



Technische Universität München
Institut für molekulare Immunologie und experimentelle Onkologie

Einfluss von Leberschaden auf die Qualität der antiviralen Immunantwort in der Leber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation

Verena König

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Andreas Pichlmair

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Prof. Dr. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 02.12.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 10.03.2020 angenommen.

Zusammenfassung

Ein Merkmal chronischer Infektionen der Leber ist das Auftreten von Leberschaden. Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Leberschaden auf die Qualität der Virus-spezifischen CD8 T-Zell Antwort und somit auf den Infektionsverlauf. Es wurde ein *in vivo* Modellsystem genutzt, welches aus einem rekombinanten Adenovirus besteht, genutzt. Dieses Virus exprimiert die Transgene GFP¹ (G), Ovalbumin (O) und Luziferase (L) unter einem Cytomegalievirus (CMV)-Promotor (Ad-CMV-GOL). Bei Ovalbumin handelt es sich um ein Modellantigen, welches die Charakterisierung der Virus-spezifischen CD8 T-Zell Antwort ermöglicht. GFP und Luziferase sind Reporterproteine, welche im gleichen stöchiometrischen Verhältnis zu Ovalbumin exprimiert werden und somit ein Monitoring des Infektionsverlaufs ermöglichen. Infektion mit einer niedrigen Dosis (10^7 IU/Maus) des Ad-CMV-GOL Virus nahm einen akut-selbstlimitierenden Verlauf, während Infektion mit einer hohen Dosis (10^9 IU/Maus) desselben Virus einen chronischen Verlauf zeigte. Eine Eliminierung der hepatischen Infektion ging mit CD8 T-Zell-vermitteltem Leberschaden zwischen Tag 7 und 10 nach Infektion einher, während Leberschaden nach hoher Infektionsdosis bereits nach 3 bis 5 Tagen und unabhängig von CD8 T-Zellen auftrat. Die Beobachtung deutet darauf hin, dass Leberschaden zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion die nachfolgende CD8 T-Zell-vermittelte Immunantwort abschwächt. Durch Anwendung eines zweiten *in vivo* Modellsystems wurde gezielt Leberschaden induziert. Dieses Modellsystem besteht aus einem rekombinanten Adenovirus, welcher die Transgene GFP (G), Diphtherietoxin-Rezeptor (D) und Luziferase (L) unter einem CMV-Promotor exprimiert (Ad-CMV-GDL). Die Induktion von Leberschaden durch Applikation von Diphtherietoxin (DTX) schwächte die Ovalbumin-spezifische CD8 T-Zell-vermittelte Immunantwort ab, indem es einen Verlust von T-Zell-Rezeptoren (TZR) auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen hervorrief. Dieser Prozess trat nur in CD8 T-Zellen auf, die ihr spezifisches Antigen in der Leber erkannten. Da die Eliminierung viraler Infektionen zwangsläufig mit Leberschaden einhergeht, liefert die vorliegende Arbeit Grund zur Annahme, dass eine bisher unbekannt negative Rückkopplungsschleife, durch Abschalten von CD8 T-Zellen, zur Gewebeprotektion und gleichzeitig zur Entwicklung einer chronischen Infektion in der Leber beiträgt.

¹ engl.: Green fluorescent protein

Zusammenfassung

CD8 T-Zell-vermittelter Leberschaden (Akut-selbstlimitierende Infektion)	Nicht CD8 T-Zell-vermittelter Leberschaden in früher Phase der Infektion (Chronische Infektion)
<p>Große Anzahl von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hohe H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit • Normale CD3ζ Expression 	<p>Fehlen von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Keine H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit • Verminderte CD3ζ Expression • Leber-spezifischer Effekt
<p>Transiente Hochregulation der Expression von ko-inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 und LAG-3</p>	<p>Durchgehend hohe Expression von ko-inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 und LAG-3</p>
<p>TZR-Stimulation führt zu Produktion der Effektor-Zytokine IFNγ und TNF</p>	<p>Keine Produktion von Effektor-Zytokinen IFNγ und TNF nach TZR-Stimulation</p>
<p>Effizientes <i>in vitro</i> Killing möglich</p>	<p>Kein <i>in vitro</i> Killing möglich → eingeschränkte Zytotoxizität</p> <p>Fähigkeit zum <i>in vitro</i> Killing wird nach ex vivo Kultivierung innerhalb von 12h wiedererlangt</p>

Übersicht der wichtigsten Ergebnisse.

Abstract

Chronic liver infections are associated with high antigen levels and chronic liver damage. Here, we investigate the impact of liver damage on virus-specific CD8 T cell responses and consequently on the outcome of an immune response against viral infection of the liver. To study the dynamics of interaction between virus, hepatocytes and immune cells in the liver, we exploit an *in vivo* infection model consisting of an hepatotropic adenovirus encoding for the transgenes GFP, ovalbumin and luciferase under the ubiquitous CMV-promoter (Ad-CMV-GOL). Ovalbumin allows characterization of the ovalbumin-specific CD8 T cell response, whereas GFP and luciferase are reporter proteins directly correlating with the amount of expressed ovalbumin. We observe that low infectious doses of Ad-CMV-GOL (10^7 IU/mouse) were cleared within 10-14 days p.i., whereas high infectious doses (10^9 IU/mouse) lead to persistent infection. Clearance of low-dose Ad-CMV-GOL infection is associated with CD8 T cell-mediated sALT increase between day 7-10 p.i. In contrast, during high-dose Ad-CMV-GOL infection liver damage occurred already from day 3-5 p.i. and no further CD8 T cell-mediated sALT peak was observed at day 7-10 p.i. Early liver damage was CD8 T cell-independent indicating involvement of innate immune effector mechanisms, and suggesting that early liver damage abrogated CD8 T cell immunity. We confirmed this notion by using a recombinant adenovirus coding for diphtheriatoxin-receptor (DTR) (Ad-CMV-GDL). Liver damage induction upon diphtheriatoxin (DTX) application abrogated CD8 T cell-mediated immunity against low-dose Ad-CMV-GOL. At the cellular level, we found that adoptively transferred ovalbumin-specific CD8 T cells, identified by a congenic marker, almost completely lost T cell receptor (TCR) surface expression. This TCR-loss occurred only upon antigen-encounter in the liver and was not observed in OT-1 T cells residing in the spleen, demonstrating a liver-specific regulation of T cell immunity in the context of liver damage. Clearly, this effect was not related to insufficient T cell (cross)priming, since *in vitro* generated effector CD8 T cells that were adoptively transferred showed similar TCR-loss. Since protective CD8 T cell immunity clearing virally infected hepatocytes from the liver is necessarily associated with liver damage, our findings may reveal a negative regulatory feed-back loop with tissue-protective properties where CD8 T cell-induced liver damage impairs further antiviral CD8 T cell immunity – which in consequence would result in persistent infection and chronic liver damage.

Abstract

CD8 T cell-mediated liver damage controlling infection	Early liver damage preventing CD8 T cell-mediated control of infection
<p>High number of TCRs on virus-specific CD8 T cells</p> <ul style="list-style-type: none"> • High H-2K^b/SIINFEKL dextramer binding capacity • Normal CD3ζ expression 	<p>Lack of TCRs on virus-specific CD8 T cells</p> <ul style="list-style-type: none"> • No H-2K^b/SIINFEKL dextramer binding capacity • Reduced CD3ζ expression • Liver-specific effect
<p>Transient upregulation of co-inhibitory receptors like PD-1 and LAG-3</p>	<p>Continuously high expression of co-inhibitory receptors like PD-1 and LAG-3</p>
<p>Production IFNγ und TNF upon TCR stimulation</p>	<p>No production of IFNγ und TNF upon TCR stimulation</p>
<p>Efficient <i>in vitro</i> killing</p>	<p>No <i>in vitro</i> killing → reduced cytotoxicity</p> <p>Regain of <i>in vitro</i> killing capacity after overnight <i>ex vivo</i> culture</p>

Overview of key data.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kritische Balance von Immunaktivierung und Immuntoleranz in der Leber	1
1.2	Virale Hepatitis.....	3
1.3	Immunantwort gegenüber viralen Infektionen	3
1.3.1	Angeborene (innate) Immunantwort	3
1.3.2	Erworbene (adaptive) Immunantwort.....	5
1.4	Zelltod in der Leber	6
1.4.1	Nekrose.....	9
1.4.2	Apoptose.....	9
1.4.3	Programmierte Nekrose – Nekroptose und Pyroptose	10
1.5	Einfluss von Zelltod auf die Qualität einer Immunantwort.....	11
1.5.1	Immunogener Zelltod	12
1.5.2	Tolerogener Zelltod	13
2	Ziel der Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material.....	16
3.1.1	Geräte.....	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	17
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	19
3.1.4	Puffer und Medien	21
3.1.4.1	Allgemeine Puffer.....	21
3.1.4.2	Puffer für die Produktion rekombinanter Adenoviren.....	22
3.1.4.3	Puffer für die Isolation primärer muriner Hepatozyten	23
3.1.4.4	Medien für die Kultivierung von Zelllinien und primärer Zellen	25
3.1.5	Kits	26
3.1.6	Antikörper.....	27

3.1.6.1	FACS-Antikörper	27
3.1.6.2	Dextramere	29
3.1.6.3	In vivo Depletions-Antikörper.....	29
3.1.6.4	Beads und Antikörper für immunomagnetische Aufreinigung	29
3.1.6.5	Immunhistologie.....	30
3.1.6.6	Titration rekombinanter Adenoviren.....	30
3.1.7	Primer	30
3.1.8	Enzyme	30
3.1.9	Kompetente E.coli Stämme	31
3.1.10	Expressionsplasmide	31
3.1.11	Zytokine und andere rekombinante Proteine.....	31
3.1.12	Mauslinien	32
3.1.13	Zelllinien.....	32
3.1.14	Rekombinante Adenoviren.....	32
3.1.15	Software.....	33
3.2	Methoden.....	34
3.2.1	Produktion rekombinanter Adenoviren	34
3.2.1.1	Virusvermehrung	34
3.2.1.2	Ultrazentrifugation.....	34
3.2.1.3	Dialyse	34
3.2.1.4	Titration rekombinanter Adenoviren.....	35
3.2.2	Intravenöse Injektionen	35
3.2.2.1	Adoptiver Transfer naiver OT-I CD8 T-Zellen.....	35
3.2.2.2	Adenovirale Infektion.....	35
3.2.2.3	Antikörper-vermittelte Depletion von CD8 T-Zellen.....	35
3.2.3	Intraperitoneale Injektionen.....	36
3.2.3.1	Antikörper-vermittelte Depletion von NK-Zellen.....	36

3.2.4	Adenovirus-Infektion <i>in vivo</i>	36
3.2.5	Diphtherietoxin-induzierter Leberschaden <i>in vivo</i>	37
3.2.6	Blutentnahme und Bestimmung der ALT Werte im Blutserum.....	37
3.2.7	<i>In vivo</i> Biolumineszenz-Messung.....	37
3.2.8	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	38
3.2.9	Isolation primärer Zellpopulationen aus Leber und Milz.....	39
3.2.9.1	Aufreinigung muriner Lymphozyten aus der Leber	39
3.2.9.2	Aufreinigung muriner Lymphozyten aus der Milz.....	40
3.2.9.3	Isolation und Kultivierung primärer muriner Hepatozyten	40
3.2.10	Immunomagnetische Aufreinigung von CD45.1 ⁺ OT-I CD8 T-Zellen.....	41
3.2.11	<i>Ex vivo</i> Restimulation von OT-I CD8 T-Zellen	42
3.2.12	<i>Ex vivo</i> Generierung von CD8 Effektorzellen (CTLs).....	42
3.2.13	Impedanz-basierte Messung der Zellviabilität in Echtzeit	43
3.2.14	Durchflusszytometrische Analyse	43
3.2.14.1	Färbung von Oberflächenmolekülen	44
3.2.14.2	Dextramer-Färbung	44
3.2.14.3	Intrazelluläre Färbung zytoplasmatischer Proteine	44
3.2.15	Immunhistologie.....	45
3.2.16	Statistik	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	<i>In vivo</i> Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von Zelltod auf die Qualität der antiviralen Immunantwort in der Leber.....	46
4.2	Fehlende Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten nach hoher adenoviraler Infektionsdosis.....	47
4.3	Detektion von Leberschaden in früher Phase nach hoher adenoviraler Infektionsdosis.....	50
4.4	Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis zeigt zweiphasige Dynamik	52

4.5	Hinweise auf innate Immunaktivierung in früher Phase nach hoher adenoviraler Infektionsdosis.....	54
4.6	Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis geht mit einer Abnahme der Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher.....	56
4.7	Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis geht mit phänotypischen Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher.....	58
4.8	Quantitative und phänotypische Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen aus geschädigtem Lebergewebe korrelieren mit Dysfunktionalität	61
4.9	Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis geht mit Verlust von T-Zell-Rezeptoren von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen einher.....	63
4.10	Leberschaden-induzierter Verlust von T-Zell-Rezeptoren nur nach Antigenerkennung in der Leber.....	65
4.11	Verlust von T-Zell-Rezeptoren korreliert mit verminderter Zytotoxizität Virus-spezifischer CD8 T-Zellen.....	67
4.12	<i>In vivo</i> Modellsystem für die gezielte Induktion von Leberschaden mittels Diphtherietoxin.....	69
4.13	Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel induziert einen Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen.....	70
4.14	Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel geht mit einer Abnahme der Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher	71
4.15	Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel induziert einen Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen.....	72
4.16	Verlust von T-Zell-Rezeptoren nach gezielter Induktion von Leberschaden nur nach Antigenerkennung in der Leber	73
4.17	Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel geht mit phänotypischen Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher.....	75
4.18	Leberschaden-induzierter Verlust von T-Zell-Rezeptoren betrifft auch CD8 Effektorzellen	76
4.19	Expression von T-Zell-Rezeptoren ist unabhängig vom Vorhandensein von L-Arginin <i>in vitro</i>	79

5	Diskussion	83
5.1	Zelltod als Ursache für die Abschaltung der antiviralen CD8 T-Zell Antwort in der Leber.....	83
5.2	Mechanismen der Leberschaden-vermittelten Immunregulation.....	91
5.3	Klinische Relevanz der Leberschaden-vermittelten Immunregulation	93
6	Anhang	95
6.1	Literaturverzeichnis	95
6.2	Abbildungsverzeichnis	107
6.3	Tabellenverzeichnis	110
6.4	Abkürzungsverzeichnis	111
6.5	Vorveröffentlichungen.....	115
7	Danksagung	116

1 Einleitung

1.1 Kritische Balance von Immunaktivierung und Immuntoleranz in der Leber

Die Leber ist das größte Organ innerhalb des Körpers und verfügt über eine duale Blutversorgung. Einerseits gelangt sauerstoffreiches Blut über die Leberarterie vom Herzen zur Leber (30%). Andererseits gelangt Blut, welches Sauerstoff und zahlreiche Nährstoffe aus dem Dünndarm enthält, über die Pfortader zur Leber (70%). Das Blut verlässt die Leber über die Lebervenen, welche es zur unteren Hohlvene transportieren (Trefts, Gannon, & Wasserman, 2017). Aufgrund ihrer anatomischen Lage ist die Leber im physiologischen Zustand zahlreichen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP²) ausgesetzt. Sie spielt eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel des Körpers und zu ihren wichtigsten Aufgaben zählt der Metabolismus und die Entgiftung toxischer Abbauprodukte. Eine weniger bekannte Funktion der Leber ist die eines lymphatischen Organs, welches die Induktion von Immuntoleranz gegenüber der Induktion von Immunaktivierung begünstigt. Dies verhindert übermäßigen Leberschaden durch eine inadäquate Reaktion gegenüber Antigenen, welche die Leber über die Pfortader aus dem Dünndarm erreichen (Protzer, Maini, & Knolle, 2012). Das tolerogene Milieu der Leber kennzeichnet sich vor allem durch die Expression von Liganden für ko-inhibitorische Rezeptoren wie PD-1 (Iwai, Terawaki, Ikegawa, Okazaki, & Honjo, 2003) und durch die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-10 (P. Knolle et al., 1995) und TGF- β^3 (Silvie et al., 2003) (Sturm et al., 2006) durch bestimmte Leberzellpopulationen. Auch das Vorhandensein des Enzyms Arginase, welches für den Abbau der Aminosäure L-Arginin verantwortlich ist (Das et al., 2008), hat einen negativ regulatorischen Einfluss auf CD8 T-Zellen. Des Weiteren beeinflussen besondere Leberendothelzellen (LSEC⁴) die Qualität des CD8 T-Zell *Priming* in der Leber. LSEC sind eine einzigartige Population leberresidenter, antigenpräsentierender Zellen, welche enorme Mengen an zirkulierendem Antigen aufnehmen können (Kruse et al., 2009). Dieses können sie an CD8 T-Zellen kreuzpräsentieren und nachfolgend werden weitere naive CD8 T-Zellen in die Leber gelockt (von Oppen et al., 2009). Naive T-Zellen, welche von LSEC *geprimed*

² engl.: Pathogen-associated molecular pattern

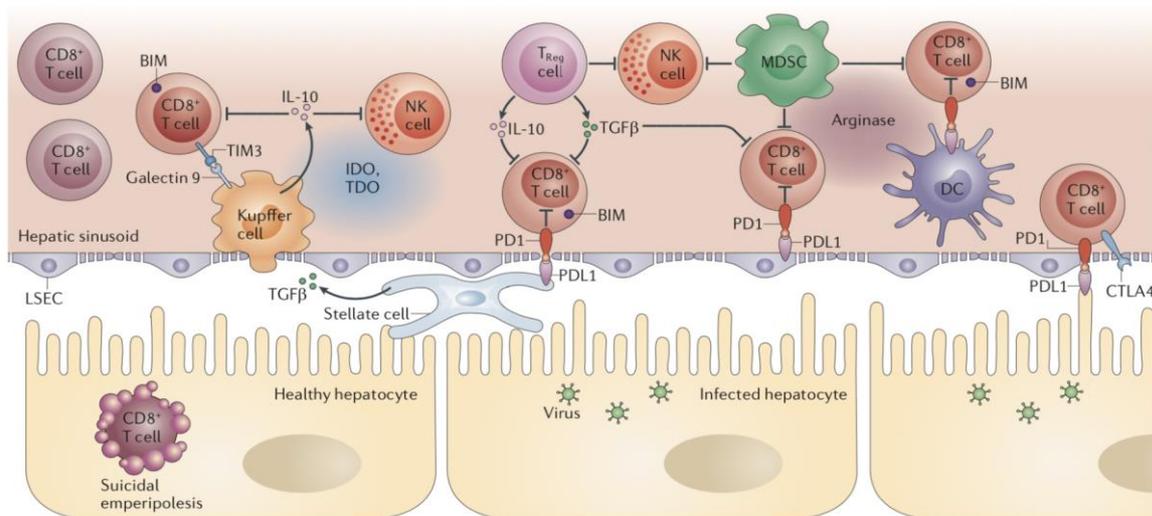
³ engl.: Transforming growth factor beta

⁴ engl.: Liver sinusoidal endothelial cells

Einleitung

werden, gehen jedoch in eine Art inaktiven Zustand über (Limmer et al., 2000), können aber *in vivo* für lange Zeit überleben und dann durch eine Kombination verschiedener kostimulatorischer Signale reaktiviert werden. Dies sind Eigenschaften, welche normalerweise für Gedächtniszellen charakteristisch sind (Bottcher et al., 2013). Im tolerogenen Milieu der Leber läuft auch der Prozess der suizidalen Emperipolese ab. Dabei werden autoreaktive CD8 T-Zellen von Hepatozyten aufgenommen und abgebaut (Benseler et al., 2011; P. A. Knolle & Thimme, 2014).

All diese Aspekte formen die kritische Balance von Immunaktivierung und Immuntoleranz in der Leber machen sie zu einer Zielscheibe für pathogene Mikroorganismen. Hier sind vor allem hepatotrope Viren, wie Hepatitis B und C (HBV und HCV), von großer Bedeutung (P. A. Knolle & Gerken, 2000). Über die genauen Mechanismen der leberspezifischen Immunüberwachung im Kontext von HBV und HCV Infektionen des Menschen ist bisher noch wenig bekannt.



Immunregulation in der Leber (Protzer et al., 2012).

1.2 Virale Hepatitis

Die Forschung im Bereich der viralen Hepatitis war lange Zeit auf HCV fixiert, was zur Zulassung einer Reihe von direkt antiviral wirkenden Medikamente (DAA⁵) geführt hat. Diese wirken gegen verschiedene Proteine von HCV und können dadurch die Vermehrung des Virus effektiv verhindern. Dadurch hat sich der Schwerpunkt der Forschung in diesem Bereich in den letzten Jahren von HCV auf HBV verlagert (Shah et al., 2018).

Mehr als 240 Millionen Menschen weltweit sind chronisch mit HBV infiziert (Rehermann & Nascimbeni, 2005). Die Infektion führt bei 95% der infizierten Erwachsenen zu einer akuten Leberentzündung (Hepatitis) und wird nachfolgend durch das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunaktivierung effektiv eliminiert. In 5% der Fälle kann die Infektion aber auch persistieren und, durch die Induktion von Immun-vermitteltem nekroinflammatorischem Zelltod in infizierten Hepatozyten, zur Entwicklung von chronischer Hepatitis, Leberzirrhose und Leberkrebs beitragen (Herzer, Sprinzl, & Galle, 2007).

1.3 Immunantwort gegenüber viralen Infektionen

Die Leistung des Immunsystems besteht darin einen Schutz vor Angriffen von „außen“ (Bakterien, Viren) und von „innen“ (entartete Zellen) zu vermitteln. Grundsätzlich wird das Immunsystem in ein angeborenes (innates) und erworbenes (adaptives) Immunsystem unterteilt. Die innate Immunantwort ist unspezifisch und ausreichend für die Bekämpfung eindringender Pathogene. Ist dies nicht der Fall, tritt die adaptive Immunantwort in Aktion. Diese richtet sich spezifisch gegen Antigene des eindringenden Erregers und führt letztendlich zur Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses.

1.3.1 Angeborene (innate) Immunantwort

Kurze Zeit nach dem Eindringen der Erreger werden diese durch das innate Immunsystem erkannt und effektiv eliminiert. Die angeborene Immunantwort wird hauptsächlich von

⁵ engl.: Direct acting antiviral

Einleitung

phagozytierenden und antigenpräsentierenden Zellen (APC⁶) wie zum Beispiel Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC⁷) vermittelt (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Dabei nutzen sie in der Regel Mustererkennungsrezeptoren (PRR⁸) um Wiederholungsmuster von molekularen Strukturen des eindringenden Erregers zu erkennen. Diese Strukturen bezeichnet man als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP). Sie befinden sich nur auf Mikroben und nicht auf Wirtszellen, was eine Unterscheidung von „fremd“ und „eigen“ möglich macht (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Nach Erkennung eines PAMP initiieren PRRs durch Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden eine pro-inflammatorische und antivirale Antwort (Akira & Takeda, 2004). Virus-vermittelte PRR-Aktivierung kann entweder zur Eliminierung der Infektion, oder zur Etablierung einer Mikroumgebung führen, welche die Entwicklung einer chronischen Infektion fördert. Im Kontext einer viralen Infektion werden virale Desoxiribonukleinsäure (DNS), Ribonukleinsäure (RNS) und Glykoproteine hauptsächlich von Toll-like Rezeptoren (TLR⁹) erkannt. Zusätzlich kann virale RNS über RIG¹⁰-I/MDA¹¹-5 erkannt werden. (Mogensen & Paludan, 2005). Im Kontext viraler Infektionen kommt es nachfolgend hauptsächlich zu einer rasch verlaufenden Immunantwort, welche auf Typ-I Interferonen (IFN α und IFN β) basiert (Kato et al., 2005). Typ-I Interferone haben antivirale Eigenschaften, welche eine Ausbreitung des Virus verhindern und zu einer gesteigerten Präsentation des intrazellulären Antigens an der Oberfläche der befallenen Zelle führen (Teijaro, 2016).

Methodische Einschränkungen begrenzen jedoch unser Wissen über die innate Immunantwort im Rahmen von hepatotropen Infektionen wie zum Beispiel einer HBV Infektion. Einerseits ist es oft schwierig zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion humanes Material zu erhalten, da die Patienten oft noch keine Symptome zeigen (Bertoletti, Maini, & Ferrari, 2010). Andererseits fehlt es an einem robusten *in vitro* Modellsystem für eine HBV Infektion (Hantz et al., 2009). Zusätzlich sind *in vivo* Modellsysteme für Hepadnavirus Infektionen aufwändig in der Handhabung und es stehen ihnen ethische Fragestellungen entgegen. Trotz dieser Umstände ist mittlerweile bekannt, dass es während einer HBV Infektion an einer robusten

⁶ engl.: Antigen presenting cell

⁷ engl.: Dendritic cells

⁸ engl.: Pattern recognition receptor

⁹ engl.: Toll-like receptor

¹⁰ engl.: Retinoic acid-inducible gene I

¹¹ engl.: Melanoma differentiation-associated gene 5

Einleitung

IFN α -vermittelten innate Immunantwort fehlt (S. Wieland, Thimme, Purcell, & Chisari, 2004). Die Ursache dafür ist aber noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Es existieren verschiedene Erklärungen dafür. Einerseits könnte es sein, dass HBV der angeborenen Immunerkennung entkommt (S. F. Wieland & Chisari, 2005), andererseits, dass HBV die angeborene Immunaktivierung aktiv unterdrückt (Ait-Goughoulte, Lucifora, Zoulim, & Durantel, 2010). Weiter Forschung auf diesem Gebiet ist von großer Bedeutung, damit die Eliminierung chronischer HBV Infektionen in Zukunft möglich wird.

1.3.2 Erworbene (adaptive) Immunantwort

Die Eliminierung viraler Infektionen erfordert ein komplexes Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunantwort. Die Zellen des angeborenen Immunsystems steuern die Aktivierung des erworbenen Immunsystems und locken dabei CD8 Effektorzellen zum Ort der Infektion. Die eigentliche adaptive Immunantwort wird dann von T- und B-Zellen vermittelt, welche klonal verteilte Rezeptoren für spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche tragen (Christensen & Thomsen, 2009). Diese bewegen sich kontinuierlich zwischen Blutstrom und lymphatischen Organen und scannen den ganzen Organismus nach eindringenden Erregern ab. Insbesondere CD8 T-Zellen sind bekanntermaßen für die Eliminierung viraler Infektionen in der Leber verantwortlich (Thimme et al., 2003). Wenn naive CD8 T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen auf ihr passendes Antigen treffen, werden sie aktiviert und differenzieren zu Zellen mit verschiedenen Effektorfunktionen aus. Anschließend wandern sie zum Ort der Infektion und eliminieren Virus-infizierte Zellen (P. A. Knolle & Thimme, 2014).

Eine Besonderheit der HBV Infektion ist, dass die T-Zell Antwort erst 4 bis 7 Wochen nach Infektion, wenn es zum exponentiellen Anstieg der HBV Replikation kommt, detektierbar wird (Fiscaro et al., 2009). CD4 T-Zellen produzieren effizient Zytokine und unterstützen dadurch eine effiziente CD8 T-Zell Antwort und die Antikörperproduktion durch B-Zellen. CD8 T-Zellen eliminieren anschließend HBV-infizierte Hepatozyten über zytolytische und nicht-zytolytische (IFN γ , TNF α ¹²) Effektormechanismen, was zur Reduktion der Menge von zirkulierendem Virus führt (Chisari, 1997) (Wohlleber et al., 2012). Die von B-Zellen

¹² engl.: Tumor necrosis factor alpha

Einleitung

produzierten Antikörper neutralisieren freigesetzte Viruspartikel und verhindern so eine Reinfektion (Alberti, Diana, Scular, Eddleston, & Williams, 1978).

Die HBV-spezifische T-Zell Antwort ist bei einem akut-selbstlimitierenden Infektionsverlauf deutlich stärker ausgeprägt als bei chronischem Infektionsverlauf (Rehermann & Nascimbeni, 2005) (Bertoletti et al., 2010). Es ist bekannt, dass hohe Antigenlevel während einer chronischen HBV Infektion zur Deletion und funktionellen Inaktivierung HBV-spezifischer CD8 T-Zellen führt. Diese exprimieren inhibitorische Moleküle, wie PD-1¹³, CTLA-4¹⁴, TIM-3¹⁵, LAG-3¹⁶ und sind nicht in der Lage zu proliferieren oder Zytokine zu produzieren (Boni et al., 2007) (Fisicaro et al., 2010) (Schurich et al., 2011). Zudem sind sie anfällig für Zelltod durch Apoptose (Lopes et al., 2008).

Vor allem im tolerogenen Milieu der Leber sind jedoch die Mechanismen, welche darüber entscheiden, ob eine virale Infektion erfolgreich eliminiert wird, oder sich zu einer chronischen Infektion entwickelt, noch nicht vollständig verstanden (Protzer et al., 2012).

1.4 Zelltod in der Leber

Hepatitis bezeichnet eine Entzündung der Leber, welche mit Leberschaden assoziiert ist. Die Ursachen für Leberschaden sind vielfältig und es ist nicht eindeutig, ob Entzündung oder Leberschaden zuerst auftritt. Infektionen mit Hepatitis Viren sind die häufigste Ursache für Leberschaden und Hepatitis, aber es kann auch durch toxische Substanzen wie Alkohol, Toxine und bestimmte Medikamente (DILI¹⁷) zu Leberschaden und daraus resultierender Hepatitis kommen. Toxischer Leberschaden kann durch Alkohol, das Schmerzmittel Acetaminophen, das Toxin Concanavalin A oder das Lösungsmittel Tetrachlormethan induziert werden. Diese Substanzen nehmen Einfluss auf die Genexpression und Homöostase in Hepatozyten und können so direkt Zelltod induzieren (Woolbright & Jaeschke, 2018). Direkte toxische Effekte auf Hepatozyten können aber auch nachfolgend eine Immunantwort

¹³ engl.: Programmed cell death protein 1

¹⁴ engl.: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

¹⁵ engl.: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3

¹⁶ engl.: Lymphocyte-activation gene-3

¹⁷ engl.: Drug-induced liver injury

Einleitung

induzieren und dadurch das Ausmaß von Leberschaden bestimmen. Toxischer Leberschaden lässt sich beseitigen, indem man die Exposition gegenüber dem toxischen Agens beendet.

Anders verhält es sich mit Immun-vermitteltem Leberschaden als Reaktion auf eine Infektion. Das innate und das adaptive Immunsystem sind beide am Immun-vermittelten Leberschaden beteiligt. Zuerst wird das innate Immunsystem aktiviert, welches dann die nachfolgende hochspezialisierte adaptive Immunantwort ermöglicht. In der Leber befindet sich eine Vielzahl innater Immunzellen, wie zum Beispiel Kupffer-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und DCs, welche die Rolle der Leber als immunologisches Organ definieren (Thomson & Knolle, 2010). Es ist allgemein akzeptiert, dass vor allem die adaptive zelluläre Immunantwort eine Schlüsselrolle in der HBV-assoziierten ACLF¹⁸ spielt. Dabei kommt es entweder zur direkt Elimination Virus-infizierter Hepatozyten über den Fas/FasL oder Perforin Signalweg, oder zur Eliminierung Virus-infizierter Zellen über IFN γ (Thimme et al., 2003) (Bertoletti, Maini, & Williams, 2003).

Leberzelltod zeigt sich durch den Nachweis erhöhter Alanin-Aminotransferase (sALT) und Aspartat-Aminotransferase (sAST) Level im Blutserum. Dabei handelt es sich um Enzyme, die normalerweise im Zytoplasma der Hepatozyten vorkommen und nur freigesetzt werden, wenn Leberzellen geschädigt werden. In der gesunden Leber wird die Homöostase durch das Absterben von Zellen kontrolliert. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Verlust und Erneuerung von Hepatozyten. Unter physiologischen Bedingungen werden durchgehend 0,05% der Hepatozyten durch Apoptose beseitigt. Dies führt zu kaum messbaren sALT Werten im Blutserum gesunder Menschen.

Gleichzeitig zeichnet sich die Leber aber auch durch eine enorme Kapazität zur Regeneration aus. Diese soll ein akutes Leberversagen durch den natürlicherweise vorhandenen Kontakt zu xenobiotischen und toxischen Substanzen verhindern (Michalopoulos & DeFrances, 2005). Heutzutage liegen dem Großteil der chronischen Lebererkrankungen virale Infektionen, nichtalkoholische Fettleber (NAFLD¹⁹) und alkoholische Fettleber (ALD²⁰) zu Grunde. Dabei wird Lebergewebe zunehmend durch Bindegewebe ersetzt und dies führt letztendlich zu Leberfibrose, Leberzirrhose und Leberkrebs (HCC²¹).

¹⁸ Engl.: Acute-on-chronic liver failure

¹⁹ engl.: Nonalcoholic fatty liver disease

²⁰ engl.: Alcoholic liver disease

²¹ engl.: Hepatocellular carcinoma

Einleitung

Die meisten akut und chronisch verlaufenden HBV und HCV Infektionen induzieren eine antivirale Immunantwort, die zum Zelltod Virus-infizierter Hepatozyten durch CD8 T-Zellen oder NK²²-Zellen führt. In chronisch infizierten Patienten ist die CD8 T-Zell Antwort häufig unzureichend und bestimmt dann im weiteren Verlauf das Ausmaß der Leberschädigung (Rehermann, 2013). CD8 T-Zell-induzierter Zelltod wird hauptsächlich durch Interaktion von Mitgliedern der TNFR²³-Superfamilie (TNFR1/2, FasR, TRAILR²⁴) auf infizierten Hepatozyten mit ihren Liganden auf CD8 T-Zellen und, in geringerem Ausmaß, durch Perforin- und Granzym B-enthaltenden Granula vermittelt (Chavez-Galan, Arenas-Del Angel, Zenteno, Chavez, & Lascrain, 2009). Die bereits beschriebenen Mechanismen des CD8 T-Zell-vermittelten Zelltodes erfordern den direkten Kontakt der zytotoxischen T-Zelle mit der infizierten Zelle (kanonische Effektorfunktion). Dabei werden spezifische virale Peptide von APCs auf MHC²⁵-I Molekülen den CD8 T-Zellen präsentiert und diese integrieren dann das Signal über den TZR (Bossi et al., 2002).

