-99.
213. Iloeje, U.H., et al., *Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 678-86.
214. Jin, Y., W.K. Shih, and I. Berkower, *Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen*. J Exp Med, 1988. **168**(1): p. 293-306.
215. Liu, X., et al., *PD-1(+) TIGIT(+) CD8(+) T cells are associated with pathogenesis and progression of patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2019. **68**(12): p. 2041-2054.
216. Bengsch, B., B. Martin, and R. Thimme, *Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation*. J Hepatol, 2014. **61**(6): p. 1212-9.

217. Wieland, D., et al., *TCF1(+) hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15050.
218. Sen, D.R., et al., *The epigenetic landscape of T cell exhaustion*. *Science*, 2016. **354**(6316): p. 1165-1169.
219. WHO. *Influenza (Seasonal) fact sheet*. 2018 6.11.2018 20.3.20]; Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
220. Bertoni, R., et al., *Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(3): p. 503-13.
221. Wuensch, S.A., J. Spahn, and I.N. Crispe, *Direct, help-independent priming of CD8+ T cells by adeno-associated virus-transduced hepatocytes*. *Hepatology*, 2010. **52**(3): p. 1068-77.
222. Kakimi, K., et al., *Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo*. *J Exp Med*, 2000. **192**(7): p. 921-30.
223. Baron, J.L., et al., *Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection*. *Immunity*, 2002. **16**(4): p. 583-94.
224. Fried, M.W., et al., *HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *Hepatology*, 2008. **47**(2): p. 428-34.
225. Gao, Y.H., et al., *On-treatment quantitative hepatitis B e antigen predicted response to nucleos(t)ide analogues in chronic hepatitis B*. *World J Hepatol*, 2016. **8**(34): p. 1511-1520.

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die meine Doktorarbeit ermöglicht und zum Erfolg des Promotionsprojektes beigetragen haben.

In erster Linie geht mein Dank an Prof. Dr. Percy A. Knolle, der mir die Gelegenheit gab, zunächst im Rahmen eines studentischen Forschungspraktikum im Bereich der Immunologie einzusteigen und mir darüber hinaus ermöglichte, sowohl meine Masterarbeit als auch die Doktorarbeit am Institut für molekulare Immunologie und experimentelle Onkologie anzufertigen. Vielen Dank für den Rückhalt und fachliche Unterstützung!

In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Dietmar Zehn, der als Zweitprüfer sich Zeit für Zwischenevaluationen meines Projekts genommen hat und mit hilfreichen Ideen und Denkansätzen zur Seite stand.

Mein größter Dank geht an Dr. Dirk Wohlleber, der mich in allen Projekten am Institut für molekulare Immunologie und experimentelle Onkologie unterstützt und betreut hat. Vielen Dank für das Mentoring, die Motivation und Geduld! Dabei bedanke ich mich auch für die Möglichkeit, interessante und gut organisierte Projekte bearbeitet haben zu dürfen.

Ich freue mich, im Rahmen des Promotionsprojekts im SFB TRR179 eingebunden gewesen zu sein. Dies gab mir die Möglichkeit, mich besser im Feld der viralen Hepatitis zu entwickeln. Im Rahmen der SFB TRR179 Graduiertenschule bedanke ich mich bei Prof. Dr. Robert Thimme, der sich Zeit für Diskussion meiner Daten nahm und Ansichten aus einem anderen Blickwinkel ermöglichte.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen Kollegen Annika Schneider, Verena König, Sandra Lampl, Marianne Janas, Nina Kallin, Miriam Bosch, Silke Hegenbarth und Savvoula Michailidou, die mich im Labor unterstützt haben und eine gute Zusammenarbeit ermöglichten. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Martina Anton und Katja Dumler, die für mich hilfreiche Ansprechpartner bei der Generierung von adenoviralen Vektoren waren.

Ich danke Prof. Dr. Ulrike Protzer, Theresa Asen und Natalie Röder vom Institut für Virologie für die technische Unterstützung bei der HBeAg-Messung.

Ich danke ebenfalls Dr. Tanja Bauer, Dr. Nina Körber, Martin Feuerherd und Christoph Richter vom Institut für Virologie für die Bereitstellung des Durchflusszytometers *LSRFortessa*TM, *BD Biosciences* und Hilfestellungen bei der Nutzung.

Vielen Dank auch an Dr. Katja Steiger, Olga Seelbach, Marion Mielke und Anne Jacob vom Institut für Pathologie für die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen und Aufnahmen von Lebergewebe.