Zusätzlich ist ein Mechanismus des CD8 T-Zell-vermittelten Zelltodes beschrieben, der keinen direkten Kontakt von infizierter Zelle zur CTL benötigt (nicht-kanonische Effektorfunktion). Hierbei erkennen CD8 T-Zellen virales Antigen, das von LSEC kreuzpräsentiert wird. Nach Aktivierung schütten die Effektorzellen dann TNF aus, welches selektiv in infizierten Hepatozyten Zelltod induziert, während uninfizierte Hepatozyten geschützt sind (Wohlleber et al., 2012).

Zelltod tritt nicht nur unkontrolliert als Antwort auf zellulären Stress auf, sondern kann auch kontrolliert im Sinne eines programmierten Zelltodes (PCD²⁶) erfolgen. PCD wird aktiv und kontrolliert, durch Induktion bestimmter Signalkaskaden, induziert (Danial & Korsmeyer, 2004). Aktuelle Erkenntnisse in diesem Bereich der Forschung zeigen allerdings, dass es weitere Arten von Zelltod gibt, welche Mischformen darstellen und für die eine spezifische Nomenklatur notwendig ist (Linkermann & Green, 2014) (Galluzzi et al., 2018). Diese soll im Folgenden knapp erläutert werden. Eine tiefgehende Untersuchung verschiedener Formen von Zelltod ist jedoch nicht Teil dieser Arbeit.

²² engl.: Natural killer

²³ engl.: Tumor necrosis factor receptor

²⁴ engl.: Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor

²⁵ engl.: Major histocompatibility complex

²⁶ engl.: Programmed cell death

1.4.1 Nekrose

Die klassische Nekrose ist eine unkontrollierte, nicht-physiologische Form von Zelltod, welche durch chemische, physikalische oder mechanische Noxen ausgelöst wird. Der Begriff Nekrose stammt vom griechischen Wort *necros* ab, was so viel bedeutet wie „Leichnam“ (Hotchkiss, Strasser, McDunn, & Swanson, 2009). Adenosintriphosphat (ATP)-Mangel und ROS²⁷-Bildung führen zu einem Anschwellen der Zelle (Oncosis) und letztendlich zur Porenbildung in der Plasmamembran und nachfolgende Freisetzung der zellulären Bestandteile. Im Normalfall induzieren die freigesetzten Zellbestandteile in der Umgebung nekrotischer Zellen eine ausgedehnte Entzündungsreaktion (Festjens, Vanden Berghe, & Vandenabeele, 2006).

1.4.2 Apoptose

Im Gegensatz zur klassischen Nekrose, stellt die Apoptose eine hochkontrollierte, physiologische Form von Zelltod dar. Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie „Blätter, die von einem Baum fallen“ (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). Es handelt sich um einen ATP-verbrauchenden Prozess, welcher durch Bildung schollenartiger Membranausstülpungen, Schrumpfung der Zelle, DNS-Kondensation (Pyknosis) und Fragmentierung des Nukleus (Karyorrhesis) charakterisiert ist (Kerr et al., 1972) (Galluzzi et al., 2018). Man unterscheidet den extrinsischen Signalweg, der über Rezeptoren der TNF-Superfamilie induziert wird, von dem intrinsischen Signalweg, der durch intrazelluläre Mechanismen unter Beteiligung von Mitochondrien induziert wird. Ausgeführt werden diese Prozesse durch Caspasen. Dabei handelt es sich um Cystein-Proteasen, welche Proteine hinter spezifischen Aspartyl-Resten zerschneiden. Man unterscheidet die Initiator-Caspasen 8,10 und 9 von den Effektor-Caspasen 3, 6 und 7. Diese sind für die Bildung der apoptotischen Körperchen verantwortlich, welche anschließend schnell durch phagozytierende Zellen aufgenommen und anschließend abgebaut werden und somit keine Entzündungsreaktion auslösen können (Taylor, Cullen, & Martin, 2008).

²⁷ engl.: Reactive oxygen species

1.4.3 Programmierte Nekrose – Nekroptose und Pyroptose

Neben der Apoptose existieren weitere Formen des PCD. Dabei handelt es sich um verschiedene Formen der programmierten Nekrose, welche morphologisch zwar der klassischen Nekrose ähneln, aber, wie die Apoptose, nach einem programmierten Muster ablaufen (Galluzzi et al., 2018).

Der am besten charakterisierte Signalweg der Nekroptose ist der über TNFR-vermittelte Signalweg. Nach Bindung von TNF an TNFR1 kommt es, unter gleichzeitiger Inhibierung der Caspase 8, über RIPK1²⁸ und RIPK3²⁹ zur Zusammenlagerung des Nekrosom-Komplexes und zur Rekrutierung von MLKL³⁰ (Thapa et al., 2013). Es existieren Viren, die Strategien entwickelt haben, um Zelltod durch Nekroptose zu verhindern. So verfügt das MCMV³¹ über ein Genprodukt namens vIRA³², das an RIPK3 bindet und so Nekroptose verhindert (Upton & Chan, 2014) (Upton, Kaiser, & Mocarski, 2012). Zelltod durch Nekroptose wurde in zahlreichen pathologischen Zuständen der Niere, des Herzens, des Pankreas oder auch der Retina nachgewiesen. Über die Relevanz von Nekroptose in Lebererkrankungen gibt es zunehmend mehr Erkenntnisse. So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von Nekroptose (durch Nekrostatin-1) einen Schutz vor Concanavalin-A und Acetaminophen (APAP)-induzierter Hepatitis darstellt (An et al., 2013) (Jouan-Lanhouet et al., 2012) (Saeed & Jun, 2014).

Eine andere Form der programmierten Nekrose ist der Zelltod durch Pyroptose. Ursprünglich wurde die Pyroptose als eine auf Caspase-1 Aktivierung basierende Form der Apoptose in Makrophagen beschrieben. Mittlerweile weiß man, dass Pyroptose über das Inflammasom, welches sich aus einem Nod-ähnlichen Rezeptor, dem Adapter ASC³³ und Caspase-1 zusammensetzt, vermittelt wird. Caspase-1 führt anschließend zur proteolytischen Aktivierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 oder induziert Pyroptose (Rathinam, Vanaja, & Fitzgerald, 2012). Aktivierung des NLRP3³⁴ Inflammasoms wird mit

²⁸ engl.: Receptor interacting protein kinase 1

²⁹ engl.: Receptor interacting protein kinase 3

³⁰ engl.: Mixed lineage kinase domain-like

³¹ engl.: Murine cytomegalovirus

³² engl.: Viral inhibitor of RIPK activation

³³ engl.: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

³⁴ engl.: Nod-like receptor protein 3

Pyroptose von Hepatozyten, Hepatitis und Leberfibrose in Zusammenhang gebracht (Wree et al., 2014).

1.5 Einfluss von Zelltod auf die Qualität einer Immunantwort

Ursprünglich gab es zwei Hypothesen, die versuchen zu erklären, warum Zelltod unter bestimmten Bedingungen „still“ verläuft und unter anderen Bedingungen eine effektive Immunantwort auslöst.

Die erste Hypothese basiert auf der Theorie, dass die Erkennung von PAMPs das entscheidende Kriterium bei der Entscheidung für immunogenen oder tolerogenen Zelltod ist. Das würde bedeuten, dass Zelltod in der Abwesenheit von pathogenen immer tolerogen und in der Anwesenheit von Pathogenen immer immunogen verläuft. Da jedoch bekannt ist, dass zum Beispiel Tumorzellen, sobald sie absterben, eine starke Immunantwort gegen den Tumor induzieren, kann die Erkennung von PAMPs nicht das einzige Kriterium darstellen (Zitvogel et al., 2004). Daraufhin wurde das Konzept der Schaden-assoziierten molekularen Muster (DAMP³⁵) entwickelt. Dabei handelt es sich um Moleküle, welche aus Zellen, die gerade dabei sind zu sterben, freigesetzt werden und nachfolgend eine Immunantwort gegenüber zellulären Antigenen induzieren (Matzinger, 2002). Zu den DAMP zählen Proteine, welche auf der Oberfläche sterbender Zellen erscheinen (Calreticulin, HSP³⁶), Lipide, welche von der inneren Lipidschicht der Zellmembran in die äußere Lipidschicht übergehen (Phosphatidylserin), sowie andere Proteine (HMGB1³⁷), Nukleinsäureabbauprodukte, welche aus sterbenden Zellen freigesetzt werden (Shi, Evans, & Rock, 2003).

Die zweite Hypothese basiert auf der Annahme, dass verschiedene Zelltod Signalwege unterschiedlichen Einfluss auf die Qualität einer nachfolgenden Immunantwort nehmen. Das würde bedeuten, dass physiologischer Zelltod durch Apoptose immer tolerogen verläuft, während pathologischer Zelltod durch Nekrose immer immunogen verläuft (Thompson, 1995). Auch dieser Ansatz kann keine vollständige Erklärung dafür liefern wann Zelltod immunogen und wann er tolerogen verläuft (Casares et al., 2005).

³⁵ engl.: Damage-associated molecular pattern

³⁶ engl.: Heat shock protein

³⁷ engl.: High-mobility group box 1 protein

	Nekrose	Apoptose	Nekroptose	Pyroptose
Programmierter Zelltod	---	ja	ja	ja
Signalweg	---	Caspase 3/6/7	RIPK 1/3 MLKL	Inflammasom Caspase 1
Morphologie	Poren Anschwellen Platzen Ausstülpungen ohne Organelle	Schrumpfen Kondensation Ausstülpungen mit intakten Organellen	Platzen Ausstülpungen ohne Organelle	Poren Platzen Ausstülpungen ohne Organelle
Einfluss auf Immunsystem	Immunogen	Nicht immunogen	Immunogen	Immunogen

Tabelle 1: Formen von Zelltod in der Leber.

1.5.1 Immunogener Zelltod

Das Immunsystem ist sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch während einer Infektion toten Zellen ausgesetzt. Deshalb muss es über Mechanismen verfügen, welche zwischen verschiedenen Formen von Zelltod unterscheiden und so zur Eliminierung von Pathogenen beitragen, während sie autoaggressive Reaktionen verhindern.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die Einfluss darauf haben, ob Zelltod immunogen oder tolerogen verläuft. Um die Qualität der Immunantwort auf tote Zellen abschätzen zu können, müssen verschiedene Überlegungen angestellt werden: welche Art von Zelle stirbt, in welcher Mikroumgebung stirbt sie, auf welche Art und Weise stirbt sie und von welchen Zellen werden die toten Zellen gefressen (Green, Ferguson, Zitvogel, & Kroemer, 2009). Zum Beispiel induzieren nur aktivierte, aber nicht ruhende γ -bestrahlte PBMCs³⁸ DC Reifung und die Produktion inflammatorischer Zytokine durch DCs (Johansson, Walther-Jallow, Smed-Sorensen, & Spetz, 2007). Im Gegensatz dazu steht die Tatsache, dass

³⁸ engl.: Peripheral blood mononuclear cell

Einleitung

aktivierte CD4 T-Zellen, welche in AICD³⁹ gehen Toleranz induzieren, indem sie regulatorische CD8 T-Zellen stimulieren (Herndon, Stuart, & Ferguson, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Induktion von zellulärer Seneszenz in Leberkrebszellen die immun-vermittelte Tumoreliminierung stimuliert (Xue et al., 2007). Ebenso können bestimmte Eigenschaften sterbender Zellen Einfluss auf die nachfolgende Immunantwort nehmen. So weiß man, dass die Expression bestimmter DAMPs auf sterbenden Zellen deren Erkennung und Aufnahme durch DCs erleichtern und deren Immunogenität erhöhen kann (Spisek et al., 2007). Ebenso kann die Freisetzung von DAMPs phagozytierende Zellen anlocken und aktivieren (Hanley et al., 2004; Koizumi et al., 2007). DAMPs können aber auch direkt das Inflammasom in antigenpräsentierenden Zellen aktivieren und so die Produktion inflammatorischer Zytokine stimulieren (Martinon, Petrilli, Mayor, Tardivel, & Tschopp, 2006).

Wie bereits erwähnt, kann auch der involvierte Signalweg des Zelltodes Einfluss auf die Qualität der nachfolgenden Immunantwort haben. So konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Caspasen die Expression und Freisetzung von DAMPs beeinflusst und so die Immunogenität toter Zellen vermindert (Casares et al., 2005). Im Kontext viraler Infektionen wurde herausgefunden, dass die Caspase-abhängige Spaltung von Antigenen die Kreuzpräsentation der resultierenden Peptide erleichtert (Rawson et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in sterbenden Zellen die Aktivierung und Signalweiterleitung über RIPK1 und Nf- κ B⁴⁰ entscheidend für ein effektives *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen ist (Yatim et al., 2015).

1.5.2 Tolerogener Zelltod

Obwohl tote Zellen eine wirkungsvolle Immunantwort fördern können, ist bekannt, dass sie unter bestimmten Bedingungen bevorzugt Immuntoleranz induzieren. Dadurch soll eine unerwünschte Immunantwort gegenüber körpereigenen Proteinen verhindert werden. Es konnten zahlreiche Faktoren identifiziert werden, die die Induktion von Toleranz durch tote Zellen ermöglichen.

³⁹ engl.: Activation-induced cell death

⁴⁰ engl.: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Einleitung

So konnte gezeigt werden, dass DCs, welche apoptotische Zellen aufgenommen haben, Antigen nur an CD8 T-Zellen und nicht an CD4 T-Zellen präsentieren. Dadurch werden „hilflose“ CTLs generiert, die TRAIL produzieren, was zu ihrer Deletion führt und die weitere zelluläre Immunantwort verhindert (Griffith et al., 2007). Außerdem weiß man, dass die Eigenschaften der Mikroumgebung, in der tote Zellen auf Phagozyten treffen Einfluss darauf hat, ob es zu Immunaktivierung oder Immuntoleranz kommt. Die Milz ist zum Beispiel ein Organ, welches die Induktion von Toleranz begünstigt (Ferguson et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass tote Zellen dazu neigen sich in der Leber anzureichern (Huang, Soldevila, Leeker, Flavell, & Crispe, 1994). Die Leber ist ein Organ, welches die Induktion von Immuntoleranz unterstützt (Crispe et al., 2006). Auch die Rezeptoren, welche an der Erkennung und Aufnahme toter Zellen durch Phagozyten beteiligt sind, können die Qualität der dadurch ausgelösten Immunantwort mitbestimmen. Einige Autoimmunerkrankungen sind darauf zurückzuführen, dass die Aufnahme toter Zellen durch Phagozyten defekt ist (Gaipal et al., 2007) (Yamaguchi et al., 2010). Ein weiterer Mechanismus, welcher die Induktion von Toleranz durch tote Zellen erklären kann, ist die Freisetzung von immunsuppressiven Zytokinen. Apoptotische Zellen induzieren bei Kontakt zu Makrophagen die Freisetzung von anti-entzündlichen Zytokinen wie TGF- β und IL-10 (Chung et al., 2007) (Fadok et al., 1998). Grundsätzlich sind die Mechanismen, die unser Immunsystem nutzt, um mit toten Zellen umzugehen, sehr komplex und wurden im tolerogenen Milieu der Leber noch nicht tiefergehend untersucht. Das wäre vor dem Hintergrund wichtig, dass zum Beispiel chronische HBV Infektionen mit chronischem Leberschaden einhergehen. Eine bessere Kenntnis davon welchen Einfluss tote Zellen auf die Qualität der antiviralen Immunantwort in der Leber nehmen, kann den Weg für neue Immuntherapien in diesem Bereich ebnen oder einen Beitrag zur Optimierung bereits vorhandener Immuntherapien leisten

2 Ziel der Arbeit

Die Leber ist ein tolerogenes Organ, welches die Induktion von Immuntoleranz gegenüber der Induktion von Immunaktivierung begünstigt. Diese Tatsache begünstigt die Entwicklung chronischer Infektionen in der Leber. Auf molekularer Ebene werden Entzündungsreaktionen, als Reaktion auf Zelltod, durch die Erkennung von DAMPs durch PRRs initiiert. In den meisten Fällen führen Entzündungsreaktionen zu einer adaptiven Immunantwort, die nachfolgend weiteren Leberschaden auslöst und im Endeffekt die Eliminierung des Virus aus infizierten Zellen ermöglicht. Nichtsdestotrotz sind chronische Leberinfektionen mit chronischem Leberschaden assoziiert und in diesen Fällen scheint Leberschaden nicht mit der Eliminierung des Virus einherzugehen.

In der Leber wurde die Relevanz von toxischem und/oder Immun-vermitteltem Leberschaden auf die Qualität der antiviralen Immunantwort noch nicht systematisch untersucht. Deshalb sollen in der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe eines *in vivo* Modellsystems für eine akut-selbstlimitierende und chronische Infektion, folgende Aspekte untersucht werden:

1. Welche Auswirkungen hat Leberschaden auf den Verlauf viraler Leberinfektionen?
2. Welche Auswirkungen hat Leberschaden auf die Qualität der antiviralen Immunantwort?
3. Wie wird in Situationen von Leberschaden die Leberintegrität erhalten?

Die Erkenntnisse, welche durch die vorliegende Arbeit gewonnen werden, können dazu beitragen die Mikroumgebung der Leber besser zu verstehen und wie die tolerogenen Mechanismen zur Entwicklung chronischer viraler Leberinfektionen beitragen. Sie können somit einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze und/oder zur Optimierung der bereits verfügbaren immuntherapeutischen Therapien, wie die therapeutische Vakzinierung oder die T-Zell-basierten Therapien, leisten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Sartorius CP224S-OCE, CD2201	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Axio Imager 2 Forschungsmikroskop (S2)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axio Vert A1 Forschungsmikroskop (S1)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BioDrop μ LITE	Isogen Life Science, De Meern, Niederlande
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Corning LSE Vortex Mixer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einbettssystem EG1150 H	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Elektrophorese System Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	BioRad, Hercules, USA
Gelkammer	BioRad, Hercules, USA
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300 S	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Heraeus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Imaging System Chemi Doc [™] XRS+	BioRad, Hercules, USA
IVIS [®] 200 <i>in vivo</i> Biolumineszenz Messgerät	Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA
Laborwaage LSM2000	PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Lightcycler [®] 480 II	Roche, Basel Schweiz
Masterflex [®] Perfusionspumpe	Novodirekt, Kehl am Rhein, Deutschland
Paraffin Embedding System Cool Unit TBS88	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffinstreckbank	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
pH-Meter pH7110	Inolab, Weilheim, Deutschland
PowerPac [™] Basic Power Supply	BioRad, Hercules, USA
Reflotron [®] Plus System	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
SA3800 Spectral Cell Analyzer	SONY Biotechnology, Champaign, USA

Material und Methoden

SH800S Cell Sorter	SONY Biotechnology, Champaign, USA
SP6800 Spectral Cell Analyzer	SONY Biotechnology, Champaign, USA
Sterilwerkbank ThermoScientific Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermoschüttler MaxQ4000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ThermoScientific Megafuge 8 für Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge Heraeus Fresco17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultrazentrifuge Optima™ LE 8014	Beckman Coulter GmbH, Palo Alto, USA
Wasserbad TW8	Julabo, Seelbach, Deutschland
xCelligence RTCA	Acea Biosciences, San Diego, USA
Zählkammer (Neubauer-) 0,1mm 0,0025mm ²	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Capilette® for Reflotron, heparinisiert, 32µL	Selzer Labortechnik, Waghäusel, Deutschland
Cellstar® Röhrchen, natur, steril, konischer Boden <ul style="list-style-type: none"> • 15 mL • 50 mL 	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Cellstar® Zellkulturplatten, natur <ul style="list-style-type: none"> • 96-Well-Platte, V-förmiger Boden 	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Cellstar® Zellkulturplatten, natur, steril <ul style="list-style-type: none"> • 96-Well-Platte, F-förmiger Boden • 48-Well-Platte, F-förmiger Boden • 24-Well-Platte, F-förmiger Boden • 6-Well-Platte, F-förmiger Boden 	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Dialysekammer Slide-A-Lyzer® G2 10K MWCO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HSW Norm-Ject® TBC-Spritzen 1 mL – U 100	Servoprax, Wesel, Deutschland

Material und Methoden

Kanülen Sterican® <ul style="list-style-type: none"> • 0,9x40 mm G20 • 0,8x40 mm G21 • 0,45x25 mm G26 • 0,40x20 mm G27 	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße Eppis™ <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 mL • 1,5 mL • 2,0 mL 	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Omnican® 100 Insulinspritze (1 mL/100 I.U.)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Pasteur-Pipetten aus Glas, steril	neolab, Heidelberg, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Pipetten (Mess-) <ul style="list-style-type: none"> • 5 mL • 10 mL • 25 mL 	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen <ul style="list-style-type: none"> • 10 µL • 100 µL • 1000 µL 	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Reflotron® Teststreifen GOT (AST)	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Röhre, 5 mL, 75x12 mm, PS, für Durchflusszytometer geeignet	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan
Sterilfilter Aerodisc® 0,2 µm	Pall, Cornwall, UK
Titertube® Micro Test Tubes	Bio Rad, Hercules, USA
UZ-Röhrchen Ultra Clear® 14x89 mm	Beckmann Coulter, Palo Alto, USA
Vernichtungsbeutel, 200x300 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
xCelligence Zellkulturplatte	Acea Biosciences, San Diego, USA
Zellkulturflaschen mit Filterschraubkappe <ul style="list-style-type: none"> • 25 cm² • 75 cm² • 150 cm² 	COTECH Vertriebs GmbH, Berlin, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Acrylamid 4K Solution (30%) Mix 37, 5:1	AppliChem, Darmstadt
Agarose Ultrapure™	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Brefeldin A Lösung (1000x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
BSA (Rinderserumalbumin)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cäsiumchlorid (CsCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Cheluminate-HRP PicoDetect	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DAB+ Substrate Chromogen System	Dako/Agilent, Santa Clara, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO, C ₂ H ₆ OS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMEM	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA
EGTA (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut (C ₂ H ₄ O ₂)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
FCS (Fötale Kälberserum)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
GBSS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Glutamat (C ₅ H ₉ NO ₄)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HBSS	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
H ₂ O, PCR-grade	Roche, Basel, Schweiz
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ionomycin Calciumsalz (C ₄₁ H ₇₀ CaO ₉)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Isolfluran Forene®	AbbVie, Ludwigshafen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	GERBU, Gaiberg, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glutamin (L-), (200 mM)	GIBCO, Life technologies, Carlsbad, USA
Luziferin (D-)	PJK, Blitterdorf, Deutschland

Material und Methoden

Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Methanol (CH ₃ OH)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (Mager-)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl, 0,9%)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA, H(-OCH ₂) _n -OH)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbecco (w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PCR-Reaktions-Mix REDTaq [®] ReadyMix [™]	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin (10000 U/mL)/Streptomycin (10 mg/mL)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA
Percoll	GE Healthcare, Biosciences-AB, Uppsala, Schweden
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor Complete Mini EDTA-free	Roche, Basel, Schweiz
Proteingrößenstandard Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionspuffer Fast Digest Green Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI Glutamaxx	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SYBR [®] -Safe	Life Technologies, St. Louis, USA
TES (C ₆ H ₁₅ NO ₆ S)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED, C ₆ H ₁₂ N ₆)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	GERBU, Gaiberg, Deutschland
Tween-20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Williams Medium E	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

Material und Methoden

3.1.4 Puffer und Medien

3.1.4.1 Allgemeine Puffer

PBS (Fa. Biochrom) pH7,4

80 g/L	NaCl
0,2 g/L	KCl
1,44 g/L	NaHPO ₄ x 2H ₂ O
0,2 g/L	KH ₂ PO ₄

FACS-Puffer

	PBS (500 mL)
1% (v/v)	FCS
0,01%	Natriumazid

MACS-Puffer

	PBS (500 mL)
1% (v/v)	FCS
2 mM EDTA	

100% Percoll Stock-Lösung

90 mL	Percoll
10 mL	10x PBS (Sigma Aldrich)

40% Percoll-Lösung

20 mL	100% Percoll Stock-Lösung
ad 50 mL	PBS

Material und Methoden

50% Percoll-Lösung

25 mL	100% Percoll Stock-Lösung
ad 50 mL	Williams Medium E

80% Percoll-Lösung

40 mL	100% Percoll Stock-Lösung
ad 50 mL	PBS

3.1.4.2 Puffer für die Produktion rekombinanter Adenoviren

Viruspuffer

10 mM	Tris/HCl pH7,8
20 mM	MgCl ₂

CsCl-Puffer

50 mM	Tris/HCl pH7,8	
10 mM	MgCl ₂	
36,16 g/100 mL	CsCl	Dichte 1,25 g/mL
51,2 g/100 mL	CsCl	Dichte 1,40 g/mL
62 g/100 mL	CsCl	Dichte 1,34 g/mL

Dialysepuffer (10x)

300 g	Saccharose
87,7 g	NaCl
20,3 g	MgCl ₂
100 mL	1 M Tris/HCl pH7,8
ad 1000 mL	H ₂ O

Material und Methoden

3.1.4.3 Puffer für die Isolation primärer muriner Hepatozyten

Glucose-Lösung

9,9 g	Glucose x H ₂ O
ad 1000 mL	H ₂ O

Kohlenhydrat-Puffer (KH-Puffer)

60 g	NaCl
1,75 g	KCl
1,6 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 mL	H ₂ O
pH7,4	mit NaOH

HEPES-Puffer I

30 g	HEPES
ad 500 mL	H ₂ O
pH8,5	mit NaOH

HEPES-Puffer II

30 g	HEPES
ad 500 mL	H ₂ O
pH7,6	mit NaOH

EGTA-Lösung

2,375 g	EGTA
ad 50 mL	H ₂ O
NaOH zum Auflösen dazugeben	
pH7,6	mit HCl oder NaOH

Material und Methoden

CaCl₂ x 2H₂O Lösung

1,9 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
ad 100 mL	H ₂ O

MgSO₄ x 7H₂O Lösung

1,23 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
ad 50 mL	H ₂ O

MgCl₂ x 6H₂O Lösung

2,6 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
ad 100 mL	H ₂ O

EGTA-Puffer (primäre murine Hepatozyten)

124 mL	Glucose-Lösung
20 mL	KH-Puffer
20 mL	HEPES-Puffer I (pH8,5)
30 mL	Aminosäure-Lösung
0,479 mL	L-Glutamin (200 mM)
0,8 mL	EGTA-Lösung

Kollagenase-Puffer (primäre murine Hepatozyten)

77,5 mL	Glucose-Lösung
12,5 mL	KH-Puffer
12,5 mL	HEPES-Puffer I (pH8,5)
15 mL	Aminosäure-Lösung
1,9 mL	CaCl ₂ x 2H ₂ O Lösung
3,1 mL	MgCl ₂ x 6H ₂ O Lösung
0,3 mL	L-Glutamin (200 mM)
Frisch dazugeben: 45 mg Kollagenase NB 4G	

Material und Methoden

Suspensions-Puffer (primäre murine Hepatozyten)

124 mL	Glucose-Lösung
20 mL	KH-Puffer
20 mL	HEPES-Puffer II (pH8,5)
30 mL	Aminosäure-Lösung
0,479 mL	L-Glutamin (200 mM)
1,6 mL	CaCl ₂ x 2H ₂ O Lösung
0,8 mL	MgSO ₄ x 7H ₂ O Lösung
Frisch dazugeben: 340 mg BSA	

3.1.4.4 Medien für die Kultivierung von Zelllinien und primärer Zellen

HEK-293 Medium

	DMEM (500 mL)
10% (v/v)	FCS
5 mL	L-Glutamin (200 mM)
5 mL	Penicillin-Streptomycin 10000 U/mL

T-Zell Medium

	RPMI 1640 (500 mL)
10% (v/v)	FCS
5 mL	L-Glutamin (200 mM)
5 mL	Penicillin-Streptomycin 10000 U/mL
500 µL (1:1000)	β-Mercaptoethanol

L-Arginin-freies T-Zell Medium

	RPMI 1640 für SILAC (500 mL)
10% (v/v)	Dialysiertes FCS
5 mL	L-Glutamin (200 mM)
5 mL	Penicillin-Streptomycin 10000 U/mL

Material und Methoden

500 µL (1:1000)	β-Mercaptoethanol
5 mL	L-Lysin (20mM)

Erhaltungsmedium (primäre murine Hepatozyten)

	Williams Medium E (500 mL)
600 µL	L-Glutamin (200 mM)
11,5 mL	HEPES 1M pH7,4
2,8 mL	Penicillin-Streptomycin 10000 U/mL
1 mL	Gentamycin 50 mg/mL
1,25 mL	Hydrocortison
0,32 mL	Insulin
8,7 mL	DMSO (100%)

Anhaftmedium I (primäre murine Hepatozyten)

	Erhaltungsmedium
10%	FCS

Anhaftmedium II (primäre murine Hepatozyten)

	Erhaltungsmedium
1%	FCS

3.1.5 Kits

Kit	Hersteller
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master	Roche, Basel, Schweiz
NucleoSpin RNA®	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 FACS-Antikörper

Antigen	Fuorochrom	Klon	Hersteller
CD3, anti-Maus	BV510	17A2	BioLegend, San Diego, USA
CD3epsilon, anti-Maus	PE-Cy5	145-2C11	BioLegend, San Diego, USA
CD3zeta, anti-Maus	AF647	EP286Y	Abcam, Cambridge, UK
CD8a, anti-Maus	Pacific Blue/BV510/PE-Cy7/APC	53-6.7	BioLegend, San Diego, USA
CD8b, anti-Maus	APC	YTS156.7.7	BioLegend, San Diego, USA
CD11b, anti-Maus	BV421/PerCp/PE-Cy5	M1/70	BioLegend, San Diego, USA
CD11c, anti-Maus	BV650/PE-Cy7	N418	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD25, anti-Maus	BV650	PC61	BioLegend, San Diego, USA
CD44, anti-Maus	BV570	IM7	BioLegend, San Diego, USA
CD45.1, anti-Maus	BV605/PE-Cy7/PE-DZL594	A20	BioLegend, San Diego, USA
CD45.2, anti-Maus	APC	104	BioLegend, San Diego, USA
CD49b, anti-Maus	PE/BV421	DX5	BioLegend, San

Material und Methoden

			Diego, USA
CD62L, anti-Maus	BV711/BV785	MEL-14	BioLegend, San Diego, USA
CD69, anti-Maus	BV510	H1.2F3	BioLegend, San Diego, USA
LAMP-1 (CD107a), anti-Maus	PE/AF488	1D4B	BioLegend, San Diego, USA
LAG-3 (CD223), anti-Maus	BV421	C9B7W	BioLegend, San Diego, USA
PD-1 (CD279), anti-Maus	PerCp-eF710	J105	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NKp46 (CD335), anti-Maus	eF450	29A1.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NK1.1, anti-Maus	AF647	PK136	BioLegend, San Diego, USA
TCRbeta, anti-Maus	BV421	H57-597	BioLegend, San Diego, USA
TCRValpha2, anti-Maus	BV421/PE/APC/	B20.1	BioLegend, San Diego, USA
TCRVbeta5, anti-Maus	PE-Cy7	MR9-4	BioLegend, San Diego, USA
Ly6G, anti-Maus	PE-Cy7	1A8	BioLegend, San Diego, USA
Ly6G/C (Gr-1), anti-Maus	APC	RB6-8C5	BioLegend, San Diego, USA
MHCII (I-A/I-E), anti-Maus	PE/PE-Cy7	M5/114.15.2	BioLegend, San Diego, USA
F4/80, anti-Maus	PerCpCy5.5	BM8	BioLegend, San Diego, USA
IFNgamma, anti-Maus	PE/APC	XMG1.2	BioLegend, San Diego, USA
eBioscience™ Fixable	eFluor™ 780		Thermo Fisher

Material und Methoden

Viability Dye			Scientific, Waltham, USA
---------------	--	--	-----------------------------

3.1.6.2 Dextramere

MHC Allel	Fluorochrom	Einsatz	Peptid	Nr.	Hersteller
H-2Kb	PE	1:10	SIINFEKL	JD2163- PE	Immudex, Kopenhagen, Dänemark
H-2Kb	PE	1:10	SIYRYYGL	JD2164- PE	Immudex, Kopenhagen, Dänemark

3.1.6.3 In vivo Depletions-Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
InVivo mAb anti-Maus CD8	2.43	BioXcell, West Lebanon, USA
InVivo mAb anti-Maus NK1.1	PK136	BioXcell, West Lebanon, USA

3.1.6.4 Beads und Antikörper für immunomagnetische Aufreinigung

Kit	Nr.	Hersteller
Naïve CD8 positive T-Zellen Isolations Kit, Maus	130-096-543	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD45.1-FITC, Maus	130-096-232	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-FITC, Microbeads	130-048-701	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

3.1.6.5 Immunhistologie

Antigen	Einsatz	Wirt	Klon	Hersteller
Caspase 3, gespalten	1:1000	Kaninchen	9661	Cell Signaling, Technologies, Danvers, USA
GFP	1:3000	Kaninchen	20R-GR011	Abcam, Cambridge, UK

3.1.6.6 Titration rekombinanter Adenoviren

Antigen	Wirt	Hersteller
Hexon	Maus	Acris/OriGene Technologies, Herford, Germany

3.1.7 Primer

Alle Primer wurden von Eurofins, Ebersberg, Deutschland bezogen.

Zielgen	Sequenz (3' to 5'), Forward	Sequenz (5' to 3'), Reverse
Adeno-X	TAAGCGACGGATGTGG	CCACGTAAACGGTCAAAG

3.1.8 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNAse I	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Gateway [®] LR Clonase [®] Enzym Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gateway [®] Proteinase K Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionsenzyme <ul style="list-style-type: none"> • AfIII FastDigest • BspEI/KpnI FastDigest • HindIII FastDigest • PacI FastDigest 	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Material und Methoden

T4 DNA-Ligase (5U/5 μ L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Kollagenase NB 4G	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

3.1.9 Kompetente E.coli Stämme

Stamm	Hersteller
One Shot [®] TOP10 chemically competent E. coli	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.10 Expressionsplasmide

Plasmid	Resistenz
pEntr	Kanamycin
pDest	Ampicillin

3.1.11 Zytokine und andere rekombinante Proteine

Name	Nr.	Hersteller
humanes IL-2/Aldesleukin	PZN: 02238131	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Lipopolysaccharid (LPS) aus E.coli O111:B4	L2630	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ovalbumin, Albumin aus Hühnereiweiß	A5503	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ova257-264 (SIINFEKL) zur Stimulation von T Zellen	6-7015-901	Iba Lifesciences, Göttingen, Deutschland

3.1.12 Mauslinien

Alle Mauslinien haben C57BL/6J-Hintergrund und wurden unter SPF-Bedingungen gezüchtet und gehalten.

Mauslinie	
C57BL/6J Wildtyp Mäuse	Bezogen von Janvier Labs
TNFR I/II KO	Eigene Zucht im Zentrum für präklinische Forschung (Klinikum rechts der Isar)
ASC KO	Zur Verfügung gestellt von AG Hornung (LMU München) (Ozoren et al., 2006)
Ripk3 KO	Zur Verfügung gestellt von AG Jost (TU München)
OT-I x CD45.1	Eigene Zucht im Zentrum für präklinische Forschung (Klinikum rechts der Isar)

3.1.13 Zelllinien

Zelllinie	
HEK-293 (ATCC® CRL-1573™)	ATCC, Manassas, USA

3.1.14 Rekombinante Adenoviren

Das *Backbone* der verwendeten Adenoviren entspricht dem E1- und E3-deletierten humanen Serotyp 5 Adenovirus. Die kodierten Gene werden unter dem CMV-Promotor exprimiert.

Bezeichnung	Kodierte Gene	Herkunft
AdGOL	eGFP, Ovalbumin, CBG99-Luziferase	Eigene Herstellung (Wohlleber et al., 2012)
AdGL	eGFP, Renilla-Luziferase	Eigene Herstellung (Wohlleber et al., 2012)
AdGDL	eGFP, Diphtheriatoxin-Rezeptor, CBG99-Luziferase	Eigene Herstellung

3.1.15 Software

Software	Anwendung	Firma
EndNoteX9	Literaturverwaltung	Thompson Reuters
Excel für Mac 2011	Datenanalyse	Microsoft
Illustrator CS5	Graphische Aufbereitung	Adobe
ImageLab, Version 4.1	Analyse von Aufnahmen des Imaging Systems	Bio-Rad Laboratories
Lightcycler 480 Software 1.5.0. SP4	Durchführung und Analyse von qRT-PCR	Roche
LivingImage 4.3.1	Analyse von Biolumineszenz Daten	Caliper Lifesciences
PowerPoint für Mac 2011	Graphische Aufbereitung	Microsoft
Prism 5 für Mac OS X	Statistik und graphische Aufbereitung	GraphPad
Word für Mac 2011	Textverarbeitung	Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1 Produktion rekombinanter Adenoviren

3.2.1.1 Virusvermehrung

Rekombinante Adenoviren können in HEK-293 Zellen, welche das Gen E1 exprimieren, vermehrt werden. Dafür werden Zellen in Zellkulturplatten ausgesät und bei 80% Konfluenz mit 10^8 IU Adenovirus pro Platte infiziert. Wenn die Zellen beginnen sich abzulösen (in der Regel nach 48h), werden sie durch Klopfen und Spülen vollständig abgelöst und abgenommen. Anschließend wurde 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in maximal 6 mL Viruspuffer suspendiert und die Zellen durch schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C aufgebrochen (3x wiederholen). Durch Zentrifugation bei 3500 x g bei 4°C für 10 min werden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand wird zur weiteren Aufreinigung behalten.

3.2.1.2 Ultrazentrifugation

Die Aufreinigung der Viruspartikel aus dem Überstand erfolgt mit Hilfe eines Cäsiumchlorid-Gradienten. Dafür wird ein 1,25-CsCl-Puffer mit einem 1,4-CsCl-Puffer unterschichtet und mit der entsprechenden Virussuspension überschichtet. Das Ultrazentrifugenröhrchen wird dann mit Viruspuffer vollständig befüllt und anschließend für 1 h bei 35000 Upm bei 4°C mit maximaler Beschleunigung und minimaler Bremsleistung zentrifugiert. Um die Bande mit Viruspartikeln abzunehmen, wird das Röhrchen dann mit einer Kanüle durchgestochen. Die Suspension mit Viruspartikeln wird mit Viruspuffer verdünnt und auf 8 mL eines 1,34-CsCl-Puffer geschichtet. Die zweite Ultrazentrifugation erfolgte bei 30000 Upm bei 4°C für 18 h. Die Bande mit den enthaltenen Viruspartikeln wird, wie bereits beschrieben, zur Dialyse abgenommen.

3.2.1.3 Dialyse

Durch Dialyse wird das noch enthaltene CsCl aus der Virussuspension entfernt. Dafür wird die Virussuspension in eine Dialysekammer eingebracht und in 1 L Dialysepuffer dialysiert. Der Puffer wird bei 4°C unter leichtem Rühren 5x erneuert (nach 30 min, nach 1,5 h, nach 2,5 h und nach 3,5 h). Anschließend wird die Virussuspension aus der Kammer entnommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Material und Methoden

3.2.1.4 Titration rekombinanter Adenoviren

Die Titration wird mittels Färbung des adenoviralen Hexon Proteins durchgeführt. Dafür werden HEK-293 Zellen in poly-L-Lysin beschichteten 24-well Platten in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/well ausgesät. Anschließend werden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) des aufgereinigten Adenovirus infiziert. Nach 35-40 h Inkubation bei 37°C werden die Zellen mit kaltem Methanol fixiert (20 min, -20°C) und 3x mit 1% BSA/PBS gewaschen. Anschließend virusinfizierte Zellen werden durch einen anti-Hexon Antikörper (1:200 in 1% BSA/PBS) angefärbt (1h bei RT). Die Zellen werden dann 3x mit PBS gewaschen und die Färbung wird daraufhin mittels DAB-Lösung verdünnt in DAB-Puffer entwickelt (10 min bei RT). Infizierte Zellen werden unter dem Mikroskop gezählt und der Titer in IU/mL (infektiöse Viruspartikel pro mL Lösung) bestimmt.

3.2.2 Intravenöse Injektionen

3.2.2.1 Adoptiver Transfer naiver OT-I CD8 T-Zellen

Einen Tag vor Infektion (Tag -1) werden den Versuchstieren 100 naive Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen aus OT-I x CD45.1 Mäusen in 200 µl PBS *i.v.* gespritzt. Die Zahl von 100 naiven Ovalbumin-spezifischen CD8 T Zellen entspricht in etwa dem natürlichen Repertoire an klonalen Antigen-spezifischen Zellen.

3.2.2.2 Adenovirale Infektion

Die Infektion mit Adenoviren erfolgt *i.v.* über die Schwanzvene in einem Volumen von 100 µL. Die entsprechende Dosis wurde durch Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung angesetzt. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Dosis zur Etablierung einer akut-selbstlimitierenden Infektion 10^7 IU pro Maus und die Dosis zur Etablierung einer chronischen Infektion 10^9 IU pro Maus.

3.2.2.3 Antikörper-vermittelte Depletion von CD8 T-Zellen

Die Maus wird mit einem Rückhalter fixiert und die Injektionsstelle (Schwanzvene) wird mit 70% Alkohol desinfiziert. Die Injektion erfolgt mit einer Insulinspritze mit 30G * 1/2 " (0,3mm x 12mm) Nadel (U-100 Insulin). Es ist wichtig den Schwanz vor der Injektion unter einer Rotlichtlampe zu erwärmen. Dadurch kommt es zu einer Erweiterung der Schwanzvene, was die Injektion erleichtert und die Zeitspanne des gesamten Prozesses verkürzt. Die endogenen CD8 T-Zellen der Versuchstiere werden durch *i.v.* Injektion von 5 µg eines anti-

Material und Methoden

Maus CD8 Antikörpers (Klon 2.43) in 100 μ L PBS einen Tag vor Infektion eliminiert. Die Injektion des Antikörpers muss 1x pro Woche über den gesamten Beobachtungszeitraum wiederholt werden.

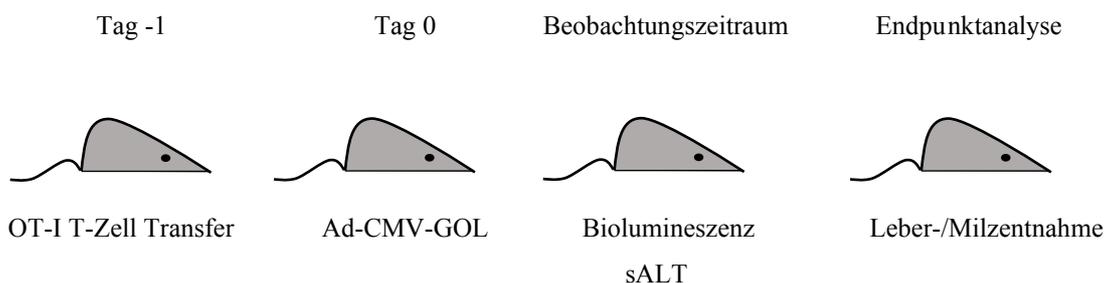
3.2.3 Intraperitoneale Injektionen

3.2.3.1 Antikörper-vermittelte Depletion von NK-Zellen

Für die intraperitoneale Injektion ist das Tier fixiert und leicht mit dem Kopf nach unten geneigt. Die Injektion erfolgt kaudoventral in den oberen linken Quadranten des Abdomens. Es wird zunächst abgesaugt, um eine Injektion in die Harnblase oder einen Darmkrampf auszuschließen. Die Injektion erfolgt mit einer Insulinspritze mit 30G * 1/2 " (0,3mm x 12mm) Nadel (U-100 Insulin). Die endogenen NK1.1 positiven Zellen der Versuchstiere werden durch *i.p.* Injektion von 300 μ g eines anti-Maus NK1.1 Antikörpers (Klon PK136) in 100 μ l PBS einen Tag vor Infektion eliminiert. Die Injektion des Antikörpers muss 1x pro Woche über den gesamten Beobachtungszeitraum wiederholt werden.

3.2.4 Adenovirus-Infektion *in vivo*

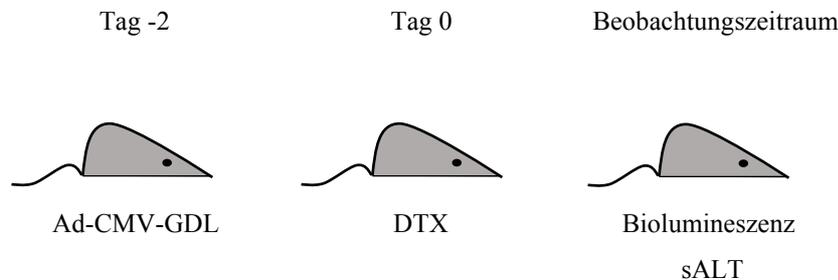
Um eine akut-selbstlimitierende (10^7 IU Ad-CMV-GOL) und chronische (10^9 IU Ad-CMV-GOL) Leberinfektion zu induzieren, wird, wenn nicht anders erwähnt, nach dem nachfolgend dargestellten zeitlichen Ablauf vorgegangen:



Infektion mit dem Ad-CMV-GOL Virus führt zur Expression des Modellantigens Ovalbumin in infizierten Zellen, welches von den zuvor transferierten OT-I CD8 T-Zellen erkannt werden kann.

3.2.5 Diphtherietoxin-induzierter Leberschaden *in vivo*

Das Modellsystem zum induzierten Leberschaden macht sich das DTX/DTR-System zu Nutze. Um Leberschaden mittels DTX Applikation zu induzieren, wird, wenn nicht anders erwähnt, nach dem nachfolgend dargestellten zeitlichen Ablauf vorgegangen:



3.2.6 Blutentnahme und Bestimmung der ALT Werte im Blutserum

Die Serum Alanin-Aminotransferase (sALT) ist ein Enzym, welches vor allem im Zytoplasma von Hepatozyten vorkommt und als Maß für Leberschaden in Blut oder Serum von Mäusen bestimmt werden kann. Hierfür wurde den Mäusen vor Infektion (Negativkontrolle) und zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion 32 μ L Blut durch Punktion der Schwanzvene entnommen und direkt aus der Kapillare oder in PBS vorverdünnt auf einen entsprechenden GPT Teststreifen gegeben. Die Messung erfolgte mit dem Reflotron-Messgerät.

3.2.7 *In vivo* Biolumineszenz-Messung

Über die Luziferase Expression nach Ad-CMV-GOL Infektion kann der Infektionsverlauf nicht-invasiv und über einen längeren Zeitraum verfolgt werden (Stabenow et al., 2010). Von Tag 0 an wird die Biolumineszenz 1x täglich im IVIS-System gemessen. Dazu wird den Mäusen 5 min vor jeder Messung Luziferin-Kaliumsalz (50 mM, 10mg/kg KG) in 150 μ l PBS *i.p.* gespritzt und die Biolumineszenz unter Isoflurannarkose (2,5% Isofluran über Sauerstoffzufuhr) detektiert und quantifiziert. Die Biolumineszenz-Messung an Tag 0 dient der Messung des Hintergrundsignals ohne Infektion (Negativkontrolle), welches nach erfolgreicher Eliminierung der Ad-CMV-GOL Infektion wieder erreicht werden sollte. Die Biolumineszenz-Messung an Tag 1 dient der Detektion einer erfolgreichen Infektion. Für die Auswertung wird eine sogenannte *ROI*⁴¹ auf die Region mit der maximalen Lichtemission

⁴¹ engl.: Region of interest

gelegt und diese wird bei allen Messungen beibehalten. Die Messung der Lichtemission erfolgt in Photonen/Sekunde (p/s). Die Auswertung erfolgt mit der LivingImage Software.

3.2.8 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Anzahl adenoviraler Genome in infiziertem Lebergewebe wird mittels qPCR bestimmt. Hierfür wird zunächst genomische DNA mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kit aus Lebergewebe (2x2x2 mm Stück aus der Mitte des linken Leberlappens) isoliert. Von der isolierten DNA werden pro Reaktion 50 ng eingesetzt. Die qPCR wird mittels Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue Kit nach dem Protokoll des Herstellers im 384-well Format in einem Lightcycler® 480 Instrument durchgeführt. Für die absolute Quantifizierung der adenoviralen Genomkopien wird eine Standardreihe von 10^{10} - 10^2 Kopien/ μL eines AdTrack Standards ($4,3164 \times 10^{11}$ Kopien/ μL) angesetzt. Das pAdTrack-Plasmid enthält Sequenzen des Adenovirus-Genoms und kann deshalb als Standard für die Quantifizierung der Infektion verwendet werden. Für jede Probe wird auch GAPDH quantifiziert, um die Menge der Ziel-mRNA in der Leber relativ zur Menge an GAPDH mRNA quantifizieren zu können. Um die Menge von mRNA in der Leber miteinander vergleichen zu können, wird die Effizienz der Primerpaare anhand einer 10x Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-4}) einer Positivkontrolle gemessen.

Reaktionsansatz

Takyon™ 2x MasterMix	5 μL
Forward Primer (5 μM)	1 μL
Reverse Primer (5 μM)	1 μL
DNA	50 ng/2 μL
H ₂ O, PCR grade	ad 10 μL

Zusätzlich wird der Verlauf der Schmelzkurve analysiert, um die Qualität der qPCR zu überprüfen.

qPCR Programm

Programm	Temperatur	Temperatur-Steigerung	Zeit
Denaturierung	95°C	4,8 °C/s	10 min
Amplifikation x 45	95°C	4,4 °C/s	20 s
	58°C	2,2 °C/s	10 s
	72°C	4,8 °C/s	1 min
Schmelzkurve	95°C	4,8 °C/s	2 s
	65°C	2,5 °C/s	1 min
	95°C	0,11 °C/s	

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Lightcycler® 480 Software.

3.2.9 Isolation primärer Zellpopulationen aus Leber und Milz

3.2.9.1 Aufreinigung muriner Lymphozyten aus der Leber

Für die Isolation von Lymphozyten aus der Leber werden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet und die Leber anschließend für einige Sekunden über die Leberarterie mit PBS perfundiert bis sie vollständig hell wird. Anschließend wird die Leber mit einem Spritzenstempel durch ein Metallsieb (Maschengröße 100 µm) gedrückt, um das Lebergewebe zu homogenisieren und mit PBS nachgespült. Die Suspension wird dann bei 400 x g bei Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Je eine Leber wird in 8 mL GBSS mit Typ II Kollagenase (1:400) aufgenommen und für 10 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wird die Konzentration der Kollagenase durch Zugabe von PBS so stark verdünnt, dass der Verdau gestoppt wird und die Zellen werden dann bei 1500 Upm bei Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert. Für den nachfolgenden Percoll Gradienten (1400 x g/20min/Beschleunigung 7/ Bremse 1/RT) wird das resultierende Zellpellet in 3 mL 40% Percoll-Lösung suspendiert und in einem 15 mL Zellkulturrohrchen auf 3 mL 80% Percoll-Lösung geschichtet. Im Anschluss wird die Leukozyten-enhaltende Bande, welche sich zwischen den beiden Percoll-Schichten befindet, mit Hilfe einer Pipette abgenommen, in ein 50 mL Zellkulturrohrchen überführt und die Zellsuspension 2x mit 40 mL PBS gewaschen (400 x g/5 min/RT). Anschließend können die Zellen für die weitere Analyse genutzt werden.

Material und Methoden

3.2.9.2 *Aufreinigung muriner Lymphozyten aus der Milz*

Für die Isolation von Lymphozyten aus der Milz werden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet und die Milz anschließend entnommen. Anschließend wird die Milz mit Spritzenstempel durch ein Metallsieb (Maschengröße 100 μm) gedrückt, um das Gewebe zu homogenisieren und mit PBS nachgespült. Die Suspension wird dann bei 400 x g bei Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die roten Blutzellen zu lysieren, wird je eine Milz in 1,5 mL ACK Lyse-Puffer aufgenommen und für 2 min inkubiert. Die Lyse wird durch Zugabe von PBS gestoppt und die Suspension nochmals zur Vereinzlung durch einen Filter gegeben. Anschließend wird die Zellsuspension abzentrifugiert (400 x g/5 min/RT) und die Zellen können für die weitere Analyse genutzt werden.

3.2.9.3 *Isolation und Kultivierung primärer muriner Hepatozyten*

Für die Isolation primärer Hepatozyten aus der Mausleber werden die Versuchstiere, nach *i.p.* Injektion von 150 μL Heparin (10000 U/5 mL) zur Blutverdünnung, in Narkose gelegt. Diese erfolgt durch *i.p.* Injektion von 200 μL Ketamin (5%) / Xylazin (20 mg/mL) (3:1). Nach Überprüfung der Reflexe wird die Leber freigelegt und für 8 min bei einer Pumpengeschwindigkeit von 35 mit EGTA-Puffer über die Pfortader perfundiert. Anschließend erfolgt die Perfusion mit Kollagenase-Puffer bei einer Pumpengeschwindigkeit von 35. Danach wird die Leber entnommen und die Gallenblase entfernt. Die Leber wird auf ein Metallsieb gelegt und die Kapsel mit einer spitzen Pipette auseinandergezogen, sodass die Hepatozyten aus dem Gewebe gespült werden. Die Zellsuspension wird bei 50 x g für 2 min (RT) abzentrifugiert und 2x mit Suspensions-Puffer gewaschen. Danach wird die Zellsuspension zur Vereinzlung durch einen 100 μm Filter gegeben. Für den nachfolgenden Percoll-Gradienten (600 x g/20 min/Beschleunigung 7/ Bremse 1/RT) wird das resultierende Zellpellet in 5 mL 50% Percoll-Lösung suspendiert und in einem 50 mL Zellkulturrohrchen mit 5,5 mL 80% Percoll-Lösung unterschichtet. Es ist wichtig zu erwähnen, dass primäre Hepatozyten mindestens mit 1000 μL Pipettenspitzen pipettiert werden müssen, da sie sehr empfindlich gegenüber Scherkräften sind. Nach Ablauf des Gradienten werden die aufliegenden toten Zellen abgesaugt und die Bande mit den lebenden Hepatozyten 2x mit Suspensions-Puffer gewaschen (50 x g/2 min/RT). Anschließend werden die Zellen in 3-5 mL Anhaftmedium I aufgenommen und im Verhältnis 1:3 bis 1:5 mit Trypan Blau gezählt. Für die Kultivierung primärer Hepatozyten werden die entsprechenden Zellkulturplatten mit Kollagen R beschichtet und die Zellen anschließend in Anhaftmedium I ausgesät. Für die

Kollagen R Beschichtung wird Kollagen R 1:10 mit sterilem H₂O verdünnt und die sterile Lösung dann in die entsprechenden Wells gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C werden die Wells 2x mit sterilem H₂O gespült und dann trocknen gelassen. 3-4 h nach dem Ausplattieren, wenn sich die Zellen leicht abgesetzt haben und bereits 2 Kerne zu sehen sind, erfolgt ein Mediumwechsel zu Anhaftmedium II. Nach 24 h erfolgt dann ein 3x Waschen mit HBSS und ein Mediumwechsel zu Erhaltungsmedium. Primäre Hepatozyten sollten nicht länger als 3 bis 4 Tage in Kultur gehalten werden.

3.2.10 Immunomagnetische Aufreinigung von CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen

Naive CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen werden durch immunomagnetische Aufreinigung mittels AutoMACS Separator aus der Milz gewonnen. Es wird das CD8 T-Zell Isolations-Kit für naive Zellen anhand der Gebrauchsanweisung des Herstellers genutzt.

CD45.1⁺ OT-I Mäuse verfügen über CD8 T-Zellen, welche einen transgenen T-Zell-Rezeptor besitzen, der spezifisch das Ovalbumin-Peptid SIINFEKL auf dem MHC-I Molekül H-2K^b erkennt. Außerdem tragen die CD8 T-Zellen den kongenen Marker CD45.1, welcher es erlaubt diese im Empfängertier eindeutig zu identifizieren. Nach Aufreinigung der Leukozyten aus der Milz dieser Tiere werden die Zellen gezählt, pelettiert und 10⁸ Zellen in 200 µL MACS-Puffer und 50 µL Biotin Antikörper Mix suspendiert. Die Inkubation erfolgt für 5 min bei 4°C. Anschließend werden pro 10⁸ Zellen 100 µL MACS-Puffer, 100 µL anti-Biotin Antikörper und 50 µL CD44 Microbeads zugegeben und für weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 2 mL MACS-Puffer gestoppt und die Suspension bei 1200 Upm für 5 min zentrifugiert, um die Zellen von den Beads zu trennen. 10⁸ Zellen werden in 500 µL MACS-Puffer aufgenommen und die naiven CD8 T-Zellen unter Verwendung des „Deplete“ Programms im AutoMACS Separator isoliert. Anschließend werden die Zellen nochmals gezählt.

Für die Reisolation *in vivo* aktivierter CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen wird ein CD45.1-FITC Antikörper in Kombination mit anti-FITC Microbeads anhand der Gebrauchsanweisung des Herstellers genutzt.

Nach Aufreinigung der Leukozyten aus Leber und Milz werden die Zellen gezählt, pelettiert und 10⁷ Zellen in 25 µL MACS-Puffer und 1,3 µL CD45.1-FITC Antikörper suspendiert. Die Inkubation erfolgt für 10 min bei 4°C. Anschließend wird die Bindung des Antikörpers durch Zugabe von 10 mL MACS-Puffer gestoppt und die Suspension bei 400 x g für 10 min (RT) zentrifugiert. Danach werden pro 10⁷ Zellen 45 µL MACS-Puffer und 5 µL anti-FITC

Microbeads zugegeben und für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 10 mL MACS-Puffer gestoppt und die Suspension bei 300 x g für 5 min (RT) zentrifugiert, um die Zellen von den Beads zu trennen. 10⁸ Zellen werden in 500 µL MACS-Puffer aufgenommen und die CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen unter Verwendung des „Possel“ Programms im AutoMACS Separator isoliert. Anschließend werden die Zellen nochmals gezählt.

3.2.11 *Ex vivo* Restimulation von OT-I CD8 T-Zellen

Es werden zuvor adoptiv transferierte CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen aus Leber und/oder Milz isoliert und über Nacht entweder unbehandelt gelassen, mit SIINFEKL Peptid (10 nM) oder mit PMA (20 ng/mL) / Ionomycin (1 µg/mL) behandelt. Zusätzlich wurde der Proteintransport-Blocker Brefeldin A (3 µg/mL) zugesetzt. Brefeldin A führt zur Akkumulation von Zytokinen wie IFN γ am Golgi Apparat/Endoplasmatischen Retikulum und verstärkt so das Signal von intrazellulären Zytokin Färbungen (Jung, Schauer, Heusser, Neumann, & Rieger, 1993). Anschließend erfolgt die Oberflächenfärbung für anti-CD8a und anti-CD45.1, sowie die intrazelluläre Färbung für IFN γ .

3.2.12 *Ex vivo* Generierung von CD8 Effektorzellen (CTLs)

Unter T-Zell Aktivierung versteht man die Stimulation von naiver T-Zellen zum Zweck der Generierung zytotoxischer T-Zellen (CTL⁴²), welche über Effektorfunktionen verfügen. Zur Generierung von aktivierten CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen wird OT-I x CD45.1 Spendertieren die Milz entnommen, Leukozyten aufgereinigt und diese mit Ovalbumin (0,2 µg/mL), IL-2 (1:1000) und LPS (0,01 µg/mL) in T-Zell Medium in einer Zellkulturflasche kultiviert (Dichte von 10 x 10⁶ Zellen/mL T-Zell Medium). Nach 4 Tagen (immer wieder Medium mit IL-2 erneuern und gegebenenfalls in größere Flasche überführen) werden die CTL aufgereinigt. Dafür wird die Zellsuspension aus der Zellkulturflasche abgenommen und abzentrifugiert (400 x g/5 min/RT). Für den nachfolgenden Pancoll-Gradienten (1057 x g/25 min/Beschleunigung 7/ Bremse 1/RT) wird das resultierende Zellpellet in 10 mL PBS in einem 15 mL Zellkulturröhrchen aufgenommen und mit 2 mL humanem Pancoll unterschichtet. Die Zellen werden anschließend nochmal mit PBS gewaschen und gezählt.

⁴² engl.: Cytotoxic T lymphocytes

Erfahrungsgemäß erhält man aus einer Milz etwa 20-35 Millionen CTL. Den Versuchstieren werden 10^7 CTL in 200 μ l PBS *i.v.* gespritzt.

3.2.13 Impedanz-basierte Messung der Zellviabilität in Echtzeit

Zur Untersuchung der *in vitro* Zellviabilität SIINFEKL-beladener primärer muriner Hepatozyten nach Inkubation mit *in vivo* aktivierten CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen aus Versuchstieren mit akuter-selbstlimitierender oder chronischer Ad-CMV-GOL Infektion, wird sich die Impedanz-basierte Zellanalytik zu Nutze gemacht. Hierfür wird der xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) von ACEA Biosciences verwendet. Die entsprechenden elektronischen Zellkulturplatten verfügen auf der Unterseite über Mikroelektroden zwischen denen kontinuierlich ein Wechselstromwiderstand gemessen werden kann. Da sich dieser bei Änderung des zellulären Zustandes oder der Zellzahl ändert, kann damit die Zellviabilität in Echtzeit verfolgt werden (ACEA Biosciences, 2013). Für Messungen der Zellviabilität mittels RTCA wird zunächst 100 μ L des Erhaltungsmediums für primäre murine Hepatozyten als Nullwert in der elektronischen Zellkulturplatte gemessen. Der Nullwert wird von den Werten weiterer Messungen subtrahiert. Anschließend werden 10000 frisch isolierte primäre murine Hepatozyten in 200 μ L Anhaftmedium I pro Well ausgesäht. Nach 4 h wird das Medium gegen Anhaftmedium II ausgetauscht und die Messung bei 37°C gestartet. Mit zunehmendem Anwachsen der Zellen kann ein Anstieg des Zellindex in Abhängigkeit der Zeit gemessen werden. 48 h nach Ausplattieren werden die primären murinen Hepatozyten mit dem Ovalbumin-Peptid SIINFEKL (20 nM) beladen und anschließend mit verschiedenen Effektor/Target-Verhältnissen von *in vivo* aktivierten OT-I CD8 T-Zellen aus Ad-CMV-GOL infizierten Mäusen inkubiert. Die Zellviabilität wird durchgehend mittels RTCA verfolgt und die Analyse erfolgt mittels Prism Software.

3.2.14 Durchflusszytometrische Analyse

Für die phänotypische Analyse wird die Zellsuspension in eine 96-Well Platte mit V-Boden überführt. Die durchflusszytometrischen Analysen werden unter Verwendung des SP6800 Spectral Analyzer von Sony Biotechnology durchgeführt. Die Daten werden mit der FlowJo Software analysiert.

3.2.14.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Zellsuspension in der 96-Well V-Boden Platte wird bei 300 x g bei 4°C pelletiert und anschließend in 50 µL Antikörper-enthaltendem (in der Regel 1:200 eingesetzt) FACS-Puffer aufgenommen. Die Inkubation erfolgt 30 min bei 4°C unter Ausschluss von Tageslicht. Anschließend wird 2x bei 300 x g bei 4°C für 2 min mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse in einem Endvolumen von 100 µL FACS-Puffer aufgenommen. Für das Unmixing (vergleichbar zu Kompensation bei konventionellen Durchflusszytometern) wird immer eine Einzelfärbung des entsprechenden Antikörpers angefertigt. Zusätzlich wird immer eine FMO⁴³-Kontrolle jedes Fluorochroms angefertigt. Das bedeutet, dass die entsprechende Färbung alle Fluorochrome eines Panels enthält, mit Ausnahme des Fluorochroms von Interesse. Die FMO-Kontrolle stellt sicher, dass jede Streuung von Fluorochromen, in den Fluoreszenzkanal von Interesse, sicher identifiziert wird.

3.2.14.2 Dextramer-Färbung

Die H-2Kb^{SIINFKEL} Dextramer Färbung geht der Oberflächenfärbung voraus. Sie dient der effizienten Identifizierung Ovalbumin-spezifischer CD8 T-Zellen. Dextramere bestehen aus einem Dextran Rückgrat, das die Konformation der daran befestigten H-2Kb^{SIINFKEL} Dextramer Komplexe und Fluorochrome stabilisiert. Sie zeigen eine erhöhte Avidität zu den spezifischen T-Zellen und haben eine verbesserte Färbungsintensität. Die Färbung erfolgt im Verhältnis 1:10 in PBS mit 5% FCS für 10 min bei Raumtemperatur in einem Volumen von 30 µL. Als Isotyp-Kontrolle dient die Färbung mit dem H-2Kb^{SIYRYYGL} Dextramer. Alle weiteren Antikörper für Oberflächenfärbung werden anschließend in einem Volumen von 20 µL FACS-Puffer im Verhältnis 1:80 dazu pipettiert. Die Inkubation erfolgt dann für 30 min bei 4°C unter Ausschluss von Tageslicht. Anschließend wird 2x bei 300 x g bei 4°C für 2 min mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse in einem Endvolumen von 100 µL FACS-Puffer aufgenommen.

3.2.14.3 Intrazelluläre Färbung zytoplasmatischer Proteine

Die Färbung intrazellulärer, zytoplasmatischer Proteine folgt nach der Oberflächenfärbung. Nach der Oberflächenfärbung wird 2x bei 300 x g bei 4°C für 2 min gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 100 µL Fixierungs-Puffer fixiert (30 min/RT). Nach 2x Waschen mit 100 µL 1x Permeabilisierung-Puffer (mit PBS aus 10x Permeabilisierung-

⁴³ engl.: Fluorescence minus one

Material und Methoden

Puffer frisch angesetzt) bei 700 x g für 5 min bei Raumtemperatur erfolgt die intrazelluläre Färbung. Hierfür werden die Zellen in 50 µL Antikörper-enthaltendem (in der Regel 1:200 eingesetzt) 1x Permeabilisierungs-Puffer aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird zwei Mal mit 100 µL 1x Permeabilisierungs-Puffer bei 700 x g für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und die Zellen für die durchflusszytomterische Analyse in einem Endvolumen von 100 µL FACS-Puffer aufgenommen.

3.2.15 Immunhistologie

Zur Analyse der Lebern mittels Immunhistochemie werden die Lebern vor der Entnahme über die Pfortader kurz mit PBS perfundiert. Anschließend werden aus dem großen Leberlappen und dem Pyramidenlappen jeweils Gewebeprobe entnommen und für 4 Tage in 4% PFA/PBS bei 4°C fixiert. Danach werden die Gewebeprobe in 0,1% PFA/PBS gelagert und der Arbeitsgruppe von Dr. Katja Steiger (Institut für Pathologie, *Comparative experimental Pathology*, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) zur weiteren Verarbeitung übergeben. Nach Entwässerung und der Einbettung in Paraffin werden 2µm dicke Schnitte angefertigt, die entweder für eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) verwendet werden, oder von denen immunhistologische Färbungen mittels Primärantikörpern gegen GFP und gesplante Caspase 3 mit Hilfe des Bond Refine Detection Kit am Färbeautomaten Leica Bond-MAX angefertigt werden. Die Objektträger werden mittels SCN 400 Slide Scanner gescannt.

3.2.16 Statistik

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wird ein repräsentativer Versuch von mindestens 2 durchgeführten Versuchen gezeigt. Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM⁴⁴) für die entsprechende Gruppengröße (n) dar. Der Student's t-Test wird mit der GraphPad Prism Software berechnet. Die statistische Signifikanz wird ab $p < 0,05$ definiert und folgendermaßen markiert: * = $p < 0,05$ / ** = $p < 0,01$ / *** = $p < 0,001$

⁴⁴ engl.: Standard error of the mean

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo* Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von Zelltod auf die Qualität der antiviralen Immunantwort in der Leber

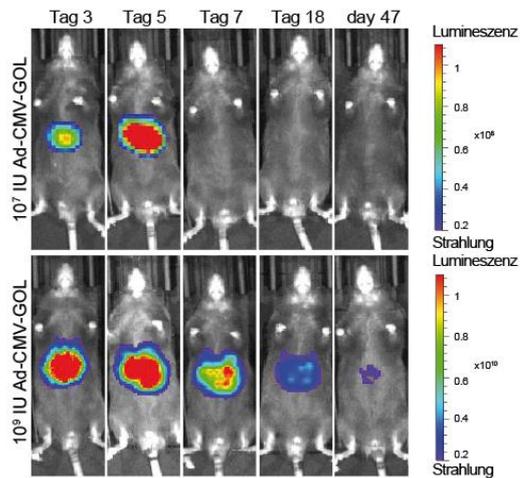
Die genaue Dynamik der adaptiven Immunantwort gegenüber hepatotropen Infektionen der Leber ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Leber ist ein Organ, welches über zahlreiche Funktionen verfügt, die Einfluss auf lokale Immunantworten nehmen können.

Um den Einfluss von Zelltod auf die Induktion von Immunaktivierung oder Immuntoleranz in der Leber systematisch untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit auf ein *in vivo* Modellsystem für eine hepatotrope Infektion zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um die Infektion mit einem rekombinanten, replikationsdefizienten Adenovirus, das eine Expressionskassette enthält, die für das Modellantigen Ovalbumin in Kombination mit den Reporterproteinen GFP und Luziferase unter Kontrolle eines CMV-Promotors kodiert (Ad-CMV-GOL) (Stabenow et al., 2010) (Wohlleber et al., 2012). Das Modellantigen Ovalbumin erlaubt es die Virus-spezifische CD8 T-Zell Antwort zu charakterisieren. Da die Reporterproteine im gleichen Verhältnis zu Ovalbumin exprimiert werden, erlauben sie somit ein Monitoring des Infektionsverlaufs über den Beobachtungszeitraum von maximal 50 Tagen. Adenoviren des Serotyps 5 weisen einen ausgeprägten Hepatotropismus auf und können als Modellsystem für eine hepatotrope Infektion genutzt werden (Waddington et al., 2008) (Manske et al., 2018). Das *in vivo* Modellsystem ist bereits sehr gut etabliert und weist eine Reihe von Vorteilen gegenüber klassischen transgenen Mausmodellen auf (Stabenow et al., 2010), bei denen bestimmte Antigene als Transgen in Hepatozyten exprimiert werden:

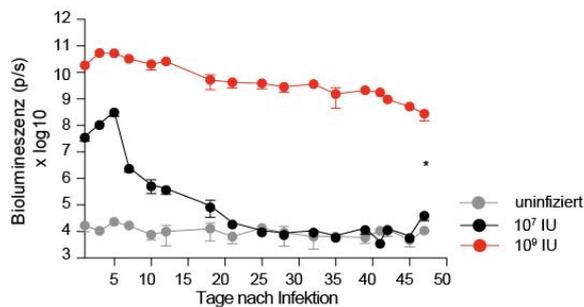
- 1) Es erlaubt die Charakterisierung der zellulären und molekularen Mechanismen der Virus-spezifischen CD8 T-Zell Antwort lokal in der Leber.
- 2) Es weist eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber transgenen Mausmodellen und klassischen *in vivo* Zytotoxizitäts-Assays auf.
- 3) Es erlaubt das Monitoring des Infektionsverlaufs im zeitlichen Verlauf.
- 4) Es erlaubt die Quantifizierung der Aktivität einer geringen Anzahl zirkulierender Effektorzellen gegenüber einer geringen Anzahl infizierter Hepatozyten und stellt somit die physiologische Situation nach.

4.2 Fehlende Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten nach hoher adenoviraler Infektionsdosis

A



B



C

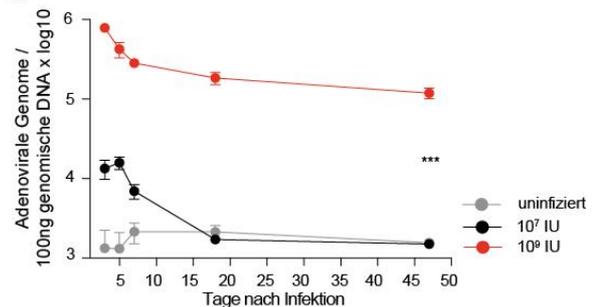


Abbildung 1: Infektion mit einer hohen Dosis Ad-CMV-GOL geht mit fehlender Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten einher.

(A-C) Zeitkinetik nach 10^7 IU/Maus oder 10^9 IU/Maus Ad-CMV-GOL Infektion. (A,B) Messung und Quantifizierung der *in vivo* Biolumineszenz. (C) PCR-basierte Quantifizierung adenoviraler DNA. (A-C) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 5$).

Zunächst wurden Versuchstiere mit einer niedrigen (10^7 IU/Maus) oder hohen (10^9 IU/Maus) Dosis des Ad-CMV-GOL Virus infiziert und der Verlauf der Infektion über einen Beobachtungszeitraum von 50 Tagen p.i. verfolgt. Dafür wurde 5 Minuten nach Luziferin Injektion die Adenovirus-kodierte Luziferase-Expression mittels *in vivo* Biolumineszenz nicht-invasiv gemessen. Die Luziferase-Expression stellt somit eine Messgröße für das Ausmaß der Infektion dar (Stabenow et al., 2010). Abbildung 1 A zeigt repräsentative Bilder der Regionen mit maximaler Lichtemission aus der LivingImage Software (Abbildung 1 A). Als (Negativ-)

Ergebnisse

Kontrollgruppe wurden uninfizierte Mäuse verwendet. Die Biolumineszenz-Messung an Tag 0 p.i. diente der Messung des Hintergrundsignals ohne Infektion, welches nach erfolgreicher Eliminierung des Ad-CMV-GOL Virus wieder erreicht werden sollte. Die Biolumineszenz-Messung an Tag 1 p.i. diente der Detektion einer erfolgreichen Infektion.

Nach Infektion mit einer niedrigen Dosis von 10^7 IU Ad-CMV-GOL/Maus kam es zur erfolgreichen Eliminierung der Infektion. Das zeigte sich durch Reduktion des *in vivo* Biolumineszenz-Signals innerhalb von 20 Tagen p.i. um vier Log_{10} Stufen auf Hintergrundsignal. Des Weiteren ließen sich 20 Tage p.i. auch keine adenoviralen Genomkopien mehr im Lebergewebe der entsprechenden Versuchstiere nachweisen (**Abbildung 1 A-C**). Im Gegensatz dazu ließ sich die Infektion mit einer hohen Dosis von 10^9 IU Ad-CMV-GOL/Maus nicht vollständig eliminieren und es kam zur Persistenz der Infektion in der Leber. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 20 Tagen p.i. zeigte sich eine Abnahme des *in vivo* Biolumineszenz-Signals um lediglich eine Log_{10} Stufe (**Abbildung 1 A,B**) und über den gesamten Beobachtungszeitraum von 50 Tagen p.i. ließen sich ein *in vivo* Biolumineszenz-Signal und adenovirale Genomkopien im Lebergewebe detektieren (**Abbildung 1 A-C**).

Zusätzliche immunhistochemische Analysen des Lebergewebes zeigten die GFP-Expression auf Einzelzellebene in infizierten Hepatozyten. Die Analyse der GFP-Expression bestätigte die vollständige Eliminierung aller GFP^+ Hepatozyten innerhalb von 20 Tagen nach niedriger Infektionsdosis und das dauerhafte Vorhandensein GFP^+ Hepatozyten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 50 Tagen nach hoher Infektionsdosis (**Abbildung 2 A,B**). Allerdings nahm die GFP-Expression im zeitlichen Verlauf auch nach hoher Infektionsdosis um den Faktor 6 ab. Die GFP-Expressionslevel erreichten jedoch niemals Hintergrundsignal und somit kam es nach hoher Infektionsdosis nicht zur Eliminierung aller Virus-infizierter Hepatozyten (**Abbildung 1 und 2**).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass der Verlauf einer Ad-CMV-GOL Infektion abhängig von der Infektionsdosis unterschiedlich ist. Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis ist eine vollständige Eliminierung aller Virus-infizierter Hepatozyten nicht möglich, was eine Beeinträchtigung der lokalen antiviralen Immunantwort vermuten lässt.

Ergebnisse

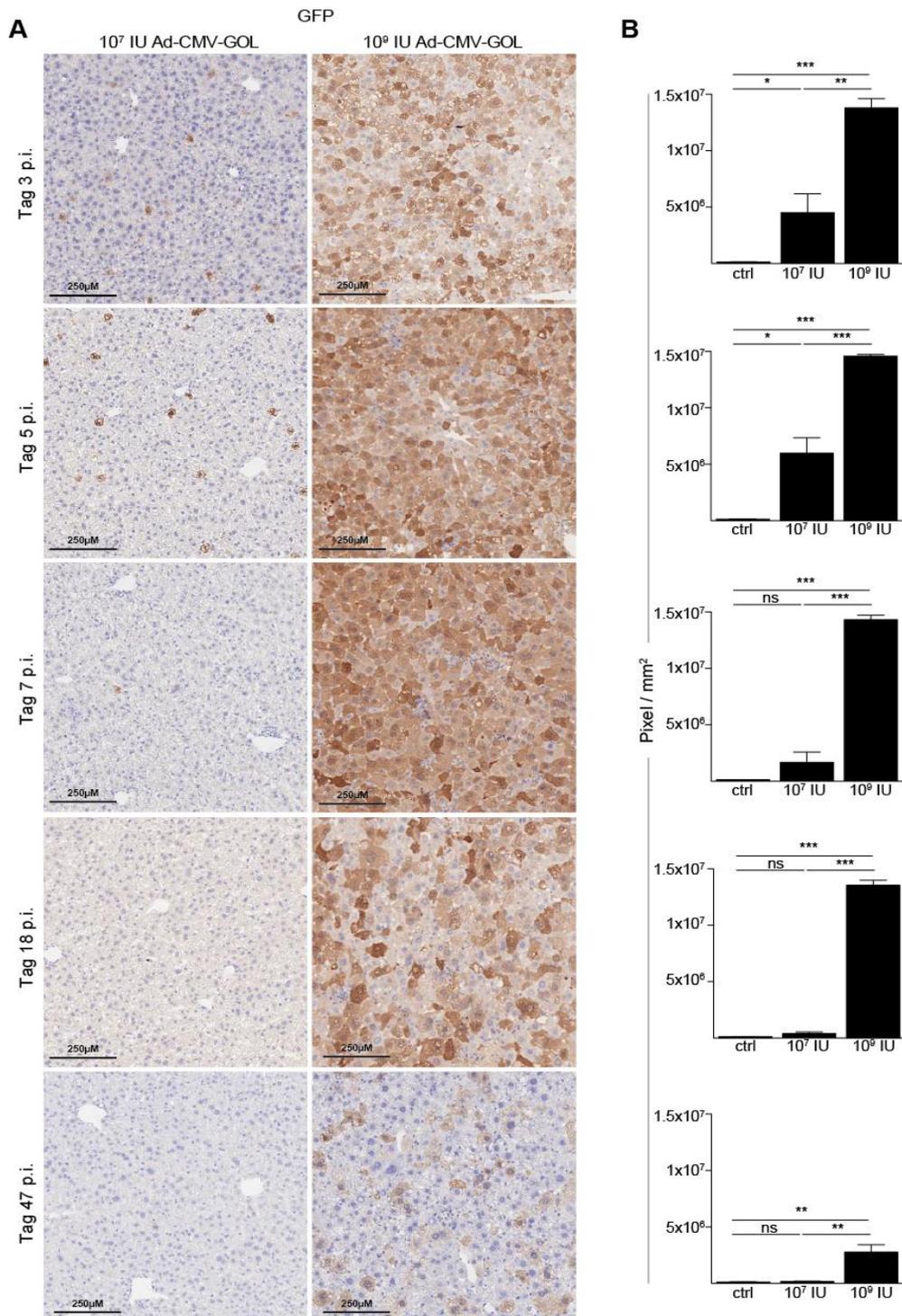


Abbildung 2: Immunhistochemische Analyse der GFP-Expression im Lebergewebe bestätigt fehlende Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis.

(A,B) Zeitkinetik nach 10⁷ IU/Maus oder 10⁹ IU/Maus Ad-CMV-GOL Infektion. **(A)** Immunhistochemische Färbung der Infektion (GFP-Expression = braun). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte. **(B)** Quantifizierung von **(A)** als Pixel/mm². **(A,B)** Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

4.3 Detektion von Leberschaden in früher Phase nach hoher adenoviraler Infektionsdosis

Ein weiterer wichtiger Parameter für den Verlauf einer viralen Infektion der Leber ist die Konzentration des Enzyms Alanin-Aminotransferase im Blutserum (sALT) der Versuchstiere. Sie hat sich als Maß für die Leberschädigung als direkter Konsequenz einer durch zytotoxische CD8 T-Zellen-vermittelten Immunantwort etabliert. Die sALT ist unter physiologischen Bedingungen nämlich nur im Zytoplasma von Hepatozyten nachweisbar und somit deutet ein Nachweis im Blutserum auf ein Zugrundegehen von Hepatozyten hin. Da das Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung des Einflusses von Leberschaden auf die Qualität antiviralen Immunantwort in der Leber ist, wurden die sALT Level über den gesamten Beobachtungszeitraum von 50 Tagen p.i. verfolgt. Als (Negativ-) Kontrollgruppe wurden uninfizierte Mäuse verwendet. Die sALT Messung an Tag 0 p.i. diente der Messung des Hintergrundsignals ohne Infektion. Die Zeitkinetik der sALT Level zeigte deutlich, dass es nach niedriger Infektionsdosis zu einem einzigen, klar definierten sALT Anstieg zwischen Tag 5 und 15 p.i. kam (100-250 U/l) (**Abbildung 3 A**). Im Gegensatz dazu kam es nach hoher Infektionsdosis bereits ab Tag 3 p.i. zu einem Anstieg der sALT Werte auf bis zu 1500 U/l an Tag 7 p.i.

Die histologische Untersuchung des Lebergewebes bestätigte die Ergebnisse der sALT Messung. Nach hoher Infektionsdosis war bereits zu einem frühen Zeitpunkt (ab Tag 3 p.i.) eine Schädigung des Lebergewebes nachweisbar. Das zeigte sich vor allem durch die ungleichmäßige Struktur des Leberparenchyms und eine weitgehende Auflösung des Zellverbandes der polygonalen Hepatozyten, welche normalerweise in balkenartigen Platten angeordnet sind. Zusätzlich konnte durch die histologische Untersuchung die Infiltration verschiedenster Immunzellen nachgewiesen werden (**Abbildung 3 B**). Das konnte auch durch eine deutliche Gewichtszunahme der Lebern nach hoher Infektionsdosis bestätigt werden (*Daten nicht gezeigt*).

Die Ergebnisse machen deutlich, dass sich niedrige und hohe Ad-CMV-GOL Infektionsdosis in Zeitpunkt und Ausmaß der Leberschädigung stark unterscheiden.

Ergebnisse

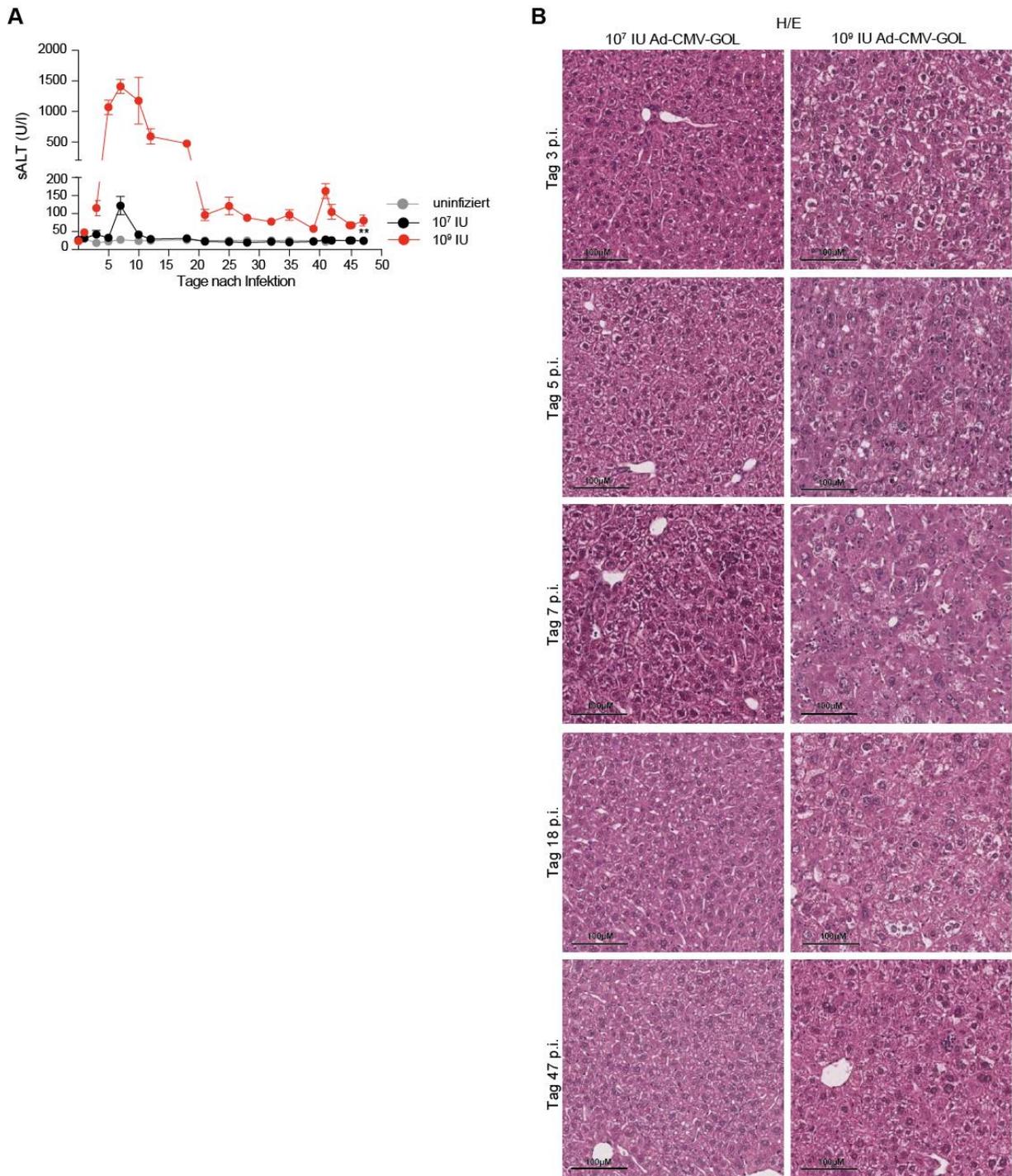
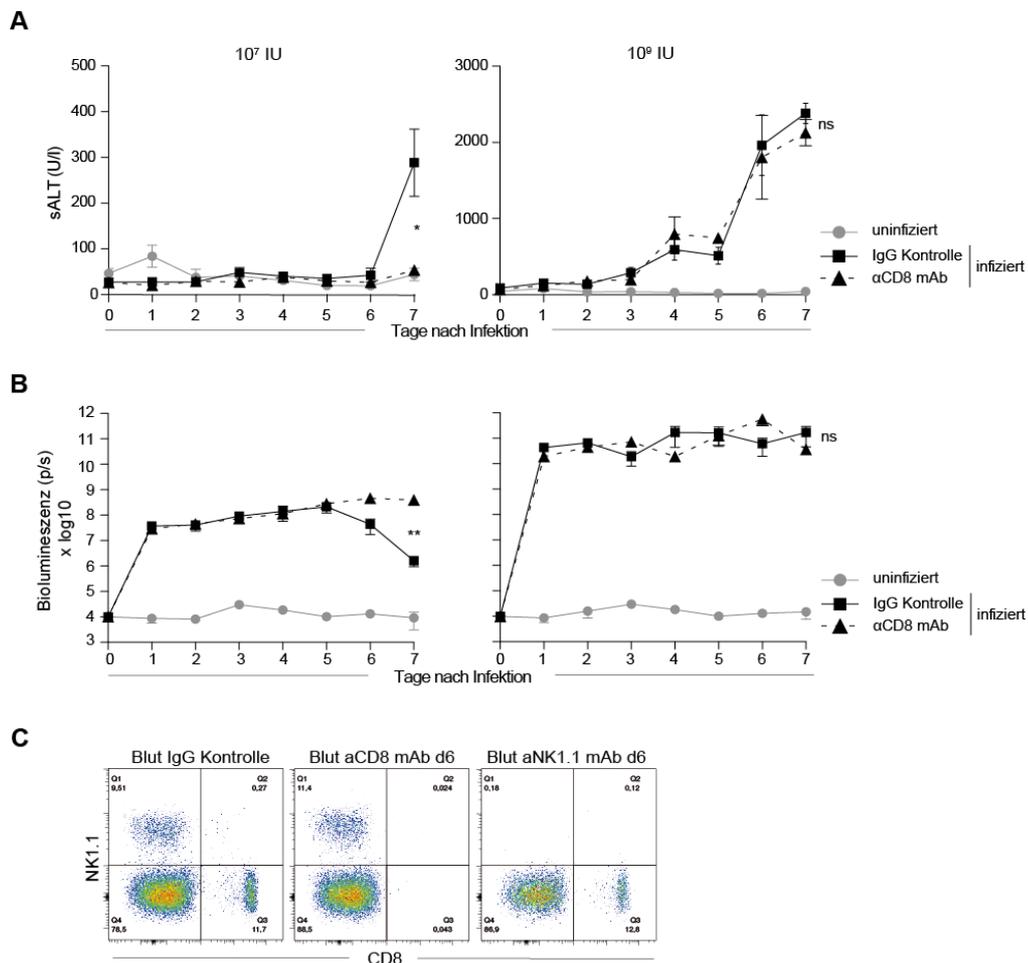


Abbildung 3: Detektion von Leberschaden und Immuneinfiltration in früher Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis.

(A-B) Zeitkinetik nach 10⁷ IU/Maus oder 10⁹ IU/Maus Ad-CMV-GOL Infektion. **(A)** Quantifizierung der Transaminaseaktivität im Serum. **(B)** H/E-Färbung von PFA-fixiertem Lebergewebe. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte. (A-B) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

4.4 Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis zeigt zweiphasige Dynamik

Die weitergehende Charakterisierung der Dynamik der Leberschädigung nach niedriger und hoher Infektionsdosis erfolgte daraufhin durch Antikörper-vermittelte Depletion von CD8 T-Zellen *in vivo*. Nach niedriger Infektionsdosis ließ sich der sALT Anstieg und die daraus resultierende Abnahme des *in vivo* Biolumineszenz-Signals durch Antikörper-vermittelte CD8 T-Zell Depletion aufheben (**Abbildung 4 A,B**). Die Überprüfung der CD8 T-Zell Depletion erfolgte 6 Tage nach Depletion durch durchflusszytometrische Analyse der CD8 T-Zellen im Blut der Versuchstiere (**Abbildung 4 C**). Das Ergebnis untermauert die zentrale Rolle von CD8 T-Zellen für die schnelle und effektive Eliminierung viraler Infektionen der Leber. Nach hoher Infektionsdosis zeigte sich hingegen eine zweiphasige Dynamik der Leberschädigung. Die erste Phase von starkem sALT Anstieg (1500-3000 U/l) zwischen Tag 3 und Tag 20 p.i. ließ sich durch *in vivo* CD8 T-Zell Depletion nicht aufheben (**Abbildung 4A**). Ebenso war kein Einfluss auf das *in vivo* Biolumineszenz-Signal detektierbar (**Abbildung 4 B**).



Ergebnisse

Abbildung 4: Leberschaden in früher Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion ist nicht CD8 T-Zell-vermittelt.

(A,B) Messung der Transaminaseaktivität im Serum und der *in vivo* Biolumineszenz nach CD8 T-Zell Depletion in früher Phase (Tag 0-7 p.i.) nach Ad-CMV-GOL Infektion (10^7 IU/Maus oder 10^9 IU/Maus). (C) Überprüfung der CD8 T-Zell Depletion im Blut der Versuchstiere (Tag 6 p.i.). (A-C) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 5$).

Die zweite Phase von schwachem, chronischem Leberschaden (100-200 U/I) zwischen Tag 20 und Tag 50 p.i. ließ sich durch *in vivo* CD8 T-Zell Depletion auf Hintergrundsignal senken (**Abbildung 5 A**). Des Weiteren konnte durch *in vivo* CD8 T-Zell Depletion die Abnahme des *in vivo* Biolumineszenz-Signals um eine Log_{10} Stufe nicht signifikant abgemindert werden (**Abbildung 5 B**).

Zusätzliche immunhistochemische Analysen des Lebergewebes zeigten die GFP-Expression auf Einzelzellebene in infizierten Hepatozyten und konnten verdeutlichen, dass nach *in vivo* CD8 T-Zell Depletion deutlich weniger Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 50 Tagen eliminiert werden konnten (**Abbildung 5 C,D**).

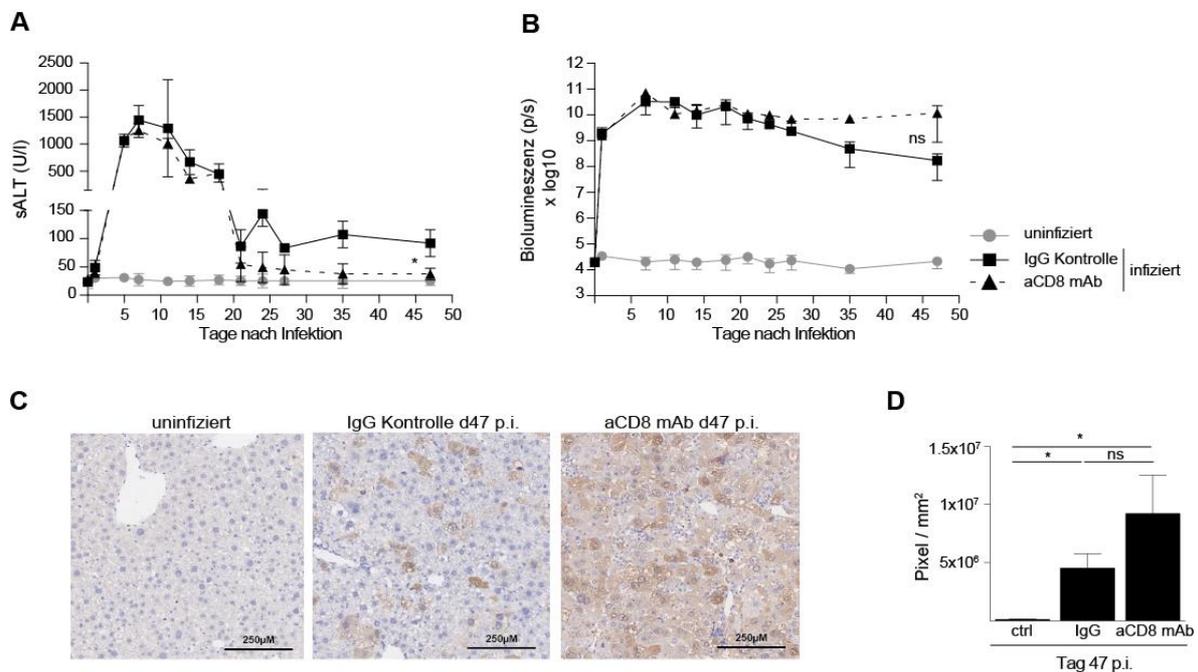


Abbildung 5: Leberschaden in später Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion ist CD8 T-Zell-vermittelt.

(A,B) Messung der Transaminaseaktivität im Serum und der *in vivo* Biolumineszenz nach CD8 T-Zell Depletion über den gesamten Beobachtungszeitraum (Tag 0-50 p.i.) nach Infektion (10^9 IU/Maus). (C) Immunhistochemische Färbung der Infektion (10^9 IU/Maus an Tag 47 p.i.) (GFP-Expression = braun). Gezeigt

Ergebnisse

sind repräsentative Ausschnitte. **(D)** Quantifizierung von (C) als Pixel/mm². (A-D) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, CD8 T-Zellen für die Kontrolle der viralen Infektion mit niedriger Infektionsdosis ausschlaggebend sind, wohingegen sie nach hoher Infektionsdosis, wenn überhaupt, erst spät zur Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten beitragen. Im Kontext der akuten-selbstlimitierenden Infektion korreliert der CD8 T-Zell-vermittelte Leberschaden also mit einer effektiven antiviralen Immunantwort. Im Gegensatz dazu zeigt die vorliegende Arbeit, dass Infektion mit einer hohen Dosis des Ad-CMV-GOL Virus zu einer fehlenden Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten führt und somit von einem Defekt in der antiviralen Immunantwort auszugehen ist.

4.5 Hinweise auf innate Immunaktivierung in früher Phase nach hoher adenoviraler Infektionsdosis

Oberflächenfärbung für CD8, CD3, NK1.1 (PK136) und CD49b (DX5) auf Lymphozyten aus Leber und Milz konnte eine deutliche Zunahme von NK1.1⁺ CD49b⁻ NK-Zellen in der Leber hoch infizierter Versuchstiere zeigen. Auch die Anzahl der gesamten CD8 T-Zell Population war in der Leber hoch infizierter Versuchstiere erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Anzahl CD3⁺ CD8⁻ T-Zellen (NKT-Zellen und CD4 T-Zellen) und NK1.1⁺ CD49b⁺ NK-Zellen kaum ein Unterschied zwischen niedrig und hoch infizierten Versuchstieren. In der Milz waren die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen allgemein deutlich schwächer ausgeprägt (**Abbildung 6 A,B**).

Der Aktivierungszustand von CD8 T-Zellen und NK-Zellen sollte durch Färbung des Degranulationsmarkers Lamp-1 (CD107a) untersucht werden. Eine deutliche Hochregulation von Lamp-1 deutet dabei auf die Ausübung von Effektorfunktionen hin (Aktas, Kucuksezer, Bilgic, Erten, & Deniz, 2009) (Alter, Malenfant, & Altfeld, 2004). Nach adenoviraler Infektion zeigten ausschließlich NK-Zellen aus der Leber hoch infizierter Versuchstiere eine deutliche Hochregulation von Lamp-1 an Tag 6 p.i. (**Abbildung 6 C,D**). An Tag 3 nach niedriger Infektionsdosis war eine Hochregulation von Lamp-1 auf einer kleinen Subpopulation von CD8 T-Zellen in der Leber detektierbar, wohingegen an Tag 3 nach hoher Infektionsdosis die gesamte CD8 T-Zell Population in der Leber eine schwache Hochregulation von Lamp-1 aufwies (**Abbildung 6 C,D**).

Ergebnisse

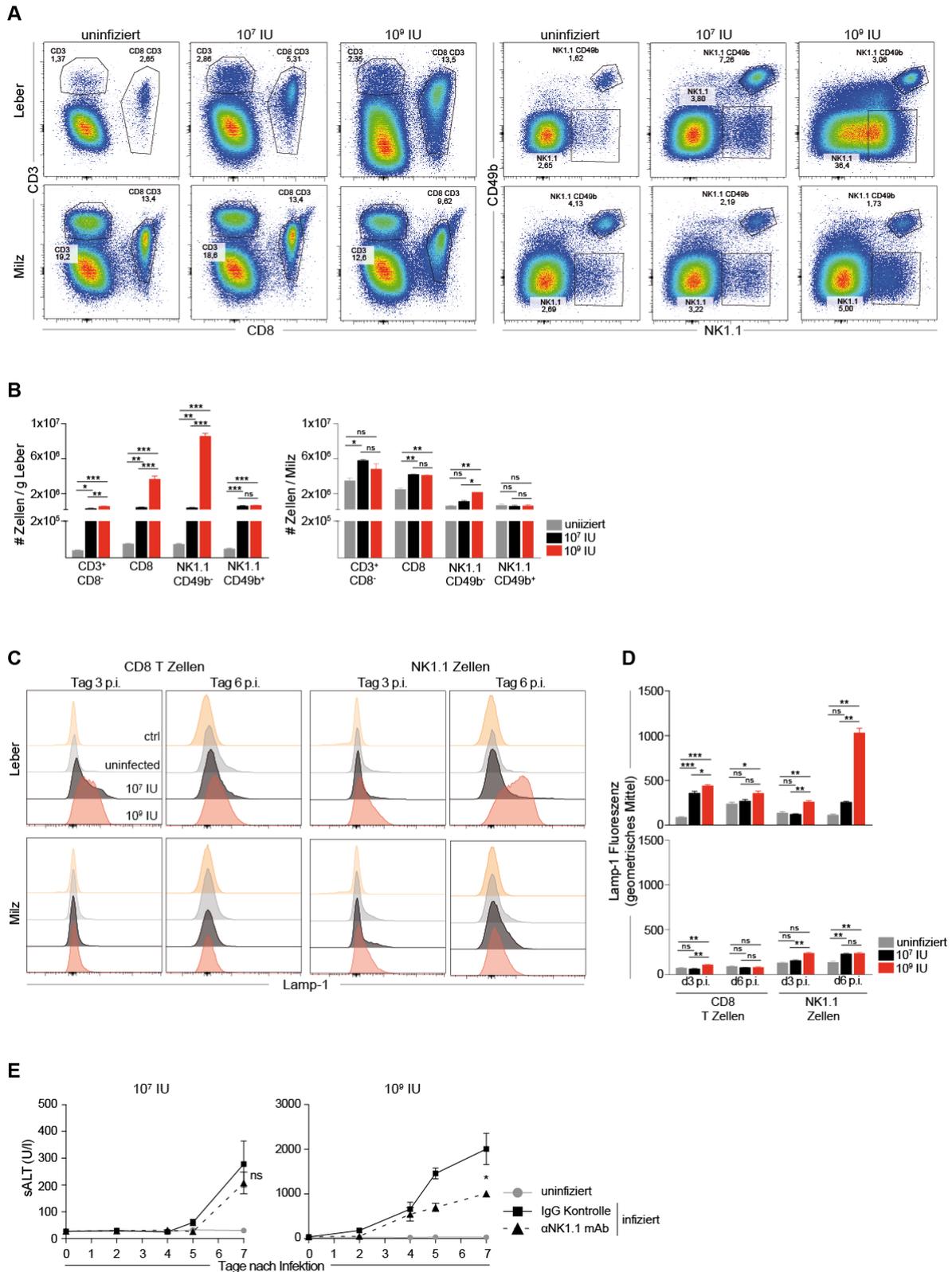


Abbildung 6: Innate Immunaktivierung in früher Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der CD8, CD3, NK1.1 und CD49b Expression auf Lymphozyten aus Leber und Milz (10^7 IU/Maus oder 10^9 IU/Maus an Tag 6 p.i.). (B) Quantifizierung der verschiedenen Immunzellpopulationen aus (A). (C) Durchflusszytometrische Analyse der Lamp-1 Expression auf CD8 T-

Ergebnisse

Zellen und NK-Zellen. **(D)** Geometrisches Mittel der Lamp-1 Fluoreszenz aus (C). **(E)** Messung der Transaminaseaktivität im Serum nach NK-Zell Depletion in früher Phase (Tag 0-7 p.i.) nach Ad-CMV-GOL Infektion (10^7 IU/Maus oder 10^9 IU/Maus). (A-E) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 5$).

NK-Zell Aktivierung konnte durch Antikörper-vermittelte NK-Zell Depletion *in vivo* bestätigt werden. NK-Zell Depletion konnte den Leberschaden in der frühen Phase nach hoher Infektionsdosis um 50% abmildern (**Abbildung 6 E**). Im Kontext der niedrigen Infektionsdosis ließ sich kein Einfluss von NK-Zell Aktivierung auf das Ausmaß des Leberschadens nachweisen (**Abbildung 6 C-E**).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nach hoher adenoviraler Infektionsdosis zu verstärkter innater Immunaktivierung kommt, was sich durch gesteigerte NK-Zell Aktivität ausdrückt. Folglich kommt es in der frühen Phase nach hoher Infektionsdosis zur Eliminierung eines Teils der Virus-infizierten Hepatozyten durch NK-Zellen. Offen bleibt die Frage, wodurch der Leberschaden in der frühen Phase nach hoher adenoviraler Infektionsdosis noch induziert wird. Weitergehende Untersuchungen in diese Richtung brachten keine Aufklärung (*Daten nicht gezeigt*).

4.6 Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis geht mit einer Abnahme der Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher

Es ist bekannt, dass Virus-spezifische CD8 T-Zellen entscheidend an der Elimination viraler Infektionen der Leber beteiligt sind (P. A. Knolle & Thimme, 2014) (Rehermann, 2013). Aus diesem Grund sollte die CD8 T-Zell Antwort nach niedriger und hoher adenoviraler Infektionsdosis weitergehend untersucht werden. Die zuvor in Versuchstiere transferierten CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen wurden deshalb zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion reisoliert und ihre Anzahl wurde, mit Hilfe sogenannter *Counting Beads*, absolut quantifiziert. *Counting beads* werden in definierter Menge jeder durchflusszytometrischen Probe zugegeben und anschließend lässt sich durch Berechnung auf die entsprechende absolute Zellzahl im gesamten Organ hochrechnen. Einen Tag vor Infektion wurden den Versuchstieren 100 naive CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen gespritzt. Dabei entspricht die Zahl von 100 naiven Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen in etwa dem natürlichen Repertoire an klonalen Antigen-spezifischen Zellen. Die Gesamtmenge von CD8 T-Zellen (Virus-spezifisch und Virus-unspezifisch) in der Leber erhöhte sich unabhängig von der Infektionsdosis bis Tag 7 p.i. um

Ergebnisse

zwei Log₁₀ (**Abbildung 7 A**). Dieser Infektionsdosis-unabhängige Anstieg konnte, in schwächerem Ausmaß, auch in der Milz beobachtet werden (**Abbildung 7 A**).

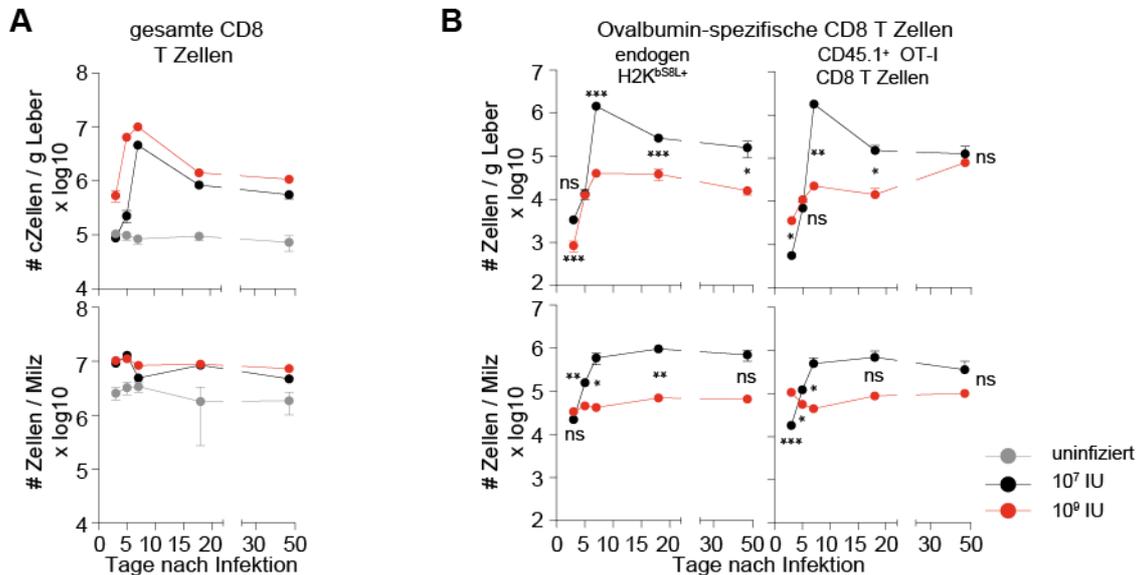


Abbildung 7: Vermindert Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zelle nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion.

(A-B) Zeitkinetik nach 10⁷ IU/Maus oder 10⁹ IU/Maus Ad-CMV-GOL Infektion. (A) Quantifizierung der gesamten CD8 T-Zell Population. (B) Quantifizierung der endogenen Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen und der adoptiv transferierten CD45.1⁺ Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Zellen. (A-B) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

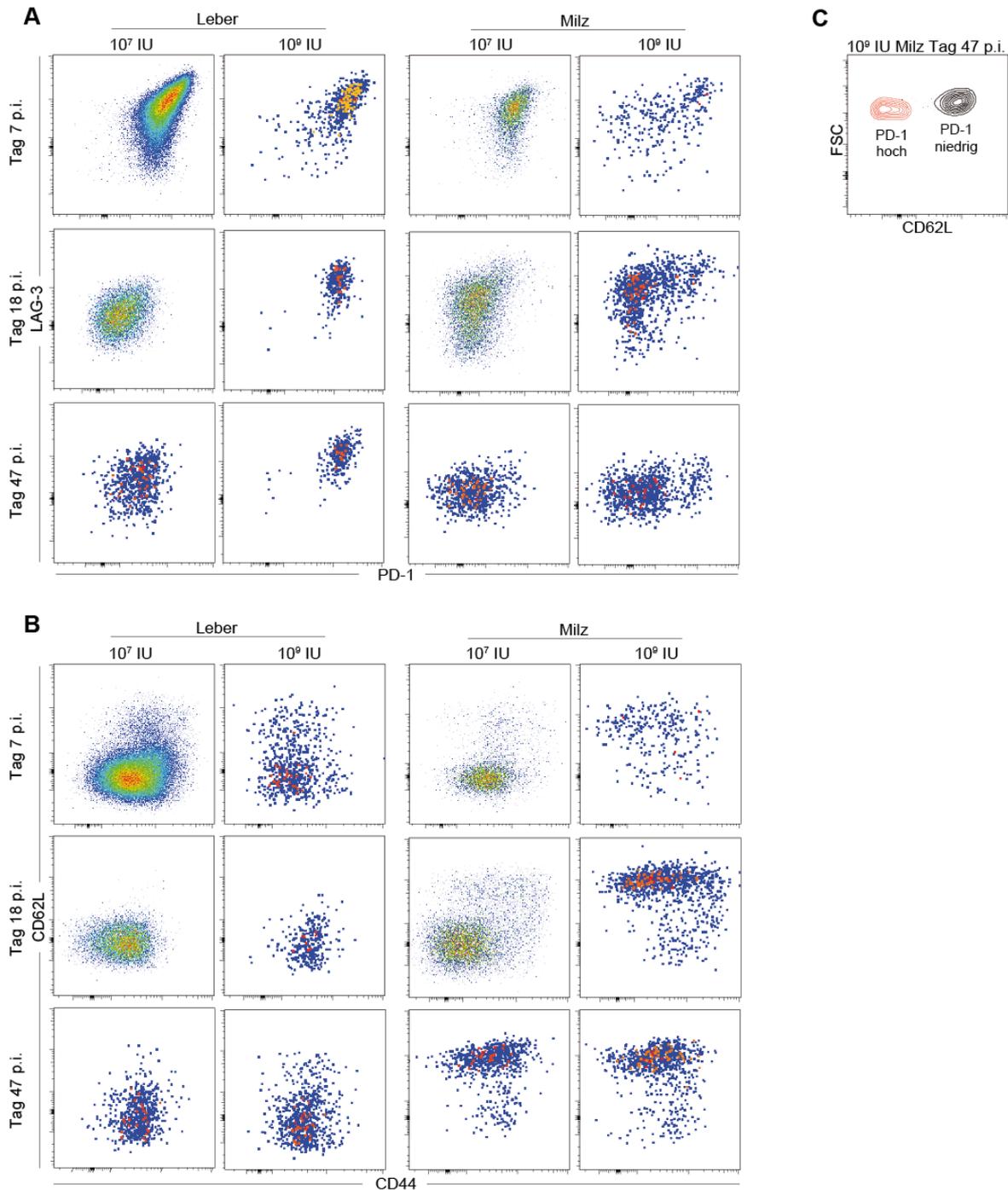
Die Anzahl der Virus-spezifischen CD8 T-Zellen nach niedriger Infektionsdosis stieg innerhalb von 7 Tagen p.i. um drei Log₁₀ auf über 10⁶ Zellen an und sank dann wieder um eine Log₁₀ (**Abbildung 7 B**). Das spiegelt wahrscheinlich die Kontraktion von CD8 T-Zellen nach erfolgreicher Elimination infizierter Hepatozyten wider. Im Gegensatz dazu expandierten die Virus-spezifischen CD8 T-Zellen nach hoher Infektionsdosis zwar in der gleichen Dynamik, allerdings stoppte die Expansion bei einer Zahl von ungefähr 5 x 10⁴ Zellen (**Abbildung 7 B**). In der Milz konnte unabhängig von der Infektionsdosis eine wesentliche Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen an Tag 3 p.i. nachgewiesen werden (**Abbildung 7 B**). Das deutet auf *Priming* und Expansion von CD8 T-Zellen in lymphoidem Gewebe hin. Nach niedriger Infektionsdosis stieg die Zellzahl weiter an, während sie nach hoher Infektionsdosis stagnierte (**Abbildung 7 B**).

Die Dynamik der Expansion Virus-spezifischer CD8 T-Zellen ist somit nach beiden Infektionsdosen vergleichbar. Nach hoher Infektionsdosis und damit einhergehendem

Ergebnisse

Leberschaden kommt es jedoch zur Stagnation der CD8 T-Zell Expansion und somit zu reduzierten CD8 T-Zell Zahlen in der Leber und im lymphoiden Gewebe.

4.7 Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis geht mit phänotypischen Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher



Ergebnisse

Abbildung 8: Phänotypische Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zelle nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion.

(A-B) Zeitkinetik nach 10^7 IU/Maus oder 10^9 IU/Maus Ad-CMV-GOL Infektion. **(A)** Durchflusszytometrische Analyse der PD-1 und LAG-3 Expression auf adoptiv transferierten CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse der CD44 und CD62L Expression auf adoptiv transferierten CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse der CD62L Expression auf PD-1^{hoch} und PD-1^{niedrig} Subpopulationen von adoptiv transferierten CD45.1⁺ CD8 T-Zellen in der Milz (10^9 IU/Maus). (A-C) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 5$).

Im chronischen Infektionsverlauf ist oftmals eine Regulation der CD8 T-Zell-vermittelten Immunantwort auf verschiedenen Ebenen zu beobachten (P. A. Knolle, Bottcher, & Huang, 2015). Während einer akut-selbstlimitierenden Infektion werden im Normalfall naive CD8 positive T-Zellen aktiviert und differenzieren innerhalb von 1-2 Wochen zu CD8 Effektorzellen aus. Die Differenzierung geht mit starker Proliferation und Expansion, metabolischer Reprogrammierung und der Ausbildung von CD8 Effektorfunktionen einher (Kaech & Cui, 2012). Im Unterschied dazu sind im chronischen Infektionsverlauf Veränderungen in der Funktion und in der Genexpression Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nachweisbar (Wherry & Kurachi, 2015). Um eine Aussage über den Einfluss von Leberschaden auf die Qualität der antiviralen Immunantwort machen zu können, ist es wichtig auch den Phänotyp der Virus-spezifischen CD8 T-Zellen zu untersuchen. Funktionell eingeschränkte CD8 T-Zellen zeichnet eine erhöhte und dauerhafte Expression ko-inhibitorischer Moleküle wie PD-1 und LAG-3 aus (Barber et al., 2006) (Macon-Lemaitre & Triebel, 2005). Es handelt es sich um wichtige negative Regulatoren der CD8 T-Zell-Antwort, wodurch sie im günstigsten Fall auch Autoreaktivität und Immunpathologie kontrollieren (Sharpe, Wherry, Ahmed, & Freeman, 2007). PD-1 wird jedoch auch während CD8 T-Zell-Aktivierung schnell hochreguliert. Das bedeutet, dass PD-1 Expression nicht als alleiniges Merkmal für eine Einschränkung der CD8 T-Zell Funktion herangezogen werden kann. Vielmehr deutet eine kontinuierlich hohe PD-1 Expression in Kombination mit einer Reihe weiterer ko-inhibitorischer Rezeptoren, wie zum Beispiel LAG-3, Tim-3 und CTLA-4, auf eingeschränkte CD8 T-Zell Funktion hin (Araki, Youngblood, & Ahmed, 2013) (Blackburn, Shin, Freeman, & Wherry, 2008) (Blackburn et al., 2009).

Die phänotypische Analyse der Virus-spezifischen CD8 T-Zellen nach niedriger und hoher Infektionsdosis ergab in diesem Zusammenhang, dass alle Virus-spezifischen CD8 T-Zellen, unabhängig von der Infektionsdosis, an Tag 7 p.i. eine erhöhte Expression der ko-inhibitorischen Moleküle PD-1 und LAG-3 zeigten (**Abbildung 8 A**), was zunächst einmal auf CD8 T-Zell Aktivierung nach niedriger und hoher Infektionsdosis hindeutet. An Tag 18

Ergebnisse

und 47 p.i. waren die PD-1 und LAG-3 Expressionslevel auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus Lebern niedrig infizierter Versuchstiere deutlich geringer ausgeprägt, als auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus Lebern hoch infizierter Mäuse (**Abbildung 8 A**). Diese zeigten kontinuierlich hohe PD-1 und LAG-3 Expressionslevel über den gesamten Beobachtungszeitraum von 50 Tagen p.i. (**Abbildung 8 A**). Auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus der Milz konnte kein Unterschied in der Dynamik der PD-1 und LAG-3 Expressionslevel nach niedriger und hoher Infektionsdosis beobachtet werden. Auffallend war, dass ein kleiner Teil Virus-spezifischer CD8 T-Zellen in der Milz hoch infizierter Mäuse an Tag 47 p.i. erhöhte PD-1 Expressionslevel zeigte (**Abbildung 8 A**).

Die Expression von CD62L (L-Selektin) auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen wurde ebenfalls untersucht. Dabei handelt es sich um einen *Homing*-Rezeptor, welcher es naiven CD8 T-Zellen ermöglicht in die sekundären lymphatischen Gewebe zu gelangen (Warnock, Askari, Butcher, & von Andrian, 1998). CD8 Effektorzellen regulieren CD62L runter und gleichzeitig andere Integrine und Selektin-Liganden hoch, um Zugang zu den entsprechenden peripheren Organen zu bekommen (Dudda et al., 2005). Damit übereinstimmend zeigten Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Leber zu jedem Untersuchungszeitpunkt verminderte CD62L Expressionslevel (**Abbildung 8 B**). In der Milz zeigten Virus-spezifische CD8 T-Zellen zu frühem Zeitpunkt nach niedriger Infektionsdosis niedrige CD62L Expressionslevel, was ihnen das Einwandern in die infizierte Leber ermöglicht. An Tag 47 p.i. jedoch zeigten sie deutlich erhöhte CD62L Expression (**Abbildung 8 B**). Im Gegensatz dazu, zeigte der Großteil Virus-spezifischer CD8 T-Zellen aus der Milz hoch infizierter Versuchstiere über den gesamten Beobachtungszeitraum von 50 Tagen hohe CD62L Expressionslevel (**Abbildung 8 B**). Allerdings existiert ein kleiner Teil Virus-spezifischer CD8 T-Zellen in der Milz hoch infizierter Versuchstiere, welcher an Tag 47 p.i. gleichzeitig eine hohe PD-1 Expression und eine niedrige CD62L Expression zeigte (**Abbildung 8 C**).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Virus-spezifische CD8 T Zellen aus der Leber hoch infizierter Versuchstiere durchgehend hohe Expressionslevel der ko-inhibitorischen Moleküle PD-1 und LAG-3 zeigen, was auf eine funktionelle Einschränkung der entsprechenden Zellen schließen lässt. Gleichzeitig exprimieren Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Milz hoch infizierter Versuchstiere durchgehend CD62L, was darauf hindeutet, dass sie aus irgendeinem Grund in sekundären lymphatischen Organen zurückgehalten werden, um sie dem regulatorischen Milieu der Leber zu entziehen.

4.8 Quantitative und phänotypische Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen aus geschädigtem Lebergewebe korrelieren mit Dysfunktionalität

Virale Infektionen induzieren in der Regel eine zelluläre Immunantwort vom Typ 1. Dieser Typ von Immunantwort fördert die Differenzierung von naiven CD8 T-Zellen zu CTLs, die nachfolgend Virus-infizierte Zellen direkt abtöten, oder auch Zytokine wie IFN γ ⁴⁵, TNF und IL-2 freisetzen (Kaech & Cui, 2012), welche dann indirekt Virus-infizierte Zellen abtöten.

In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die erhöhte und dauerhafte Expression ko-inhibitorischer Moleküle auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus Lebern hoch infizierter Versuchstiere mit einem Funktionsverlust von CD8 Effektorzellen einhergeht. Aus diesem Grund wurden Lymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion *ex vivo* restimuliert und die Fähigkeit zur IFN γ und TNF Produktion von CD45.1+ CD8 T-Zellen untersucht. Dabei erfolgte sowohl TZR-abhängige Restimulation mit SIINFEKL-Peptid, als auch TZR-unabhängige Restimulation mit PMA⁴⁶/Ionomycin. Bei PMA handelt es sich um ein kleines organisches Molekül, welches durch die Zellmembran diffundiert und nachfolgend im Zytoplasma die Proteinkinase C aktivieren kann. Dadurch wird die Stimulation über den TZR umgangen. Bei Ionomycin handelt es sich um ein Calciumionophor, welches genutzt wird, um die Calciumfreisetzung zu triggern, die für die NFAT-Signalweiterleitung benötigt wird.

Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Leber hoch infizierter Mäuse produzierten, im Gegensatz zu entsprechenden Zellen aus der Leber niedrig infizierter Mäuse, nach Antigen-spezifischer Restimulation weder IFN γ noch TNF (**Abbildung 9 A-D**). Die Beobachtung lässt vermuten, dass Virus-spezifische CD8 T-Zellen im Kontext einer hohen Infektionsdosis dysfunktional sind. Da die Produktion von IFN γ und TNF nach TZR-unabhängiger Restimulation mit PMA/Ionomycin in beiden Fällen nicht beeinträchtigt war, ist davon auszugehen, dass in Virus-spezifischen CD8 T-Zellen hoch infizierter Mäuse die TZR-Signalweiterleitung beeinträchtigt ist (**Abbildung 9 A-D**).

⁴⁵ engl.: Interferon gamma

⁴⁶ engl.: Phorbol 12-myristate 13-acetate

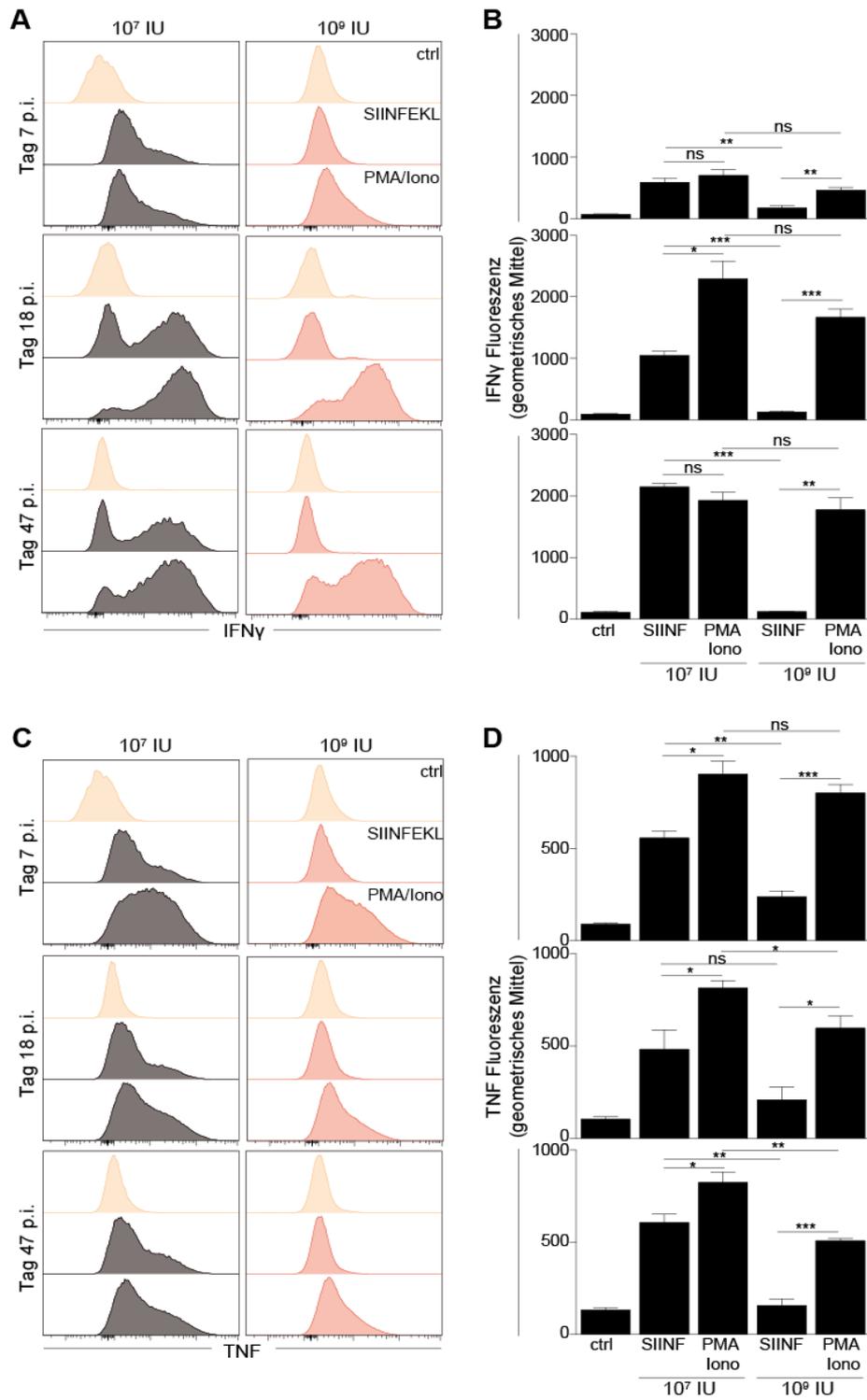


Abbildung 9: Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion produzieren Virus-spezifische CD8 T-Zellen nach Antigen-spezifischer Restimulation keine Effektorzytokine.

(A-D) Zeitkinetik nach 10⁷ IU/Maus oder 10⁹ IU/Maus Ad-CMV-GOL Infektion. (A) Durchflusszytometrische Analyse der IFN γ Produktion nach Restimulation adoptiv transferierter CD45.1⁺ CD8 T-Zellen mit SIINFEKL-Peptid oder PMA/Ionomycin. (B) Geometrisches Mittel der IFN γ Fluoreszenz aus (A). (C) Durchflusszytometrische Analyse der TNF Produktion nach Restimulation adoptiv transferierter CD45.1⁺ CD8 T-Zellen mit SIINFEKL-Peptid oder PMA/Ionomycin. (D) Geometrisches Mittel der TNF Fluoreszenz aus (C). (A-D) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n \geq 3).

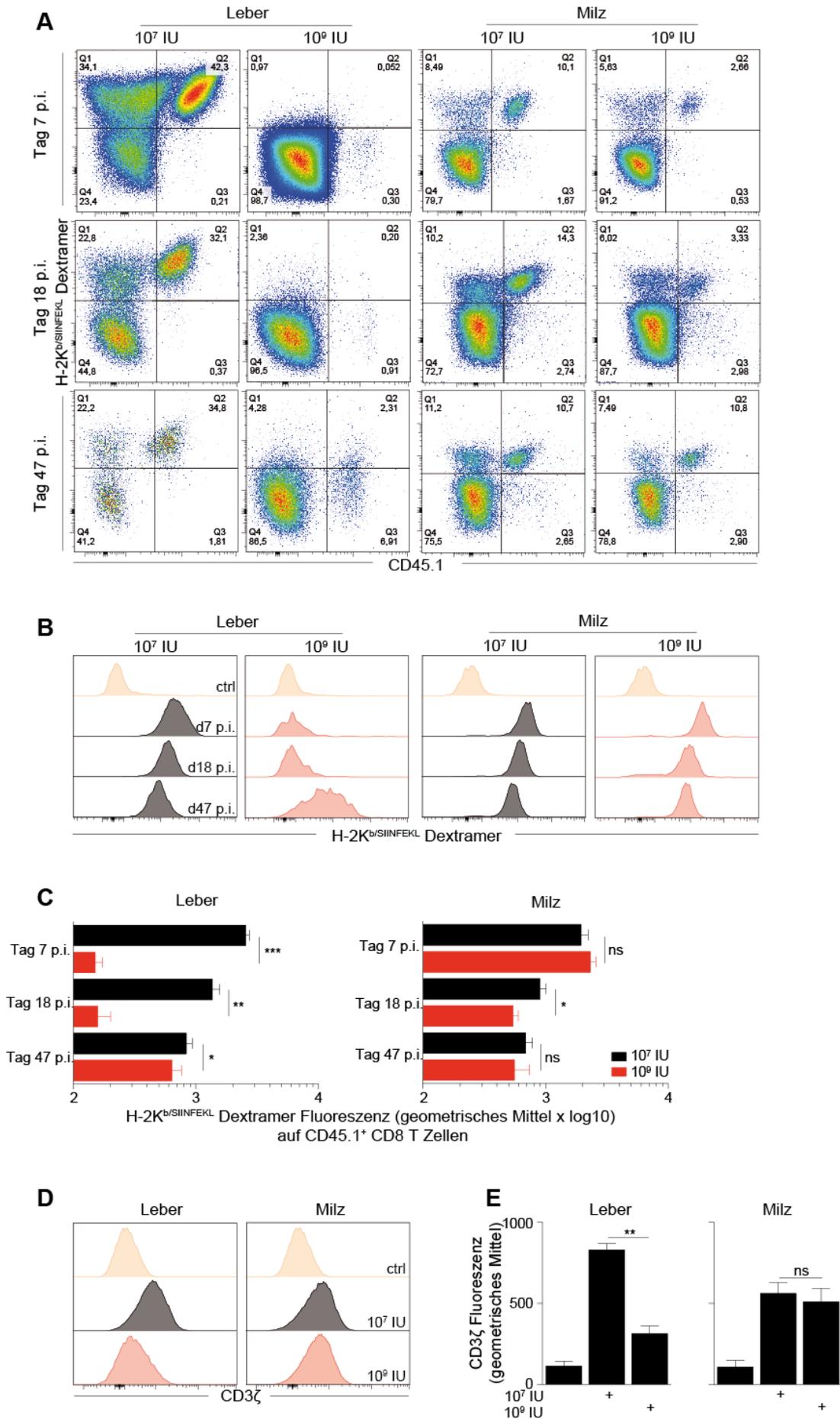
4.9 Leberschaden nach hoher adenoviraler Infektionsdosis geht mit Verlust von T-Zell-Rezeptoren von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen einher

Da die Versuche Hinweise auf einen Defekt in der TZR-Signalweiterleitung in Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus Lebern hoch infizierter Mäuse gaben, sollte im Folgenden die Anzahl der SIINFEKL-spezifischen TZR auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen quantifiziert werden. Dafür wurden PE⁴⁷-gekoppelte H-2K^b/SIINFEKL Dextramere verwendet, die von CD8 T-Zellen, welche spezifisch für das Ovalbumin-Peptid SIINFEKL sind, gebunden werden. An Tag 7 p.i. waren CD45.1⁺ CD8 T-Zellen aus der Leber niedrig infizierter Versuchstiere in großer Zahl nachweisbar und konnten große Mengen Dextramer binden. Die Zahl der CD45.1⁺ CD8 T-Zellen aus der Leber hoch infizierter Versuchstiere war deutlich geringer und diejenigen Zellen, welche noch nachweisbar waren, konnten keine H-2K^b/SIINFEKL Dextramere binden (**Abbildung 10 A-C**). Die gleiche Beobachtung traf auf endogene Virus-spezifische CD8 T-Zellen zu. Erst ab Tag 47 p.i. konnte in der Leber hoch infizierter Versuchstiere eine geringe Anzahl H-2K^b/SIINFEKL Dextramer positiver CD45.1⁺ CD8 T-Zellen nachgewiesen werden, was auf einer teilweisen Regenerierung der TZR-Oberflächenexpression hindeutet (**Abbildung 10 A-C**). In der Milz konnten hingegen nach niedriger und hoher Infektionsdosis zu jedem Zeitpunkt H-2K^b/SIINFEKL Dextramer positive CD45.1⁺ CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 10 A-C**). Da diese, wie im vorangehenden Abschnitt gezeigt, hohe CD62L Expressionslevel aufwiesen, wurden diese Zellen in den lymphatischen Organen zurückgehalten. Des Weiteren war auch die intrazelluläre TZR-Signalweiterleitungsdomäne CD3 ζ in Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus Lebern hoch infizierter Versuchstieren schwächer exprimiert (**Abbildung 10 D,E**).

Somit konnte gezeigt werden, dass die wenigen Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus der Leber hoch infizierter Versuchstiere keine T-Zell-Rezeptoren mehr auf ihrer Oberfläche tragen. Zusätzlich weisen sie auch eine geringere Expression der TZR-Signalweiterleitungsdomäne CD3 ζ auf.

⁴⁷ engl.: Phycoerythrin

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 10: Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus geschädigtem Lebergewebe zeigen verminderte Expression von T-Zell-Rezeptoren an ihrer Oberfläche.

(A-C) Zeitkinetik nach 10^7 IU/Maus oder 10^9 IU/Maus Ad-CMV-GOL Infektion. (A,B) Durchflusszytometrische Analyse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit adoptiv transferierter CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. (C) Geometrisches Mittel der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Fluoreszenz aus (B). (D) Durchflusszytometrische Analyse der Expression der T-Zell-Rezeptor Signalweiterleitungs-Domäne CD3 ζ in adoptiv transferierten CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. (E) Geometrisches Mittel der CD3 ζ Fluoreszenz aus (D). (A-E) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n \geq 5).

4.10 Leberschaden-induzierter Verlust von T-Zell-Rezeptoren nur nach Antigenerkennung in der Leber

Allein durch die Färbung mit H-2K^b/SIINFEKL Dextrameren ließ sich keine Aussage darüber treffen, ob die gesamte CD8 T-Zell Population von dem Verlust der T-Zell-Rezeptoren betroffen war, oder, ob es sich um einen Antigen-spezifischen Effekt handelte. Zusätzlich sollte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete TZR-Verlust auf einer fehlerhaften Bindung des H-2K^b/SIINFEKL Dextramers beruht.

Da OT-I CD8 T-Zellen den transgenen TZR V α 2/V β 5 mit Spezifität für das Ovalbumin-Peptid SIINFEKL an ihrer Oberfläche tragen (Miyagawa, Gutermuth, Zhang, & Katz, 2010), wurde eine Antikörper-basierte Färbung der TZR V α 2/V β 5-Ketten und somit des transgenen TZR durchgeführt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden einerseits die adoptiv transferierten CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen und andererseits wurde die gesamte Population CD45.1⁻ CD8 T-Zellen untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Anzahl TZR V α 2⁺ und TZR V β 5⁺ CD8 T-Zellen und somit Antigen-unspezifischer CD8 T-Zellen in der Leber hoch infizierter Versuchstiere erhöht war. Die Anzahl endogener CD45.1⁻ und adoptiv transferierter CD45.1⁺ TZR V α 2/V β 5 doppelt positiver und somit Antigen-spezifischer CD8 T-Zellen in der Leber hoch infizierter Versuchstiere war dagegen deutlich reduziert. Die Ergebnisse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Färbung ließen sich somit durch klassische Antikörper Färbung bestätigen (**Abbildung 11 A,B**).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nur in CD8 T-Zellen auftritt, die ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen.

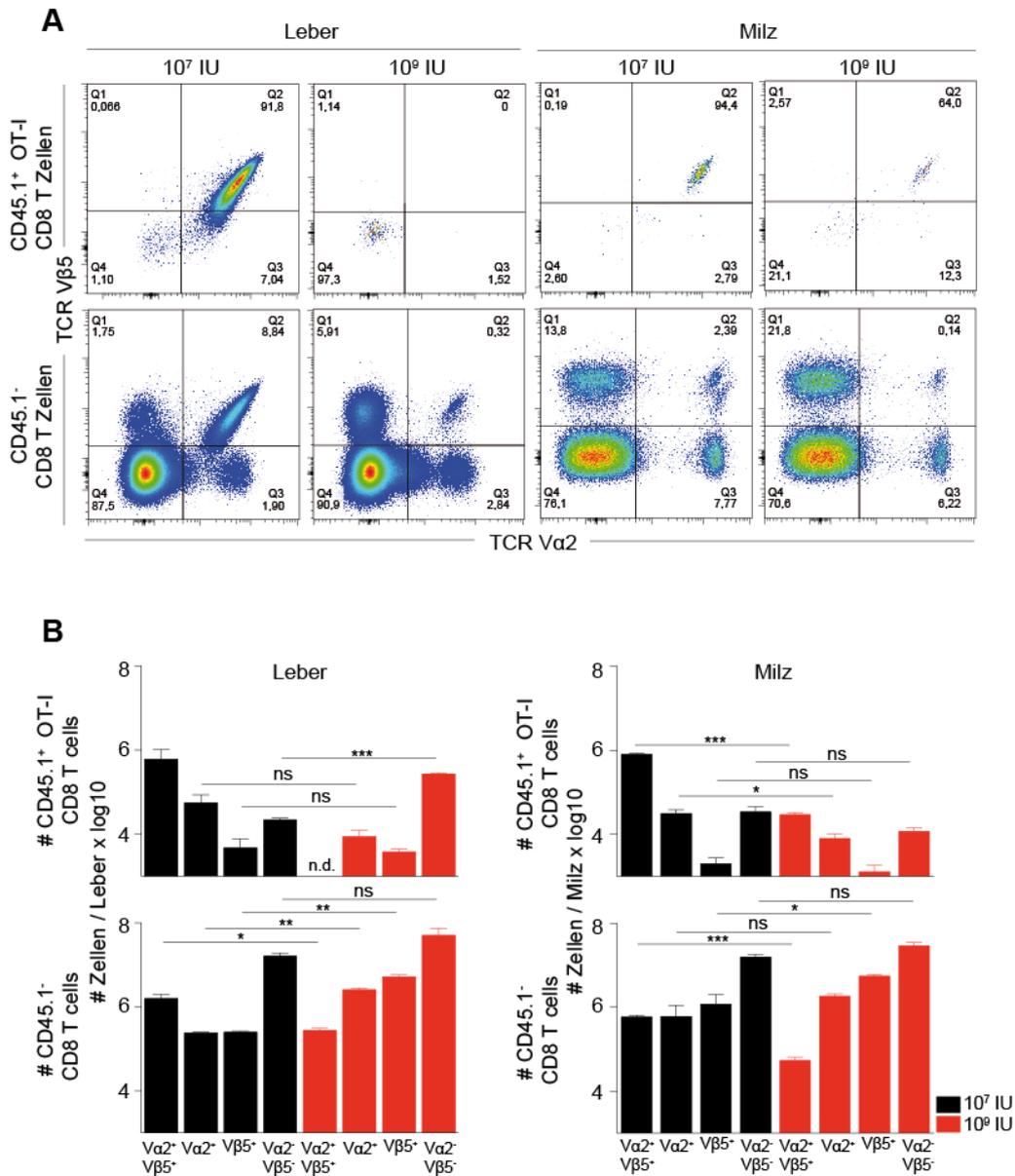


Abbildung 11: Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen, wenn diese ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der TZR Vα2 und TZR Vβ5 Expression auf endogenen und adoptiv transferierten CD8 T-Zellen. (B) Quantifizierung der TZR Vα2⁺ und/oder TZR Vβ5⁺ Zellen aus (A). (A-B) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

4.11 Verlust von T-Zell-Rezeptoren korreliert mit verminderter Zytotoxizität Virus-spezifischer CD8 T-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus hoch infizierten Lebern keine TZR-Oberflächenexpression mehr aufweisen. Entsprechend stellte sich die Frage, ob diese Tatsache direkten Einfluss auf die Effektorfunktion und somit die Fähigkeit zur Elimination Virus-infizierter Zellen hat.

Das zytotoxische Potential Virus-spezifischer CD8 T-Zellen aus niedrig und hoch infizierten Versuchstieren wurde mittels Impedanz-basiertem *in vitro Killing Assay* untersucht. Dafür wurden CD45.1⁺ CD8 T-Zellen an Tag 8 p.i. nach niedriger und hoher Infektionsdosis aus Leber und Milz isoliert. Anschließend wurden diese Zellen mit SIINFEKL-beladenen primären murinen Hepatozyten in einem *Effektor/Target*-Verhältnis von 5:1 inkubiert und die Zellviabilität wurde dann in Echtzeit mittels xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) verfolgt. Die Analyse der T-Zell Zytotoxizität in Zeitkinetik zeigte, dass hepatische Virus-spezifische CD8 T-Zellen niedrig infizierter Mäuse die Zielzellen effektiv innerhalb von 1-5 Stunden eliminieren konnten, während entsprechende Zellen aus hoch infizierten Mäusen zu keinem Zeitpunkt Zytotoxizität zeigten (**Abbildung 12 A**). Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Milz hoch infizierter Mäuse konnten circa 50% der Zielzellen eliminieren (**Abbildung 12 A**). Die Unterschiede in der Zytotoxizität korrelierten direkt mit dem TZR Expressionslevel (**Abbildung 12 B,C**). Interessanterweise zeigten Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Leber hoch infizierter Mäuse nach 24 Stunden *ex vivo* Inkubation außerhalb der Lebermikroumgebung eine vergleichbare Zytotoxizität zu Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus niedrig infizierten Mäusen (**Abbildung 12 D**). Das geht mit einer Zunahme der TZR Expressionslevel einher (**Abbildung 12 E,F**). Offen bleibt die Frage warum auch Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Milz hoch infizierter Versuchstiere eine verminderte Zytotoxizität aufweisen.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine verminderte TZR Expression auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen direkten Einfluss auf deren Funktionalität und Effektorfunktion hat.

Ergebnisse

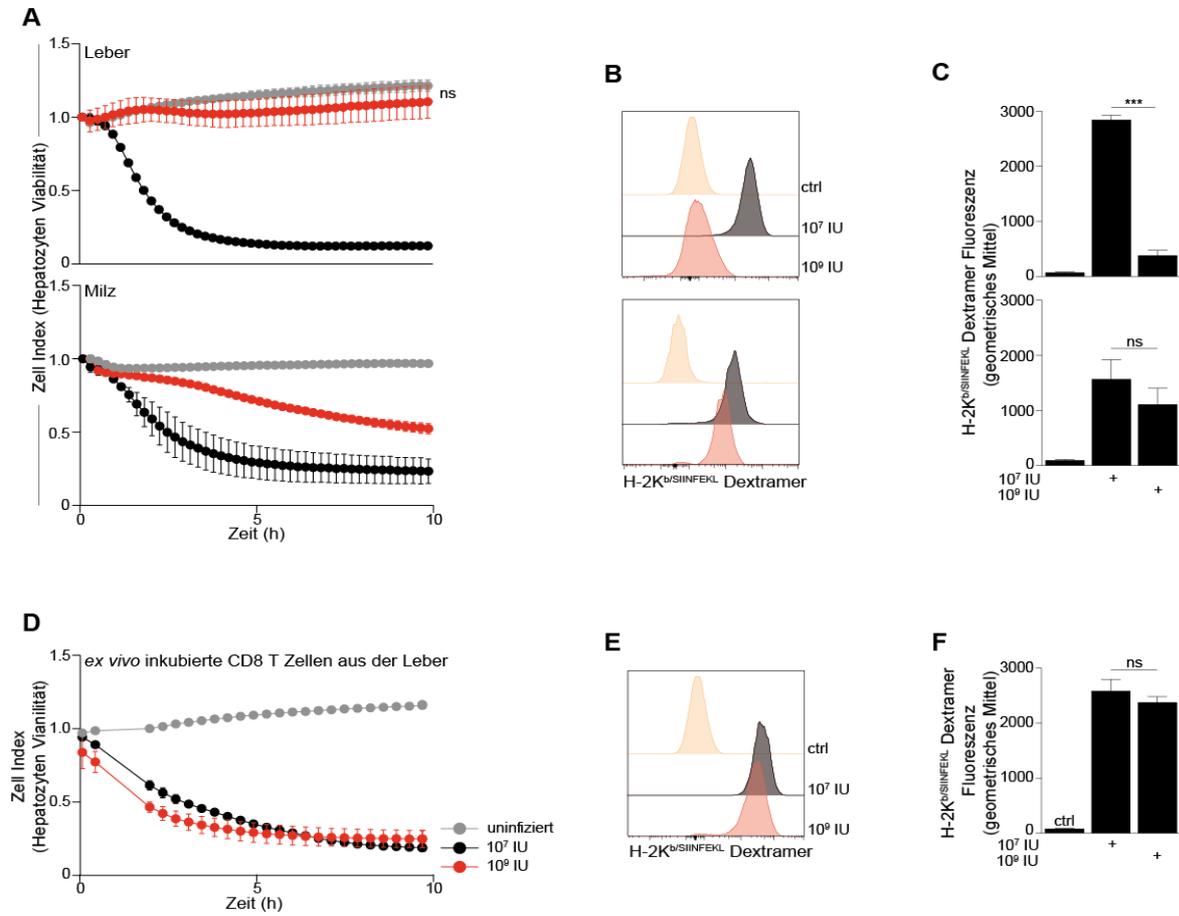
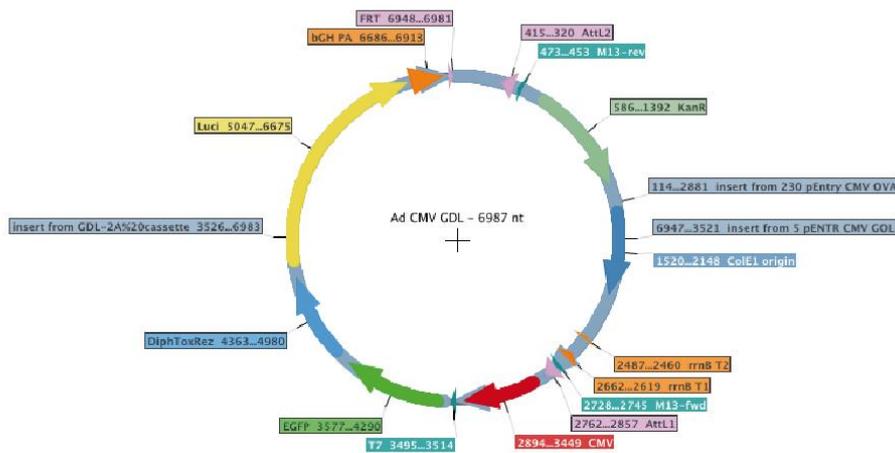


Abbildung 12: Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion zeigen Virus-spezifische CD8 T-Zellen verminderte Fähigkeit Virus-infizierte Hepatozyten zu eliminieren.

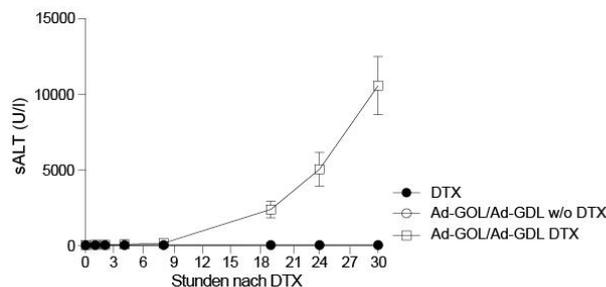
(A,D) Untersuchung der *in vitro* Zytotoxizität adoptiv transferierter CD45.1⁺ CD8 T-Zellen mittels Impedanz-basierter xCELLigence Technologie (10⁷ IU/Maus oder 10⁹ IU/Maus an Tag 8 p.i.). (B,E) Durchflusszytometrische Analyse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit adoptiv transferierter CD45.1⁺ CD8 T-Zellen (10⁷ IU/Maus oder 10⁹ IU/Maus an Tag 8 p.i.). (C,F) Geometrisches Mittel der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Fluoreszenz aus (B,E). (A-F) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥3).

4.12 *In vivo* Modellsystem für die gezielte Induktion von Leberschaden mittels Diphtherietoxin

A



B



C

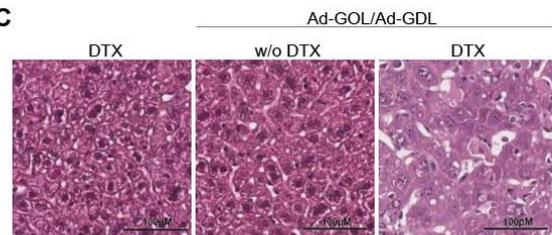


Abbildung 13: *In vivo* Modellsystem für die gezielte Induktion von Leberschaden mittels Diphtherietoxin.

(A) pENTR Vektor mit Expressionskassette bestehend aus CMV-Promotor, GFP, Diphtherietoxin-Rezeptor und Luziferase Genen. (B) Messung der Transaminaseaktivität im Serum der Versuchstiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Diphtherietoxin Applikation. (C) H/E-Färbung von PFA-fixiertem Lebergewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Diphtherietoxin-Applikation. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte. (A-C) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 5$).

Im Normalfall geht eine chronische Infektion der Leber gleichzeitig mit hoher Antigenmenge, Leberentzündung und Leberschaden einher (Das et al., 2008). Deshalb ist es schwierig zwischen dem Effekt der Antigenmenge (Anzahl infizierter Hepatozyten) und dem Effekt des Leberschadens auf die Qualität der antiviralen CD8 T-Zell Antwort zu unterscheiden.

Aus diesem Grund wurde im Institut ein *in vivo* Modellsystem etabliert, welches es ermöglicht, gezielt Leberschaden zu induzieren und dabei die Antigenlevel niedrig zu halten. Dafür wurde ein rekombinantes Adenovirus produziert, welches die Reporterproteine GFP

Ergebnisse

(G) und Luziferase (L) zusammen mit dem Diphtherietoxin (D) Rezeptor exprimiert (Ad-CMV-GDL) (**Abbildung 13 A**). Nach Injektion von Diphtherietoxin in Ad-CMV-GDL infizierte Versuchstiere entwickelte sich innerhalb von 2 Tagen Leberschaden, welcher durch sALT Messung und histologische Untersuchung nachgewiesen werden konnte. Ad-CMV-GDL Infektion oder DTX Injektion alleine induzierten keinen sALT Anstieg und somit keinen Leberschaden (**Abbildung 13 B,C**).

4.13 Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel induziert einen Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen

Die Qualität der CD8 T-Zell-vermittelten Immunantwort gegenüber Antigenen, welche von Hepatozyten exprimiert werden, weist eine große Bandbreite auf und kann in Immunaktivierung oder Immuntoleranz münden (Tay et al., 2014). Die Gründe für die Heterogenität der hepatischen CD8 T-Zell Antwort sind noch nicht ausreichend untersucht.

Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis ist es nicht möglich zwischen dem Effekt der hohen Antigenlevel und dem Effekt des Leberschadens auf die CD8 T-Zell Antwort zu unterscheiden. Im folgenden Versuch sollte, mit Hilfe des neu etablierten Ad-CMV-GDL *in vivo* Modellsystems, ausgeschlossen werden, dass für den beobachteten Verlust von TZR ausschließlich hohe Antigenlevel verantwortlich sind.

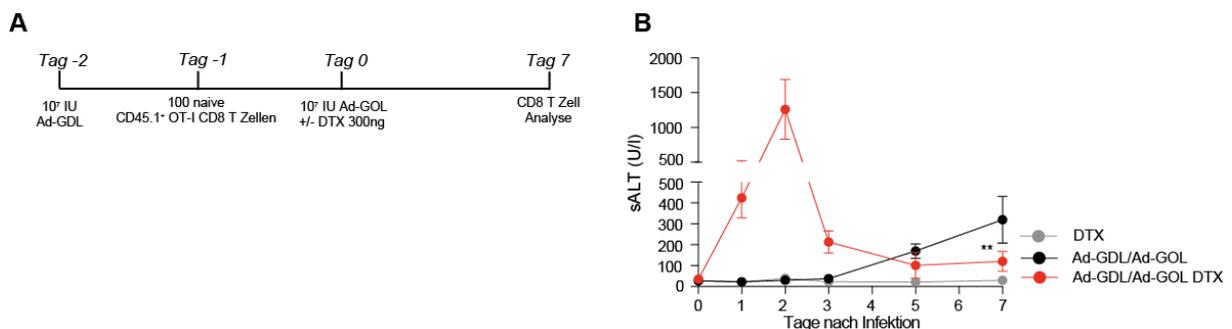


Abbildung 14: Transfer naiver CD8 T-Zellen vor gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.

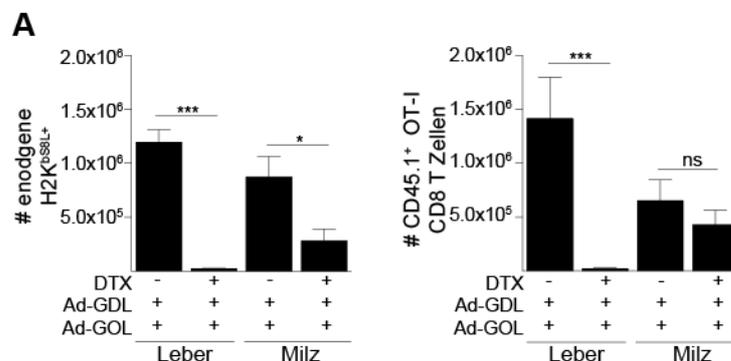
(A) Versuchsaufbau. (B) Messung der Transaminaseaktivität im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion und DTX Applikation. (A,B) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 5$).

Ergebnisse

Dafür wurden die Versuchstiere zunächst mit dem Ad-CMV-GDL (10^7 IU/Maus) Virus infiziert. Einen Tag später wurden 100 naive Ovalbumin-spezifische CD45.1⁺ CD8 T-Zellen transferiert. Wiederum einen Tag später erfolgte die Infektion mit einer niedrigen Infektionsdosis Ad-CMV-GOL (10^7 IU/Maus) und die Applikation von Diphtherietoxin, um gezielt Leberschaden zu induzieren (**Abbildung 14 A**).

Zunächst wurden die sALT Level als Marker für Leberschaden gemessen. Diese zeigten, dass es in doppelt infizierten Versuchstieren 1-2 Tage nach Ad-CMV-GOL Infektion/DTX Injektion zu einem sALT Anstieg auf Werte von circa 1500 U/l kam. Die sALT Level sanken dann an Tag 3 nach Ad-CMV-GOL Infektion/DTX Injektion auf Werte von circa 200 U/l ab und im weiteren Verlauf sanken sie bis Tag 7 nach Ad-CMV-GOL Infektion/DTX Injektion auf Hintergrundlevel ab. Im Gegensatz dazu stiegen die sALT Level in doppelt infizierten Versuchstieren ohne DTX Injektion erst ab Tag 4 nach Ad-CMV-GOL Infektion an und erreichten ihr Maximum an Tag 7 nach Ad-CMV-GOL Infektion bei Werten von circa 300-400 U/l. Da bekannt ist, dass Leberschaden nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektionsdosis CD8 T-Zell-vermittelt ist, konnte somit gezeigt werden, dass Diphtherietoxin-vermittelter Leberschaden das Ausmaß des nachfolgenden CD8 T-Zell-vermittelten Leberschadens nach niedriger Infektionsdosis vermindern konnte (**Abbildung 14 B**).

4.14 Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel geht mit einer Abnahme der Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher



Ergebnisse

Abbildung 15: Verminderte Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.

(A) Quantifizierung endogener Ovalbumin-spezifischer CD8 T-Zellen und adoptiv transferierter CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen (Tag 7 p.i.). (A) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

Zusätzlich wurde die absolute Anzahl endogener Virus-spezifischer und adoptiv transferierter CD45.1⁺ Virus-spezifischer CD8 T-Zellen quantifiziert. Die Anzahl beider Zellpopulationen nahm nach der gezielten Induktion von Leberschaden, ähnlich wie nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis, deutlich ab (**Abbildung 15 A**). Dieser Effekt konnte verstärkt in der Leber beobachtet werden. Die Abnahme der Anzahl CD45.1⁺ Virus-spezifischer CD8 T-Zellen war in der Milz nicht signifikant (**Abbildung 15 A**).

4.15 Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel induziert einen Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen

Zusätzlich wurde ebenfalls die Anzahl der SIINFEKL-spezifischen TZR auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen quantifiziert. An Tag 7 waren CD45.1⁺ CD8 T-Zellen aus der Leber doppelt infizierter Versuchstiere ohne DTX Infektion in großer Zahl nachweisbar und konnten große Mengen Dextramer binden. Die Zahl der CD45.1⁺ CD8 T-Zellen aus der Leber doppelt infizierter Versuchstiere mit DTX Injektion war deutlich geringer und diejenigen Zellen, welche noch nachweisbar waren, konnten H-2K^b/SIINFEKL Dextramere in deutlich vermindertem Umfang binden (**Abbildung 16 A,B**). In der Milz konnten hingegen in doppelt infizierten Versuchstieren mit und ohne DTX Injektion zu jedem Zeitpunkt H-2K^b/SIINFEKL Dextramer positive CD45.1⁺ CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 16 A,B**).

Somit konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis die wenigen Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus der Leber von Versuchstieren mit gezielter Induktion von Leberschaden ebenfalls eine verminderte Anzahl von T-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass hohe Antigenlevel als alleinige Ursache für den Verlust von T-Zell-Rezeptoren von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen ausgeschlossen werden können.

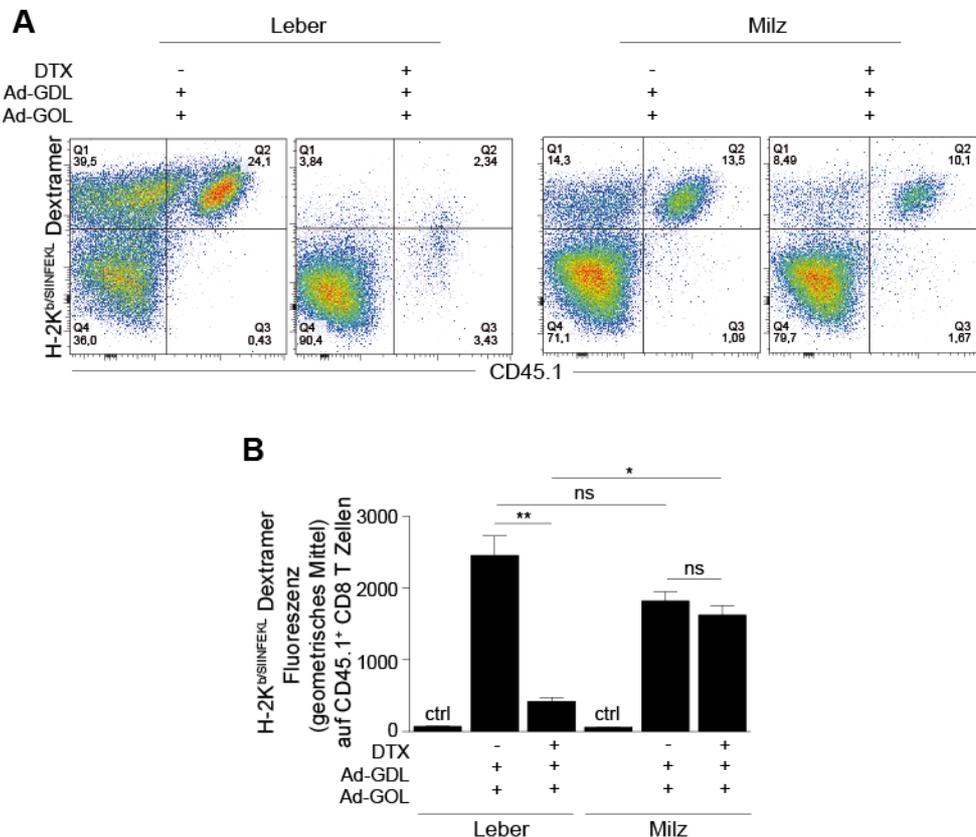


Abbildung 16: Virus-spezifische CD8 T-Zellen zeigen nach gezielter Induktion von Leberschaden nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion eine verminderte Expression von T-Zell-Rezeptoren an ihrer Oberfläche.

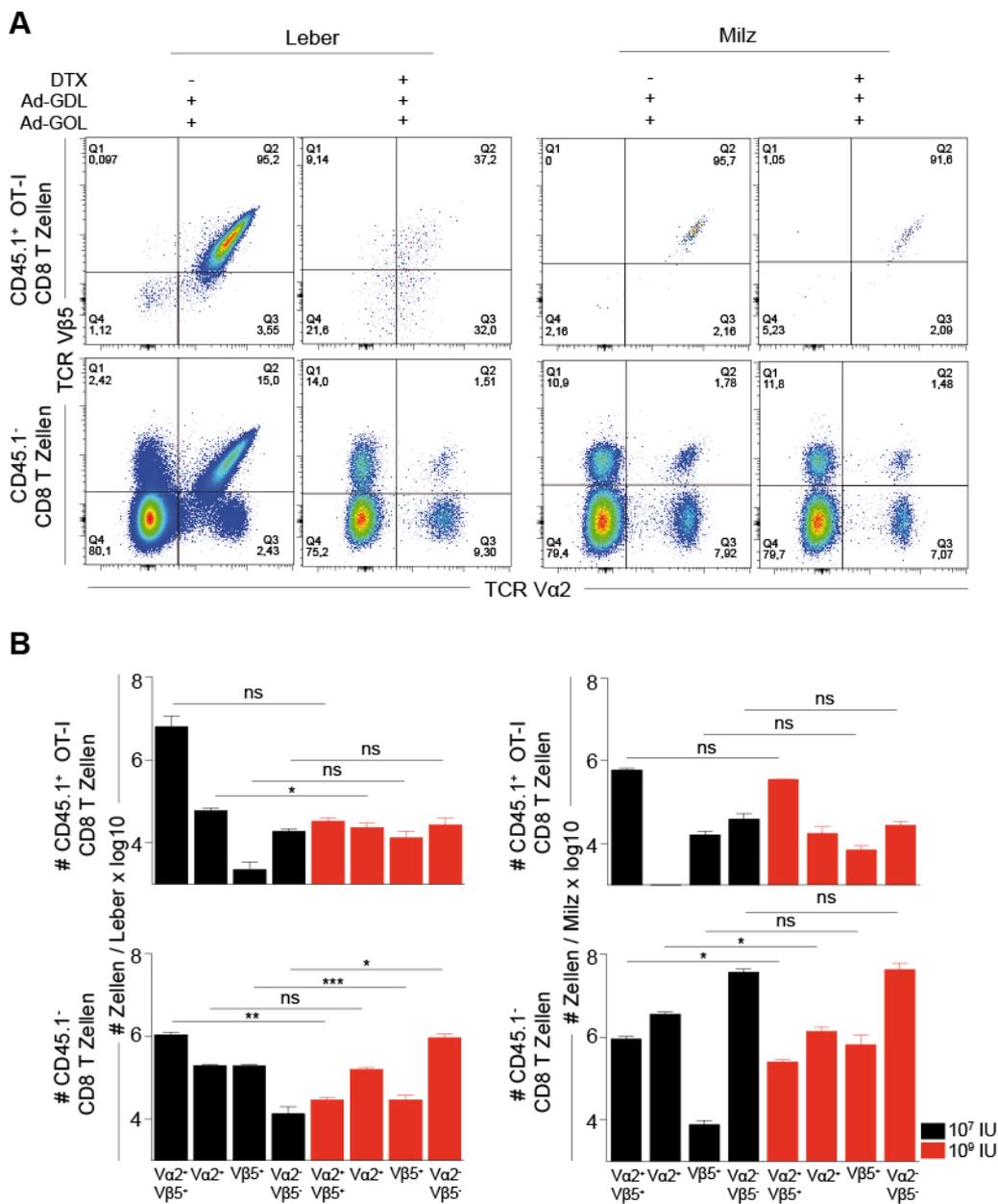
(A) Durchflusszytometrische Analyse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit adoptiv transferierter CD45.1⁺ CD8 T-Zellen (Tag 7 p.i.). (B) Geometrisches Mittel der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Fluoreszenz aus (A). (A,B) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

4.16 Verlust von T-Zell-Rezeptoren nach gezielter Induktion von Leberschaden nur nach Antigenerkennung in der Leber

Es wurde ebenfalls eine Antikörper-basierte Färbung der TZR V α 2/V β 5-Ketten und somit des transgenen TZR durchgeführt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden einerseits die adoptiv transferierten CD45.1⁺ OT-I CD8 T-Zellen und andererseits wurde die gesamte Population CD45.1⁻ CD8 T-Zellen untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Anzahl TZR V α 2⁺ und TZR V β 5⁺ CD8 T-Zellen und somit Antigen-

Ergebnisse

unspezifischer CD8 T-Zellen in der Leber doppelt infizierter Versuchstiere mit DTX Injektion erhöht war. Die Anzahl endogener CD45.1⁻ und adoptiv transferierter CD45.1⁺ TZR Va2/Vβ5 doppelt positiver und somit Antigen-spezifischer CD8 T-Zellen in der Leber doppelt infizierter Versuchstiere mit DTX Injektion war dagegen deutlich reduziert. Die Ergebnisse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Färbung ließen sich somit durch klassische Antikörper Färbung bestätigen (**Abbildung 17 A,B**).



Ergebnisse

Abbildung 17: Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen, wenn diese ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der TZR V α 2 und TZR V β 5 Expression auf endogenen und adoptiv transferierten CD8 T-Zellen. (B) Quantifizierung der TZR V α 2⁺ und/oder TZR V β 5⁺ Zellen aus (A). (A,B) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n \geq 5).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach der gezielten Induktion von Leberschaden nur in CD8 T-Zellen auftritt, die gleichzeitig ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen.

4.17 Gezielte Induktion von Leberschaden bei niedrigem Antigenlevel geht mit phänotypischen Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen einher

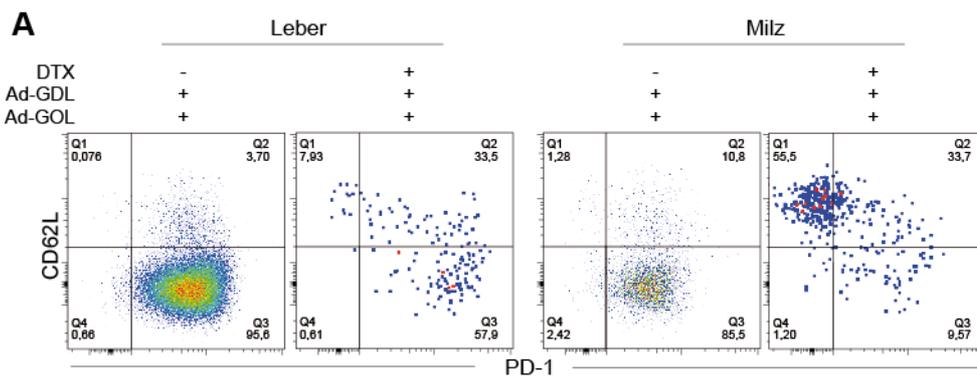


Abbildung 18: Phänotypische Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der PD-1 und CD62L Expression auf adoptiv transferierten CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. (A) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n \geq 5).

Die phänotypische Analyse der Virus-spezifischen CD8 T-Zellen ergab in diesem Zusammenhang eine erhöhte PD-1 Expression auf hepatischen CD62L^{niedrig} Virus-spezifischen CD8 T-Zellen nach DTX-induziertem Leberschaden (**Abbildung 18 A**). Im Gegensatz dazu waren Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Milz CD62L^{hoch} und zeigten keinen Unterschied in der PD-1 Expression (**Abbildung 18 A**). Die Ergebnisse bestätigten somit den Phänotyp Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach niedriger und hoher Ad-CMV-GOL Infektion (**siehe Abbildung 8**).

Ergebnisse

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Virus-spezifische CD8 T Zellen aus der Leber doppelt infizierter Versuchstiere mit DTX Injektion durchgehend hohe Expressionslevel des ko-inhibitorischen Moleküls PD-1 zeigen, was auf eine funktionelle Einschränkung der entsprechenden Zellen schließen lässt. Gleichzeitig exprimieren Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Milz doppelt infizierter Versuchstiere durchgehend CD62L, was darauf hindeutet, dass sie aus irgendeinem Grund in sekundären lymphatischen Organen zurückgehalten werden, wahrscheinlich um sie dem regulatorischen Milieu der Leber zu entziehen.

4.18 Leberschaden-induzierter Verlust von T-Zell-Rezeptoren betrifft auch CD8 Effektorzellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Virus-spezifische CD8 T-Zellen bereits in der Phase des CD8 T-Zell *Priming* durch Leberschaden derart verändert werden, dass es nach Antigenerkennung in der Leber zu einem Verlust der TZR Expression kommt.

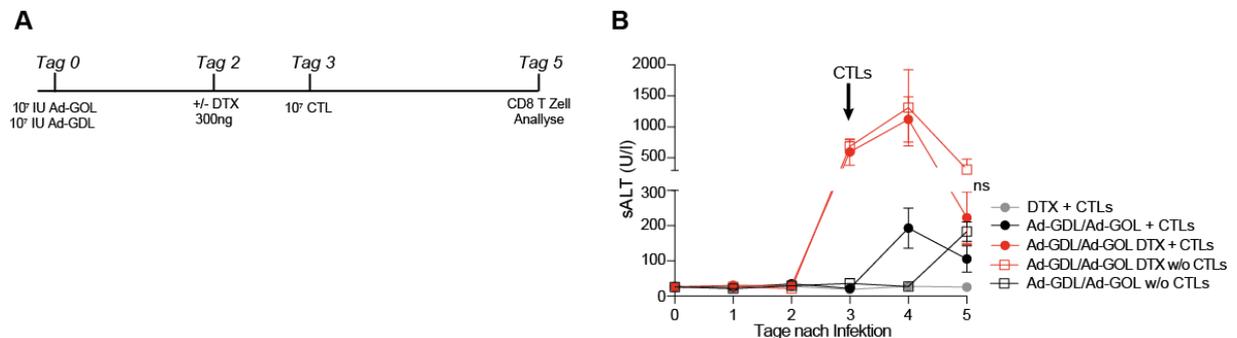


Abbildung 19: Leberschaden-induzierter Verlust der TZR Expression betrifft auch adoptiv transferierte in vitro aktivierte CD8 Effektorzellen.

(A) Versuchsaufbau. (B) Messung der Transaminaseaktivität im Serum der Versuchstiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. (A,B) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$).

Ergebnisse

Aus diesem Grund wurden Versuchstiere an Tag 0 gleichzeitig mit 10^7 IU Ad-CMV-GDL und 10^7 IU Ad-CMV-GOL in 100 μ l einer isotonischen Natriumchlorid-Lösung i.v. in die Schwanzvene infiziert. An Tag 1 nach Infektion erfolgt die Applikation von DTX, um gezielt Leberschaden in mit beiden Viren infizierten Versuchstieren zu induzieren und wiederum einen Tag später werden 10^7 CD8 T-Zellen (CD8 Effektorzellen) in das geschädigte Lebergewebe transferiert (**Abbildung 19 A**). Dafür wurden OT-I CD8 T-Zellen vor Transfer mit SIINFEKL-Peptid *in vitro* aktiviert. In doppelt infizierten Versuchstieren ohne DTX Applikation konnte ein CD8 Effektorzell-vermittelter sALT Anstieg beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die transferierten CD8 Effektorzellen funktional sind. Messung der sALT Level zeigte, dass es in doppelt infizierten Versuchstieren nach DTX Applikation zu einem starken Anstieg der sALT kam. Der beobachtete Anstieg war jedoch unabhängig vom adoptiven CD8 T-Zell Transfer, da er auch in doppelt infizierten Versuchstieren ohne CD8 Effektorzellen in vergleichbarem Maß zu beobachten war (**Abbildung 19 B**).

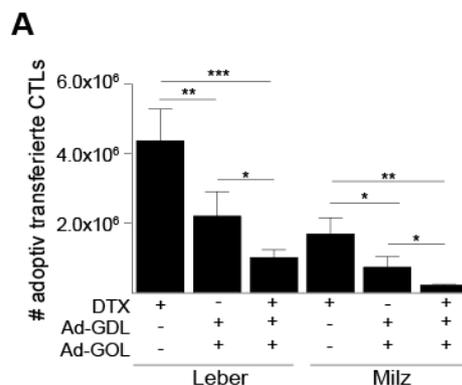


Abbildung 20: Verminderte Anzahl adoptiv transferierter CD8 Effektorzellen nach gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.

(A) Quantifizierung adoptiv transferierter CD8 Effektorzellen (Tag 5 p.i.). (A) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$).

Zusätzlich konnte nach Reisolation eine Abnahme der Anzahl von CD8 Effektorzellen in Versuchstieren, welche ihr Antigen in Gegenwart von Leberschaden erkannten, beobachtet werden (**Abbildung 20 A**). Interessanterweise nahm die Anzahl der reisolierten CD8 Effektorzellen auch durch reine Antigenerkennung in Abwesenheit von Leberschaden ab. Der gleiche Effekt, mit allgemein niedrigeren Zellzahlen, konnte auch in der Milz beobachtet werden (**Abbildung 20 A**).

Ergebnisse

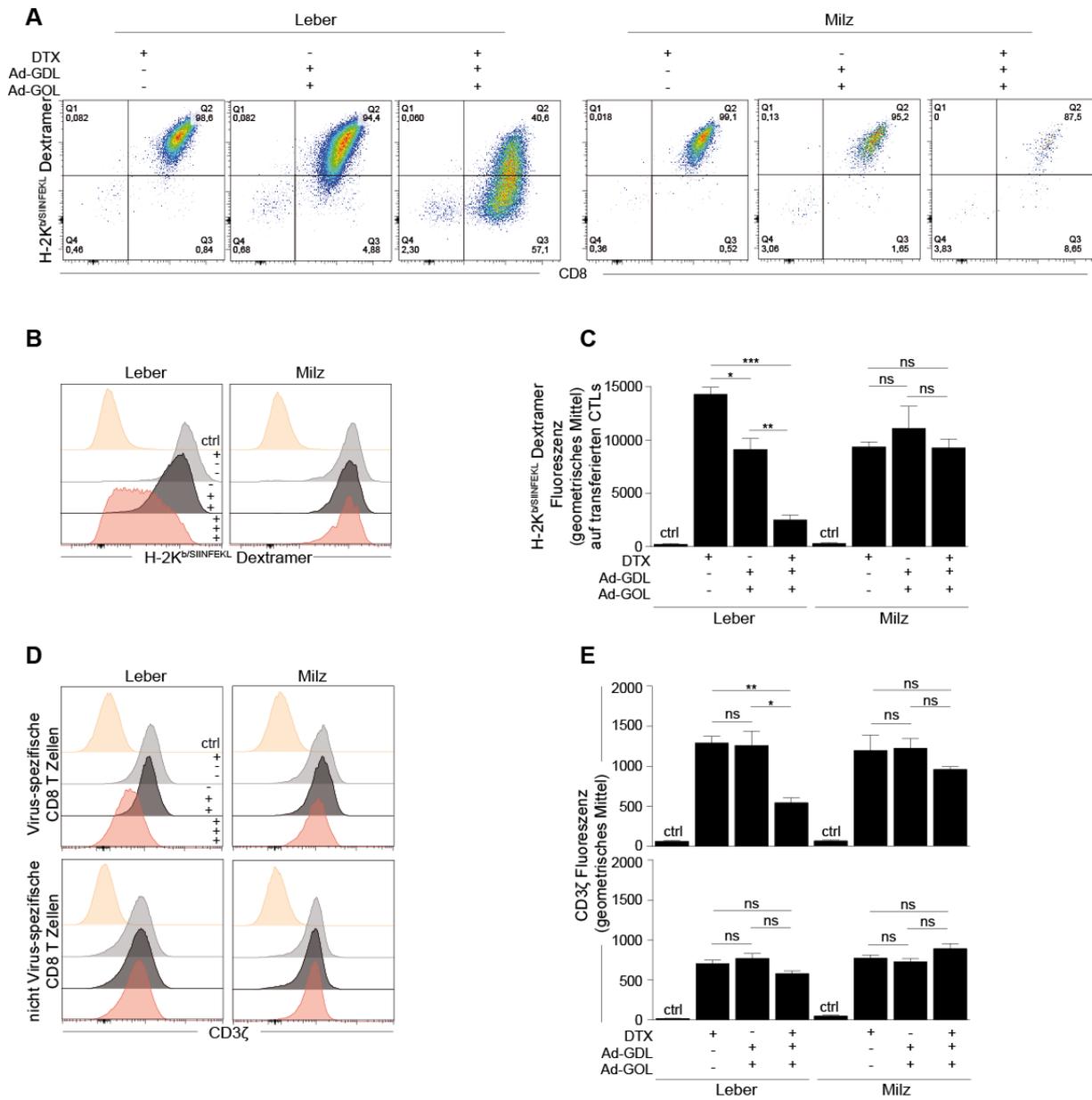


Abbildung 21: Leberschaden-induzierter Verlust von T-Zell-Rezeptoren betrifft auch CD8 Effektorzellen.

(A,B) Durchflusszytometrische Analyse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit adoptiv transferierter CD8 Effektorzellen. (C) Geometrisches Mittel der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Fluoreszenz aus (A,B). (D) Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Expression der TZR- Signalweiterleitungs-Domäne CD3ζ in adoptiv transferierten CD8 Effektorzellen. (E) Geometrisches Mittel der CD3ζ Fluoreszenz aus (D). (A-E) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥3).

Ergebnisse

Adoptiv transferierte CD8 Effektorzellen trugen auch in Gegenwart von Leberschaden eine verminderte Zahl von TZR auf ihrer Oberfläche, was sich in einer verminderten H-2K^b/SIINFEKEL Dextramer Bindungsfähigkeit dieser Zellen zeigte (**Abbildung 21 A-C**). Dieser Effekt war wiederum nur in der Leber zu beobachten. Außerdem war auch die intrazelluläre TZR-Signalweiterleitungsdomäne CD3 ζ in CD8 Effektorzellen aus der Leber doppelt infizierter Versuchstiere mit DTX Injektion schwächer exprimiert (**Abbildung 21 D,E**).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nicht unzureichendes CD8 T-Zell-*Priming* zum Verlust von TZR von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen führt, sondern, dass Antigenerkennung in Gegenwart von Leberschaden der entscheidende Faktor ist.

4.19 Expression von T-Zell-Rezeptoren ist unabhängig vom Vorhandensein von L-Arginin *in vitro*

Da Antigenerkennung in Gegenwart von Leberschaden der Grund für den Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen ist, sollte der zugrundeliegende Mechanismus intensiver untersucht werden. Es ist bekannt, dass aus toten Hepatozyten eine große Menge Arginase I freigesetzt werden kann, ein Enzym welches zum Abbau der essentiellen Aminosäure L-Arginin benötigt wird. Da gleichzeitig die Abwesenheit von L-Arginin in der Lebermikroumgebung mit der Abnahme der CD3 ζ Expression in CD8 T-Zellen assoziiert wird, schien es uns naheliegend, dass die Abwesenheit von L-Arginin der entscheidende Faktor für den beobachteten TZR-Verlust auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen sein könnte (Rodriguez et al., 2002).

Aus diesem Grund wurden Versuchstiere an Tag 0 mit niedriger und hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis infiziert. Einen Tag später wurden 100 naive CD45.1⁺ CD8 T-Zellen transferiert und an Tag 7 nach Infektion wurden Lymphozyten reisoliert und über Nacht in Gegenwart oder Abwesenheit von L-Arginin im Zellkulturmedium *ex vivo* kultiviert. Bei normalem T-Zell Medium handelte es sich um RPMI 1640 mit 10% FCS, welches 0,2 g/L L-Arginin enthielt, wohingegen es sich bei L-Arginin-freiem T-Zell Medium um RPMI 1640 für SILAC⁴⁸ mit 10% dialysiertem FCS handelte. In dem L-Arginin-freien T-Zell Medium wurde L-Lysin substituiert (siehe Puffer und Medien). Vor und nach *in vitro* Kultivierung wurde eine durchflusszytometrische Analyse der TZR-Expression mittels H-2K^b/SIINFEKEL Dextramer

⁴⁸ Engl.: Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture

Ergebnisse

Färbung durchgeführt, um den Einfluss von L-Arginin Mangel in der Mikroumgebung der geschädigten Leber auf die Expressionslevel der TZR und der CD3 ζ -Kette zu untersuchen. Messung der sALT Level und der *in vivo* Biolumineszenz über sieben Tage zeigt die Persistenz der hohen Infektionsdosis bei gleichzeitigem Auftreten von starkem Leberschaden (*Data not shown*).

Analyse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit frisch isolierter CD8 T-Zellen zeigte den Verlust von TZR bei Antigenerkennung in Gegenwart von Leberschaden (**Abbildung 22 A,B**). Nach *ex vivo* Kultivierung kam es zu einer Hochregulation der TZR Expression auf CD8 T-Zellen. Die Hochregulation der Expression von TZR war jedoch unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von L-Arginin im Zellkulturmedium (**Abbildung 22 A,B**).

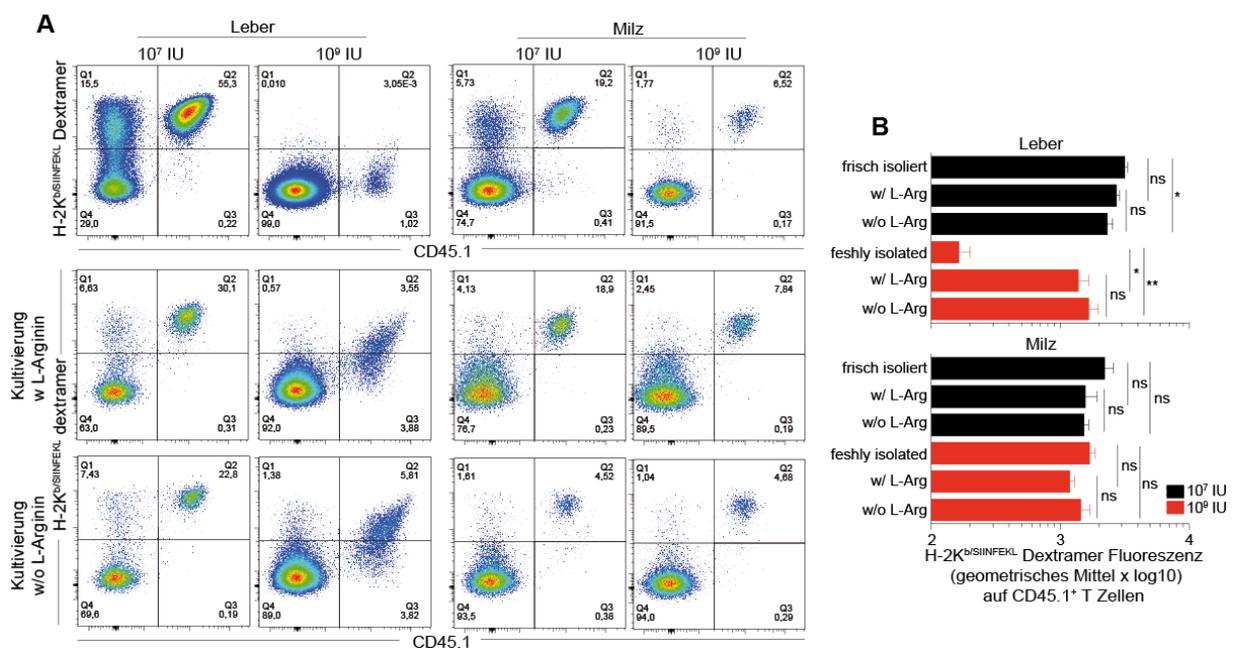


Abbildung 22: TZR-Verlust auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen wird nicht durch L-Arginin Mangel im Kontext von Leberschaden bedingt.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Bindungsfähigkeit von frisch isolierten und *ex vivo* inkubierten (w/ und w/o L-Arginin) CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. (B) Geometrisches Mittel der H-2K^b/SIINFEKL Dextramer Fluoreszenz aus (B). (A,B) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n \geq 5).

Ergebnisse

Durch intrazelluläre Färbung der TZR V α 2-Kette konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der TZR Expression auf der Zellmembran nicht mit einer Retention der TZR in intrazellulären Kompartimenten, wie dem „*recycling endosome*“ einhergeht. Es konnten auch intrazellulär keine TZR Moleküle in Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nachgewiesen werden, was gegen eine Retention in „*recycling endosomes*“ spricht, da dann vermehrt TZR Moleküle detektierbar sein müssten (**Abbildung 23 A,B**).

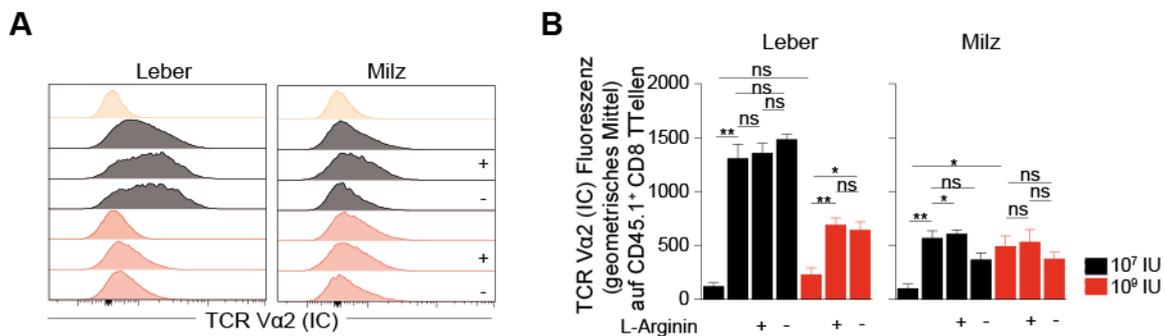


Abbildung 23: Leberschaden-induzierter Verlust der Oberflächenexpression von T-Zell-Rezeptoren geht nicht mit einer intrazellulären Retention von T-Zell-Rezeptoren einher.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären TZR V α 2 Expression adoptiv transferierter CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. (B) Geometrisches Mittel der TCR V α 2 Fluoreszenz aus (A). (A,B) Darstellung von Mittelwert \pm SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n \geq 5).

Zusätzlich konnte auch eine verminderte Expression der intrazellulären TZR-Signalweiterleitungsdomäne CD3 ζ in Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus Lebern hoch infizierter Versuchstiere beobachtet werden. Nach *ex vivo* Kultivierung kam es auch hier, unabhängig von L-Arginin, zu einer schnellen Hochregulation der Expression von CD3 ζ in Virus-spezifischen CD8 T-Zellen (**Abbildung 24 A,B**).

Zusammengefasst schließen diese Ergebnisse einen Mangel an der für die T-Zell Aktivierung essentiellen Aminosäure L-Arginin als Ursache für den Verlust der Expression von TZR auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen bei Leberschaden aus. Da keine Retention von TZR Molekülen in intrazellulären Kompartimenten messbar war, muss es sich um einen Mechanismus handeln, der entweder eine höhere Rate an Abbau, oder einen Stopp in der Transkription oder Translation verursacht.

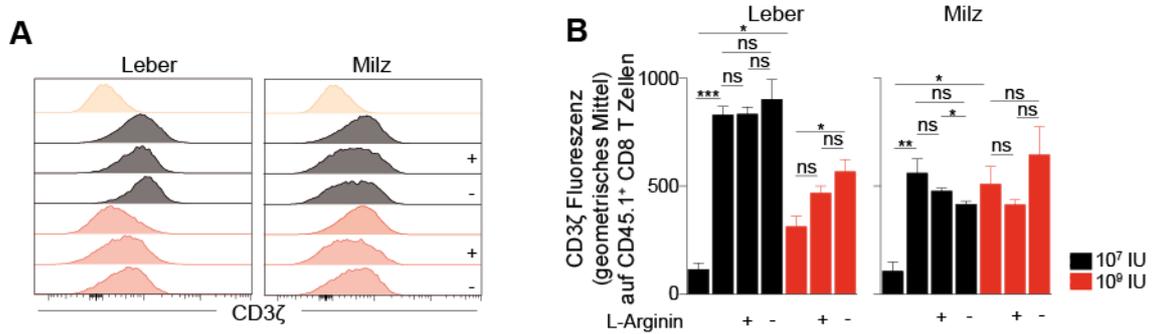


Abbildung 24: Verlust der CD3ζ-Signalweiterleitungsdomäne ist ebenfalls unabhängig vom Vorhandensein von L-Arginin im geschädigten Lebergewebe.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Expression der T-Zell-Rezeptor Signalweiterleitungs-Domäne CD3ζ in adoptiv transferierten CD45.1⁺ CD8 T-Zellen. (B) Geometrisches Mittel der CD3ζ Fluoreszenz aus (A). (A,B) Darstellung von Mittelwert ± SEM. Gezeigt wird einer von zwei unabhängigen Versuchen (n≥5).

5 Diskussion

5.1 Zelltod als Ursache für die Abschaltung der antiviralen CD8 T-Zell Antwort in der Leber

Die Ursachen für das Auftreten von Leberschaden sind vielfältig. Man unterscheidet dabei zwischen toxischen (durch Toxine und bestimmte Arzneimittel) und Immun-vermittelten (durch Immunzellen als Reaktion auf eine Infektion) Leberschäden. Allerdings kann man davon ausgehen, dass die Übergänge fließend sind und auch direkte toxische Effekte auf Hepatozyten nachfolgend eine Immunantwort auslösen.

Im Normalfall ist es so, dass das Einsetzen einer adaptiven Immunantwort eine Abfolge immunologischer Vorgänge erfordert, deren Ziel das effiziente *Priming* von T-Zellen ist. Studien zeigen, dass tote Zellen ein wichtiger übergeordneter Regulator dieser Vorgänge sind. Einerseits sind tote Zellen eine wichtige Quelle für DAMPs, welche die Rekrutierung von PRRs und somit die Initiierung einer innate Immunantwort ermöglichen. Andererseits liefern tote Zellen Antigen für das CD8 T-Zell *Cross-Priming*. Außerdem geht man davon aus, dass bestimmte Vorgänge innerhalb der toten Zellen das entscheidende immunologische Ereignis darstellen, welches darüber entscheidet, ob es eher zu Immunaktivierung oder Immuntoleranz kommt (Yatim, Cullen, & Albert, 2017). So erfordert effizientes *Cross-Priming* vor allem eine NF- κ B-vermittelte Transkription innerhalb von toten Zellen. Das Ausschalten der NF- κ B-vermittelte Transkription während inflammatorischem Zelltod reduziert die Effizienz des *Primings* deutlich (Yatim et al., 2015).

Im Gegensatz zu Immun-vermitteltem Leberschaden lässt sich toxischer Leberschaden dadurch beseitigen, dass man die Exposition gegenüber dem toxischen Agens beendet. Der Abschaltung von Immun-vermitteltem Leberschaden können dagegen verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Vor allem im Kontext chronischer Virusinfektionen kommt es im Laufe der Zeit zu funktionell eingeschränkten Immunantworten, um den Körper vor den Gewebeschäden einer andauernd starken Immunreaktion zu schützen. Die dauerhafte Exposition von zytotoxischen CD8 T-Zellen gegenüber großen Mengen ihres spezifischen Antigens spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion dieses Erschöpfungszustandes (Wherry & Kurachi, 2015) (Schietering & Greenberg, 2014) (Gallimore, Hengartner, & Zinkernagel, 1998). Der Zustand ist durch verminderte Expression von Effektorzytokinen wie TNF und IFN γ , sowie die Hochregulation ko-inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1 gekennzeichnet

Diskussion

(Barber et al., 2006). Vor kurzem konnten Alfei et al. zeigen, dass es in chronischen LCMV⁴⁹ und HCV Infektionen durch die dauerhafte Stimulation von T-Zell-Rezeptoren durch hohe Antigenlevel zur Induktion des Tox⁵⁰ Proteins kommt und, dass diese Induktion direkt mit dem Vorhandensein erschöpfter CD8 T-Zellen korreliert. Ein Ausschalten von Tox führt in diesem Zusammenhang zu einer verminderten Expression des ko-inhibitorischen Rezeptors PD-1 auf CD8 T-Zellen und erhöht deren Produktion von Effektorzytokinen (Alfei et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit widmeten wir uns der Frage, welchen Einfluss Zelltod auf die Induktion von Immunaktivierung oder Immuntoleranz im tolerogenen Milieu der Leber hat, da dieser Fragestellung noch nicht systematisch nachgegangen wurde. Hierfür verwendeten wir ein bereits etabliertes *in vivo* Modellsystem für hepatotrope Infektionen der Leber. Es wurde ein rekombinantes Adenovirus des Serotyps 5 verwendet, welches wie das Hepatitis B Virus, bevorzugt Hepatozyten infiziert (Waddington et al., 2008). Das Adenovirus-basierte *in vivo* Modellsystem eignet sich gut, um die mechanistischen Grundlagen der hepatischen Immunregulation besser untersuchen und verstehen zu können. Da CD8 T-Zellen der Schlüssel für eine erfolgreiche Eliminierung viraler Infektionen sind, wurde das Adenovirus-basierte Modellsystem mit dem OT-I System kombiniert, was die Detektion einer ausreichenden Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen sowohl im akut-selbstlimitierenden, als auch im chronischen Infektionsverlauf ermöglicht (Miyagawa et al., 2010) (Stabenow et al., 2010) (Manske et al., 2018). OT-I Mäuse verfügen über Ovalbumin-spezifische CD8 T-Zellen, die spezifisch das SIINFEKL-Peptid (immundominantes Epitop von Ovalbumin) erkennen, wenn es auf dem MHC-I Molekül H-2K^b präsentiert wird. Wenn also Ovalbumin nach Infektion mit dem Ad-CMV-GOL Virus in infizierten Hepatozyten exprimiert wird, kann dieses von adoptiv transferierten OT-I CD8 T-Zellen erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlauf einer Ad-CMV-GOL Infektion in der Leber abhängig von der Infektionsdosis unterschiedlich war. Nach niedriger Infektionsdosis wurden Virus-infizierte Hepatozyten durch eine CD8 T-Zell-vermittelte Immunantwort vollständig eliminiert (Manske et al., 2018). Dabei spiegelte der CD8 T-Zell-vermittelte sALT Anstieg direkt eine effektive antivirale Immunantwort wider. Im Gegensatz

⁴⁹ engl.: Lymphocytic choriomeningitis virus

⁵⁰ engl.: Thymocyte selection-associated high mobility group box

Diskussion

dazu kam es nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis, trotz starkem Leberschaden, nicht zu einer vollständigen Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten und somit muss von einem Defekt in der antiviralen Immunantwort ausgegangen werden (*Abbildung 1 und 2*). Auf den ersten Blick ist diese Beobachtung nicht überraschend, da es durch die hohe Infektionsdosis zur Expression großer Mengen Antigen kommt und es bekannt ist, dass hohe Antigenlevel eine entscheidende Rolle für die Entstehung erschöpfter CD8 T-Zellen spielen (Tay et al., 2014) (Gehring et al., 2007) (Utzschneider et al., 2016) (Alfei et al., 2019).

Auf den zweiten Blick ist die Beobachtung allerdings schon überraschend, da ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen niedriger und hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis der Zeitpunkt und das Ausmaß von Leberschaden in der frühen Phase nach Infektion war (*Abbildung 3*). Im Gegensatz zur niedrigen Infektionsdosis kam es nach hoher Infektionsdosis bereits ab Tag 3 zu einem starken sALT Anstieg, der nicht CD8 T-Zell-vermittelt war (*Abbildung 4*), sondern teilweise durch innate Immunaktivierung von NK-Zellen induziert wurde (*Abbildung 6*). Auch in einer chronischen HBV Infektion wird der nekroinflammatorische Leberschaden, aufgrund der nachgewiesenen Erschöpfung HBV-spezifischer CD8 T-Zellen, eher durch Rekrutierung weiterer mononukleärer Immunzellen induziert (Bertoletti et al., 2003). Da tote Zellen DAMPs freisetzen und große Mengen Antigen liefern, könnte man davon ausgehen, dass dies die innate Immunaktivierung weiter verstärkt und es dadurch die Initiierung einer nachfolgenden adaptiven Immunantwort, welche genau den jeweiligen Bedürfnissen angemessen ist, kommt (Jain & Pasare, 2017).

In diesem Zusammenhang könnte auch die Art des auftretenden Zelltodes eine entscheidende Rolle spielen. Es hängt von verschiedenen Faktoren ab, ob Zelltod Immunaktivierung oder Immuntoleranz begünstigt (Green et al., 2009) (Yatim et al., 2015). Eine Beteiligung verschiedener Formen von Zelltod, wie Apoptose, Nekroptose und Pyroptose, am Leberschaden in der frühen Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion konnte durch Hemmung der Effektor-Caspasen 3/7 (Ausschaltung von Apoptose), Hemmung der Caspase 1 (Ausschaltung von Pyroptose) und auch durch Infektion von RIPK3 KO Mäusen (Ausschaltung von Nekroptose) ausgeschlossen werden (*Daten nicht gezeigt*). Somit kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage über den vorliegenden Zelltodmechanismus getroffen werden. Es ist aber denkbar, dass es sich dabei um eine Form des immunogenen Zelltodes handelt, welcher in seiner Umgebung einen „Faktor X“ freisetzt, der nachfolgend die Verhinderung weiteren Leberschadens zum Ziel hat.

Diskussion

Chronische Infektionen der Leber gehen gleichzeitig mit hohem Antigenlevel, Leberentzündung und Leberschaden einher (Das et al., 2008). Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis war es somit nicht möglich zwischen dem Effekt des hohen Antigenlevel (Anzahl infizierter Hepatozyten) und dem Effekt des Leberschadens auf die Qualität der antiviralen CD8 T-Zell Antwort zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Etablierung des neuen Ad-CMV-GDL/DTX *in vivo* Modellsystems nötig (*Abbildung 13*). Dieses Modellsystem ermöglicht die gezielte Induktion von Leberschaden bei gleichzeitig niedrigem Antigenlevel. Bereits etablierte Möglichkeiten der gezielten Induktion von Leberschaden konnten nicht angewendet werden, da diese alle mit CD8 T-Zellen interferieren. So beruht zum Beispiel der toxische Effekt von Acetaminophen auf der Oxidation zu einem toxischen Metaboliten. Diese Oxidation ist Cytochrom P450-vermittelt und wir wissen, dass die adenovirale Infektion diese Gruppe von Enzymen hemmt und somit vor Acetaminophen-vermitteltem Leberschaden schützt (*unpublizierte Daten von Dr. Dirk Wohlleber bereitgestellt*). Bei dem Lektin Concanavalin A, welches aus der Jackbohne gewonnen wird, handelt es sich um ein T-Zell-Mitogen. Dadurch kommt es zur Quervernetzung bestimmter Komponenten des TZR und dadurch zur T-Zell Aktivierung (Palacios, 1982). Auch die Induktion von Leberschaden mittels anti-Maus CD95 Antikörper ist in unserem Kontext nicht möglich. Dieser Antikörper würde auch Fas auf der Oberfläche von murinen T-Zellen erkennen und durch die zytolytische Aktivität somit T-Zellen abtöten (Green, Droin, & Pinkoski, 2003).

Diphtherietoxin besteht aus einer Aktivierungsdomäne und einer Bindungsdomäne, welche durch eine Translokationsdomäne voneinander getrennt sind. Nach Bindung des Toxins an seinen Rezeptor, wird dieser über Endozytose in die Zelle aufgenommen und die Aktivierungsdomäne ins Zytoplasma freigesetzt. Dort katalysiert sie die Übertragung von ADP-Ribose auf den Elongationsfaktor EF-2 und blockiert die Proteinsynthese, was schlussendlich zu Zelltod führt (Simon, Aktories, & Barbieri, 2014). Da murine Zellen im Gegensatz zu humanen Zellen keine Diphtherietoxin-Rezeptoren exprimieren, kann transgen exprimierter Diphtherietoxin-Rezeptor zur gezielten Eliminierung der Zellen mittels Diphtherietoxin und somit zur Induktion von DTX-vermitteltem Leberschaden genutzt werden (Saito et al., 2001).

Virus-spezifische CD8 T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der erfolgreichen Eliminierung viraler Infektionen durch das adaptive Immunsystem (Thimme et al., 2003). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe der *in vivo* Modellsysteme für Immun-

Diskussion

vermittelten und DTX-vermittelten Leberschaden, der Einfluss von Leberschaden auf Phänotyp und Funktion Virus-spezifischer CD8 T-Zellen untersucht.

Nach initialem Leberschaden kam es in der Leber zu einem ausgeprägten Infiltrat nicht-Virus-spezifischer CD8 T-Zellen, wohingegen Virus-spezifische CD8 T-Zellen eine deutlich reduzierte proliferative Kapazität aufwiesen (*Abbildung 7 und 15*). Um eine chronische virale Infektion spontan kontrollieren und eliminieren zu können, ist jedoch eine starke polyklonale CD8 T-Zell-Antwort notwendig. Auch Patienten mit chronischer HBV Infektion können durch ein ausgeprägtes Lymphozyten Infiltrat identifiziert werden, wobei es sich bei einem großen Teil davon um nicht-Virus-spezifische CD8 T-Zellen handelt (Maini et al., 2000). Die eingeschränkte proliferative Kapazität der Virus-spezifischen CD8 T-Zellen nach initialem Leberschaden spiegelt somit die Situation während einer chronischen HBV Infektion wider.

Um die Effektivität der Effektorfunktionen der Virus-spezifischen CD8 T-Zell Antwort beurteilen zu können, ist aber nicht alleine der quantitative Aspekt entscheidend. Die Untersuchung des Phänotyps der entsprechenden Zellen zeigte deutliche Veränderungen im Phänotyp der Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus geschädigtem Lebergewebe im Vergleich zu Zellen aus intaktem Lebergewebe (*Abbildung 8 und 18*). Es konnte eine durchgehend hohe Expression von ko-inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 und LAG-3 beobachtet werden (*Abbildung 8*). Dabei handelt es sich um ein charakteristisches Merkmal für den Zustand der CD8 T-Zell Erschöpfung (Barber et al., 2006). PD-1 ist der am besten untersuchte ko-inhibitorische Rezeptor und er ist auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen verschiedener chronischer Infektionen hochreguliert. Auch während chronischen HBV und HCV Infektionen (Golden-Mason et al., 2007) (Peng et al., 2008). In der Leber ist diese Tatsache von besonderer Bedeutung, da im tolerogenen Milieu der Leber zahlreiche Leberzellpopulationen den Liganden für PD-1 exprimieren (Protzer et al., 2012). Außerdem zeigten ausschließlich Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Milz nach initialem Leberschaden durchgehend hohe CD62L Expressionslevel (*Abbildung 8 und 18*). Im Normalfall exprimieren naive CD8 T-Zellen CD62L, wohingegen die CD62L Expression mit der Entwicklung zu CD8 Effektorzellen runterreguliert wird und somit die Ansiedlung am Ort der Infektion ermöglicht wird (Weninger, Crowley, Manjunath, & von Andrian, 2001). Die Beobachtung deutet darauf hin, dass Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus der Milz nach initialem Leberschaden die Tendenz zum *Homing* in sekundäre lymphatische Organe besitzen bzw. in diesen zurückgehalten werden, um ein Auswandern in die geschädigte Leber zu

Diskussion

verhindern. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Schutzmechanismus, welcher verhindern soll, dass CD8 T-Zellen in der Leber abgeschaltet werden.

Auch die verminderte Produktion von IFN γ und TNF nach TZR-abhängiger Stimulation verdeutlichte den Erschöpfungszustand der CD8 T-Zellen nach vorausgehendem Leberschaden (*Abbildung 9*). Publierte Studien bestätigen, dass die Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden zur Induktion des Transkriptionsfaktors BATF in CD8 T-Zellen führen kann, was nachfolgend zur Reduktion der proliferativen Kapazität und zur verminderten Produktion von Effektorzytokinen wie IFN γ führt (Quigley et al., 2010). Die Tatsache, dass IFN γ und TNF nach TZR-unabhängiger Stimulation jedoch weiterhin möglich war (*Abbildung 9*), deutet darauf hin, dass ein Defekt im TZR-Komplex vorliegen muss. Interessant war auch die durchgehend hohe Expression des ko-inhibitorischen Rezeptors LAG-3 auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen. Studien weisen darauf hin, dass die alleinige Expression von LAG-3 für den Zustand der *Exhaustion* nicht ausreicht (Richter, Agnellini, & Oxenius, 2010), dass er aber sehr häufig mit PD-1 ko-exprimiert wird (Blackburn et al., 2009). Zudem wird er mit der Hemmung des Calcium-Influges bei TZR-Signalweiterleitung und mit verminderter Zytokinproduktion und Proliferation in Verbindung gebracht (Hannier, Tournier, Bismuth, & Triebel, 1998). Es gibt Hinweise dafür, dass auch die LAG-3 Expression zu einer Hemmung der Immunantwort durch Eingriff in die TZR-Signalweiterleitung führt (Hannier et al., 1998).

Für die Induktion und Aufrechterhaltung einer effektiven Virus-spezifischen CD8 T-Zell Antwort ist die Integrität des TZR-CD3 Komplexes auf der Oberfläche von CD8 T-Zellen von großer Bedeutung. Naive CD8 T-Zellen erkennen bei Primärinfektion ihr Antigen auf MHC-I Molekülen mittels des TZR und nachfolgend kommt es dann zu CD8 T-Zell Aktivierung und Ausbildung der Effektorfunktionen (Masopust & Schenkel, 2013). Der TZR-CD3 Komplex setzt sich aus gleichen Mengen TZR $\alpha\beta$:CD3 $\gamma\epsilon$:CD3 $\delta\epsilon$:CD3 $\zeta\zeta$ zusammen (Dong et al., 2019). Bei CD3 ζ handelt es sich um ein die intrazelluläre TZR-Signalweiterleitungs-Domäne. Dessen Rekrutierung führt zur Anlagerung des Adaptermoleküls ZAP-70 und daraufhin zur nachfolgenden Signalweiterleitung (Sussman et al., 1988). Verschiedene pathologischen Zustände chronischer Inflammation und hoher Antigenlevel werden mit einem Defekt in der CD8 T-Zell Funktion aufgrund einer Runterregulation von CD3 ζ und CD28 in Zusammenhang gebracht. Darunter Autoimmunerkrankungen (Krishnan et al., 2005), verschiedene Krebsarten (Nakagomi et al.,

Diskussion

1993) und chronische virale (Trimble & Lieberman, 1998) (Trimble, Shankar, Patterson, Daily, & Lieberman, 2000) oder bakterielle Infektionen (Bronstein-Sitton et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Virus-spezifische CD8 T-Zellen nach initialem Leberschaden keine H-2K^b/SIINFEKL Dextramer-Bindungsfähigkeit mehr aufwiesen und somit musste davon ausgegangen werden, dass sie keine TZR mehr auf ihrer Oberfläche exprimieren (*Abbildung 10 und 16*). Bei einem H-2K^b/SIINFEKL Dextramer handelt es sich um ein Fluorochrom-markiertes Dextran Polymer, welches eine große Anzahl MHC-I/SIINFEKL Komplexe trägt und dadurch an SIINFEKL-spezifische TZR (transgener OT-I TZR) binden kann. Interessanterweise exprimierten dieselben Zellen in hohem Maße die ko-inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und LAG-3 (*Abbildung 8*). Wenn man berücksichtigt, dass für die Expression von PD-1 zunächst TZR-Stimulation nötig ist, um die Translokation des Transkriptionsfaktors NFATc1 in den Nukleus zu ermöglichen, ist das ein interessanter Befund (Oestreich, Yoon, Ahmed, & Boss, 2008). Er lässt darauf schließen, dass Virus-spezifischen CD8 T-Zellen zunächst mit funktionellem TZR in die Leber einwandern und es auch zu TZR-Stimulation kommt. Kurz darauf muss es aber dann zu einem Signal kommen, welches zum Verlust der TZR führt. Gleichzeitig bleibt die PD-1 und LAG-3 Expression aber durchgehend hoch.

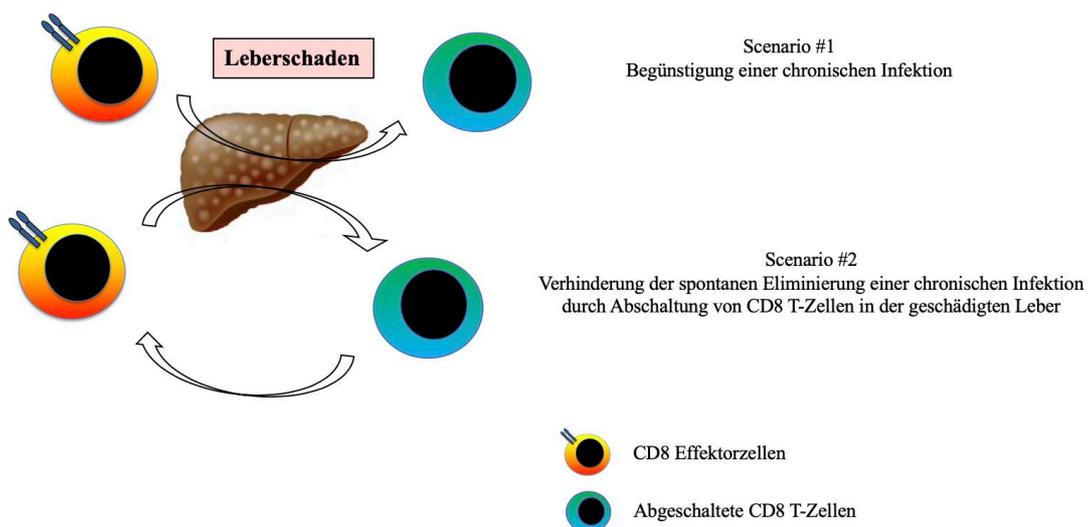
Eine genauere Untersuchung der Zusammensetzung des TZR-CD3 Komplexes zeigte eine Runterregulation der TZR-Signalweiterleitungs-Domäne CD3 ζ in Virus-spezifischen CD8 T-Zellen nach initialem Leberschaden (*Abbildung 10 und 21*). Bereits veröffentlichte Studien zeigen meist nur eine selektive Runterregulation von CD3 ζ , wohingegen die Konzentration von TZR-Protein an der Oberfläche unverändert bleibt (Baniyash, 2004). Der durch initialen Leberschaden induzierte Verlust der CD3 ζ -Signalweiterleitungs-Domäne war allerdings kein selektiver Effekt, sondern es kam gleichzeitig zu einem Verlust der TZR α und TZR β -Ketten, was auf einen weitergehenden Defekt im TZR-Komplex hindeutet (*Abbildung 11 und 17*).

Der Verlust von TZR auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen korrelierte außerdem direkt mit Dysfunktionalität und verminderter Zytotoxizität *in vitro* (*Abbildung 12*).

Bisher gab es keine Hinweise in der Literatur, dass initialer Leberschaden in der frühen Phase einer viralen Infektion die nachfolgende adaptive Immunantwort negativ reguliert. Interessanterweise konnte die CD8 T-Zell Depletion über den gesamten Beobachtungszeitraum von 50 Tagen zeigen, dass es nach hoher Infektionsdosis zu einer zweiten Phase von niedrigschwelligem, chronischem Leberschaden kommt, welcher

Diskussion

tatsächlich CD8 T-Zell-vermittelt ist (*Abbildung 5*). Wahrscheinlich erlangen CD8 T-Zellen nach der ersten Phase von starkem nicht CD8 T-Zell-vermitteltem Leberschaden ihre Funktion teilweise wieder und somit tritt die CD8 T-Zell Antwort nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis verzögert ein. Jedoch ließ sich der in der Frühphase der Infektion erworbene Defekt in der CD8 T-Zell-Antwort nicht vollständig umkehren, da die Infektion letztendlich nicht eliminiert werden konnte. Stattdessen ging die Infektion in eine Form der chronischen Hepatitis über (*Abbildung 5*). Das Modellsystem spiegelt somit die Situation einer chronischen HBV Infektion sehr gut wider. Dabei tritt auch häufig eine Form der chronischen Immunpathologie auf, welche aber meistens nicht zur Eliminierung der Infektion führt (Bertoletti et al., 2003). Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis kommt es also zur Entwicklung einer chronischen Virusinfektion, die, offenbar als Folge einer vorausgehenden Leberschädigung, der CD8 T-Zell Antwort entgeht. Die Ergebnisse sind insofern relevant, da die Kontrolle viraler Infektionen immer mit Leberschaden einhergeht und dieser somit als tolerogener Faktor angesehen werden muss, der eine negative Rückkopplungsschleife induziert, die zur Protektion von Lebergewebe beiträgt und gleichzeitig eine sich selbst verstärkende Abschaltung der CD8 T-Zell Antwort in der Leber verursacht.



Schematische Darstellung zur Relevanz der Leberschaden-vermittelten Immunregulation.

5.2 Mechanismen der Leberschaden-vermittelten Immunregulation

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen die Frage auf welcher Mechanismus dem Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen, als Folge von initialem Leberschaden, zugrunde liegt und, ob die verschiedenen pathologischen Zustände für die ein Verlust von T-Zell-Rezeptoren beschrieben ist Gemeinsamkeiten aufweisen.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen Antigen-spezifischen Effekt, welcher nur CD8 T-Zellen betrifft, die ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen (*Abbildung 11 und 17*). In diesem Aspekt weichen unsere Ergebnisse von der Literatur ab. Diese zeigt überwiegend, dass es im Kontext einer chronischen HBV Infektion, unabhängig von der Antigen-spezifität, zu einer Beeinträchtigung der globalen CD8 T-Zellpopulation kommt (Das et al., 2008). Dabei handelt es sich um den sogenannten *Bystander* Effekt, welcher auch für andere Zustände chronischer Inflammation beschrieben wird (Baniyash, 2004). Des Weiteren handelt es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phänomen der Leberschaden-induzierten Immunregulation um einen lokalen Effekt, der ausschließlich Virus-spezifische CD8 T-Zellen in der Leber betrifft und in der Milz nicht beobachtet werden kann (*Abbildung 10 und 16*).

Außerdem konnte durch den Transfer *in vitro* generierter Antigen-spezifischer CD8 Effektorzellen ausgeschlossen werden, dass Leberschaden zu einem Defekt im *Priming* der entsprechenden CD8 T-Zellen führt. Da der Leberschaden-induzierte Verlust von T-Zell-rezeptoren auch voll funktionsfähige CD8 Effektorzellen betraf (*Abbildung 21*), muss es sich bei der Leberschaden-vermittelten Immunregulation um einen Effekt handeln, der in der Effektorphase auf CD8 T-Zellen wirkt. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass es einen „Faktor X“ im geschädigten Lebergewebe geben muss, welcher für dieses Phänomen verantwortlich ist. Dabei spielen zwei Aspekte eine zentrale Rolle: die immunsuppressive Leberumgebung und die Abläufe innerhalb der betroffenen CD8 T-Zellen.

Im Kontext von Leberschaden wird eine heterogene Gruppe von Zellen angezogen, welche durch die Freisetzung von Oxidantien wie NO⁵¹ und PGE₂⁵² T-Zell Aktivierung und Proliferation hemmen kann (Kono et al., 1996) (Otsuji, Kimura, Aoe, Okamoto, & Saito, 1996). Zusätzlich spielt L-Arginin Verbrauch in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle.

⁵¹ Stickstoffmonoxid

⁵² Prostaglandin E₂

Diskussion

L-Arginin ist für die CD8 T-Zell Proliferation und Funktion eine essentielle Aminosäure und wird in der Leber von Arginase-1-produzierenden Zellen abgebaut (Protzer et al., 2012). Wichtig zu erwähnen ist auch, dass das Enzym Arginase-1 in großen Mengen aus toten Hepatozyten freigesetzt wird und ihm deshalb gerade im Kontext von Leberschaden eine wichtige Rolle zukommt (Aminlari, Vaseghi, Sajedianfard, & Samsami, 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an L-Arginin ebenfalls zu einem Verlust von CD3 ζ und einem daraus resultierenden Defekt in der Stabilität des TZR-CD3 Komplexes an der Zelloberfläche führt (Rodriguez et al., 2003). Allerdings sahen wir in der vorliegenden Arbeit nach *ex vivo* Kultivierung in L-Arginin-freiem Medium eine Hochregulation der TZR und CD3 ζ auf Virus-spezifischen CD8 T-Zellen (*Abbildung 22*), was dagegen spricht, dass L-Arginin Mangel in der Leberumgebung der entscheidende Faktor für den Leberschaden-induzierten Verlust von TZR ist. Eine Aussage über die Auswirkung des Verlustes von TZR auf den Infektionsverlauf kann in diesem Kontext nicht getroffen werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine gewissen Anzahl von Hepatozyten mit Ad-CMV-GOL und gleichzeitig mit Ad-CMV-GDL infiziert sind und daraufhin durch Induktion von Leberschaden eine Immun-vermittelte Eliminierung von Ad-CMV-GOL infizierten Zellen vorgegeben wird.

Abschließend stellte sich die Frage welcher molekulare Mechanismus durch Leberschaden innerhalb der betroffenen CD8 T-Zelle induziert wird, wodurch es dann zum Verlust der T-Zell-Rezeptoren kommt. Einerseits könnte es sich dabei um eine Regulation auf transkriptioneller Ebene handeln. Das bedeutet, dass die Expressionslevel von Transkriptionsfaktoren, welche die TZR-Expression bedingen, reduziert sein müssten (Tsokos, Nambiar, & Juang, 2003). Andererseits gäbe es die Möglichkeit der Regulation auf posttranskriptioneller Ebene. Daran könnten sogenannte microRNAs beteiligt sein, welche mRNA abbauen, oder die nachfolgende Translation hemmen (Bartel, 2004). So konnte gezeigt werden, dass bestimmte microRNAs CD3-Untereinheiten des TZR-Komplexes zum Ziel haben und dadurch zu einem Defekt im adaptiven Immunsystem führen (Asghari Alashti & Minuchehr, 2013). Bestimmte microRNAs begünstigen auch die Entwicklung von CD8 T-Zell Erschöpfung während chronischer viraler Infektionen (Moffett et al., 2017). Auch eine Regulation auf posttranslationaler Ebene wäre denkbar, wobei TZR und/oder CD3 ζ zum Beispiel für den lysosomalen Abbau markiert würden (Brundula et al., 1999) (Correa et al., 1997).

Da es nach Isolation von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen aus geschädigtem Lebergewebe schnell zu einer Rückkehr der TZR auf der Oberfläche von CD8 T-Zellen kam (*Abbildung 12*) und durch intrazelluläre Färbung der TZR $V\alpha 2$ -Kette gezeigt werden konnte, dass die Abnahme der TZR Expression auf der Zellmembran nicht mit einer Retention der TZR in intrazellulären Kompartimenten, wie dem „*recycling endosome*“ einhergeht (*Abbildung 23*), ist es wahrscheinlich, dass es durch einen „Faktor X“ im geschädigten Lebergewebe zu einer Beeinträchtigung des TZR-Recycling kommt. Beim TZR-Recycling handelt es sich um einen komplexen Prozess durch den zuvor endozytotisch aufgenommene Rezeptoren wieder an die Zelloberfläche gebracht werden. Endozytotisches Recycling spielt eine sehr wichtige Rolle im Kontext der T-Zell Aktivierung (Liu, Rhodes, Wiest, & Vignali, 2000), wobei der genau Ablauf noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Es ist bekannt, dass verschiedene Rab GTP⁵³asen (Lou, Rossy, Deng, Pagoon, & Gaus, 2016), das Protein IFT⁵⁴20 (Finetti et al., 2019) und SNX⁵⁵17 (Osborne, Piotrowski, Dick, Zhang, & Billadeau, 2015) am Rücktransport des TZR zur Zelloberfläche beteiligt sind. Inwieweit dieser Prozess durch Leberschaden beeinträchtigt wird, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Somit ergibt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die abschließende Hypothese, dass es im Zuge der Leberschaden-vermittelten Immunregulation zu einem verstärkten Abbau von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen kommt und die Regulation des verstärkten Abbaus könnte durchaus epigenetisch bedingt sein.

5.3 Klinische Relevanz der Leberschaden-vermittelten Immunregulation

Im Normalfall begünstigt Leberschaden und die damit einhergehende Entzündungsreaktion die Eliminierung einer viralen Infektion. Wenn es aber während einer chronischen Infektion zu persistierendem Leberschaden kommt, kann dies die Entstehung eines immunsuppressiven Milieus bedingen.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass Virus-spezifische CD8 T-Zellen in geschädigtem Lebergewebe ihre T-Zell-Rezeptoren verlieren und in einen Zustand von Dysfunktionalität übergehen.

⁵³ Guanosintriphosphat

⁵⁴ engl.: Intraflagellar transport system protein

⁵⁵ engl.: Sorting nexin

Diskussion

Die Beobachtung kann ein Erklärungsansatz dafür sein, warum immuntherapeutische Strategien im Kontext chronischer Infektionen der Leber in vielen Fällen immer noch nicht erfolgreich sind. Die immunologische Therapie basiert einerseits auf der therapeutischen Vakzinierung (Lim, Agcaoili, De Souza, & Chan, 2019) und andererseits auf T-Zell-basierten Therapien (Festag et al., 2019). Durch eine therapeutische Vakzinierung soll das Immunsystem des Wirts zur Bekämpfung der Infektion aktiviert werden, wohingegen T-Zell-basierten Therapien zum Ziel haben, dass frisch eingebrachten T-Zellen ihre Effektorfunktionen ausüben und somit infizierte Zellen eliminieren.

Der Verlust von TZR bei Antigenerkennung in Gegenwart von Leberschaden könnte einerseits eine Immunantwort durch die therapeutische Vakzinierung verhindern, andererseits betrifft der Verlust wahrscheinlich auch frisch eingebrachte T-Zellen im Rahmen einer T-Zell-Therapie. Somit könnte es ein wichtiger Ansatzpunkt sein genau diesen regulatorischen Mechanismus zu durchbrechen, um den Effekt immuntherapeutischer Ansätze zu verstärken. Die Erkenntnisse dieser Arbeit können somit den Weg für neue Immuntherapien gegen chronische Infektionen der Leber ebnen oder einen Beitrag zur Optimierung bereits vorhandener Immuntherapien leisten.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Ait-Goughoulte, M., Lucifora, J., Zoulim, F., & Durantel, D. (2010). Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses*, *2*(7), 1394-1410. doi:10.3390/v2071394
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, *4*(7), 499-511. doi:10.1038/nri1391
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G., & Deniz, G. (2009). Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*, *254*(2), 149-154. doi:10.1016/j.cellimm.2008.08.007
- Alberti, A., Diana, S., Sculard, G. H., Eddleston, A. L., & Williams, R. (1978). Detection of a new antibody system reacting with Dane particles in hepatitis B virus infection. *Br Med J*, *2*(6144), 1056-1058.
- Alfei, F., Kanev, K., Hofmann, M., Wu, M., Ghoneim, H. E., Roelli, P., . . . Zehn, D. (2019). TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature*, *571*(7764), 265-269. doi:10.1038/s41586-019-1326-9
- Alter, G., Malenfant, J. M., & Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, *294*(1-2), 15-22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008
- Aminlari, M., Vaseghi, T., Sajedianfard, M. J., & Samsami, M. (1994). Changes in arginase, aminotransferases and rhodanese in sera of domestic animals with experimentally induced liver necrosis. *J Comp Pathol*, *110*(1), 1-9. doi:10.1016/s0021-9975(08)80265-4
- An, J., Mehrhof, F., Harms, C., Lattig-Tunnemann, G., Lee, S. L., Endres, M., . . . Donath, S. (2013). ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis. *J Hepatol*, *58*(2), 297-305. doi:10.1016/j.jhep.2012.10.002
- Araki, K., Youngblood, B., & Ahmed, R. (2013). Programmed cell death 1-directed immunotherapy for enhancing T-cell function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *78*, 239-247. doi:10.1101/sqb.2013.78.019869
- Asghari Alashti, F., & Minuchehr, Z. (2013). MiRNAs which target CD3 subunits could be potential biomarkers for cancers. *PLoS One*, *8*(11), e78790. doi:10.1371/journal.pone.0078790
- Baniyash, M. (2004). TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*, *4*(9), 675-687. doi:10.1038/nri1434

- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., . . . Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, *439*(7077), 682-687. doi:10.1038/nature04444
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- Benseler, V., Warren, A., Vo, M., Holz, L. E., Tay, S. S., Le Couteur, D. G., . . . Bertolino, P. (2011). Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(40), 16735-16740. doi:10.1073/pnas.1112251108
- Bertoletti, A., Maini, M., & Williams, R. (2003). Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res*, *60*(2), 61-66.
- Bertoletti, A., Maini, M. K., & Ferrari, C. (2010). The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir Ther*, *15 Suppl 3*, 15-24. doi:10.3851/imp1620
- Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J., & Wherry, E. J. (2008). Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(39), 15016-15021. doi:10.1073/pnas.0801497105
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., . . . Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*, *10*(1), 29-37. doi:10.1038/ni.1679
- Boni, C., Fisicaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., . . . Ferrari, C. (2007). Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol*, *81*(8), 4215-4225. doi:10.1128/jvi.02844-06
- Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., & Griffiths, G. M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev*, *189*, 152-160.
- Bottcher, J. P., Schanz, O., Wohlleber, D., Abdullah, Z., Debey-Pascher, S., Staratschek-Jox, A., . . . Knolle, P. A. (2013). Liver-primed memory T cells generated under noninflammatory conditions provide anti-infectious immunity. *Cell Rep*, *3*(3), 779-795. doi:10.1016/j.celrep.2013.02.008
- Bronstein-Sitton, N., Cohen-Daniel, L., Vaknin, I., Ezernitchi, A. V., Leshem, B., Halabi, A., . . . Baniyash, M. (2003). Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function. *Nat Immunol*, *4*(10), 957-964. doi:10.1038/ni975
- Brundula, V., Rivas, L. J., Blasini, A. M., Paris, M., Salazar, S., Stekman, I. L., & Rodriguez, M. A. (1999). Diminished levels of T cell receptor zeta chains in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, *42*(9), 1908-1916. doi:10.1002/1529-0131(199909)42:9<1908::Aid-anr17>3.0.Co;2-7
- Casares, N., Pequignot, M. O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., . . . Kroemer, G. (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med*, *202*(12), 1691-1701. doi:10.1084/jem.20050915

- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., & Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 6(1), 15-25. doi:10.1038/cmi.2009.3
- Chisari, F. V. (1997). Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*, 99(7), 1472-1477. doi:10.1172/jci119308
- Christensen, J. E., & Thomsen, A. R. (2009). Co-ordinating innate and adaptive immunity to viral infection: mobility is the key. *Apmis*, 117(5-6), 338-355. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02451.x
- Chung, E. Y., Liu, J., Homma, Y., Zhang, Y., Brendolan, A., Saggese, M., . . . Ma, X. (2007). Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity*, 27(6), 952-964. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.014
- Correa, M. R., Ochoa, A. C., Ghosh, P., Mizoguchi, H., Harvey, L., & Longo, D. L. (1997). Sequential development of structural and functional alterations in T cells from tumor-bearing mice. *J Immunol*, 158(11), 5292-5296.
- Crispe, I. N., Giannandrea, M., Klein, I., John, B., Sampson, B., & Wuensch, S. (2006). Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev*, 213, 101-118. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00435.x
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Das, A., Hoare, M., Davies, N., Lopes, A. R., Dunn, C., Kennedy, P. T., . . . Maini, M. K. (2008). Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med*, 205(9), 2111-2124. doi:10.1084/jem.20072076
- Dong, Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., . . . Huang, Z. (2019). Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. *Nature*, 573(7775), 546-552. doi:10.1038/s41586-019-1537-0
- Dudda, J. C., Lembo, A., Bachtanian, E., Huehn, J., Siewert, C., Hamann, A., . . . Martin, S. F. (2005). Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur J Immunol*, 35(4), 1056-1065. doi:10.1002/eji.200425817
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101(4), 890-898. doi:10.1172/jci11112
- Ferguson, T. A., Herndon, J., Elzey, B., Griffith, T. S., Schoenberger, S., & Green, D. R. (2002). Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J Immunol*, 168(11), 5589-5595. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5589

- Festag, M. M., Festag, J., Frassle, S. P., Asen, T., Sacherl, J., Schreiber, S., . . . Protzer, U. (2019). Evaluation of a Fully Human, Hepatitis B Virus-Specific Chimeric Antigen Receptor in an Immunocompetent Mouse Model. *Mol Ther*, 27(5), 947-959. doi:10.1016/j.ymthe.2019.02.001
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10), 1371-1387. doi:10.1016/j.bbabi.2006.06.014
- Finetti, F., Cassioli, C., Cianfanelli, V., Onnis, A., Paccagnini, E., Kabanova, A., & Baldari, C. T. (2019). The intraflagellar transport protein IFT20 controls lysosome biogenesis by regulating the post-Golgi transport of acid hydrolases. *Cell Death Differ*. doi:10.1038/s41418-019-0357-y
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Boni, C., Massari, M., Mori, C., Zerbini, A., . . . Ferrari, C. (2009). Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut*, 58(7), 974-982. doi:10.1136/gut.2008.163600
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., . . . Ferrari, C. (2010). Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 138(2), 682-693, 693.e681-684. doi:10.1053/j.gastro.2009.09.052
- Gaipl, U. S., Munoz, L. E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., . . . Herrmann, M. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun*, 28(2-3), 114-121. doi:10.1016/j.jaut.2007.02.005
- Gallimore, A., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. (1998). Hierarchies of antigen-specific cytotoxic T-cell responses. *Immunol Rev*, 164, 29-36. doi:10.1111/j.1600-065x.1998.tb01205.x
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25(3), 486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- Gehring, A. J., Sun, D., Kennedy, P. T., Nolte-'t Hoen, E., Lim, S. G., Wasser, S., . . . Bertoletti, A. (2007). The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol*, 81(6), 2940-2949. doi:10.1128/jvi.02415-06
- Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J. A., Castelblanco, N., & Rosen, H. R. (2007). Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol*, 81(17), 9249-9258. doi:10.1128/jvi.00409-07
- Green, D. R., Droin, N., & Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev*, 193, 70-81. doi:10.1034/j.1600-065x.2003.00051.x
- Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol*, 9(5), 353-363. doi:10.1038/nri2545

- Griffith, T. S., Kazama, H., VanOosten, R. L., Earle, J. K., Jr., Herndon, J. M., Green, D. R., & Ferguson, T. A. (2007). Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8⁺ T cells that produce TRAIL. *J Immunol*, *178*(5), 2679-2687. doi:10.4049/jimmunol.178.5.2679
- Hanley, P. J., Musset, B., Renigunta, V., Limberg, S. H., Dalpke, A. H., Sus, R., . . . Daut, J. (2004). Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(25), 9479-9484. doi:10.1073/pnas.0400733101
- Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G., & Triebel, F. (1998). CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol*, *161*(8), 4058-4065.
- Hantz, O., Parent, R., Durantel, D., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., & Zoulim, F. (2009). Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol*, *90*(Pt 1), 127-135. doi:10.1099/vir.0.004861-0
- Herndon, J. M., Stuart, P. M., & Ferguson, T. A. (2005). Peripheral deletion of antigen-specific T cells leads to long-term tolerance mediated by CD8⁺ cytotoxic cells. *J Immunol*, *174*(7), 4098-4104.
- Herzer, K., Sprinzl, M. F., & Galle, P. R. (2007). Hepatitis viruses: live and let die. *Liver Int*, *27*(3), 293-301. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01422.x
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *N Engl J Med*, *361*(16), 1570-1583. doi:10.1056/NEJMra0901217
- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., & Crispe, I. N. (1994). The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity*, *1*(9), 741-749.
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., & Honjo, T. (2003). PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med*, *198*(1), 39-50. doi:10.1084/jem.20022235
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, *5*(10), 987-995. doi:10.1038/ni1112
- Jain, A., & Pasare, C. (2017). Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *J Immunol*, *198*(10), 3791-3800. doi:10.4049/jimmunol.1602000
- Johansson, U., Walther-Jallow, L., Smed-Sorensen, A., & Spetz, A. L. (2007). Triggering of dendritic cell responses after exposure to activated, but not resting, apoptotic PBMCs. *J Immunol*, *179*(3), 1711-1720.
- Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., . . . Dimanche-Boitrel, M. T. (2012). TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ*, *19*(12), 2003-2014. doi:10.1038/cdd.2012.90

Anhang

- Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., & Rieger, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods*, *159*(1-2), 197-207.
- Kaech, S. M., & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, *12*(11), 749-761. doi:10.1038/nri3307
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., . . . Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, *23*(1), 19-28. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.010
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, *26*(4), 239-257.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H., & Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol*, *22*(2), 226-229. doi:10.1016/0168-8278(95)80433-1
- Knolle, P. A., Bottcher, J., & Huang, L. R. (2015). The role of hepatic immune regulation in systemic immunity to viral infection. *Med Microbiol Immunol*, *204*(1), 21-27. doi:10.1007/s00430-014-0371-0
- Knolle, P. A., & Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, *174*, 21-34.
- Knolle, P. A., & Thimme, R. (2014). Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. *Gastroenterology*, *146*(5), 1193-1207. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.036
- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., . . . Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, *446*(7139), 1091-1095. doi:10.1038/nature05704
- Kono, K., Salazar-Onfray, F., Petersson, M., Hansson, J., Masucci, G., Wasserman, K., . . . Kiessling, R. (1996). Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol*, *26*(6), 1308-1313. doi:10.1002/eji.1830260620
- Krishnan, S., Kiang, J. G., Fisher, C. U., Nambiar, M. P., Nguyen, H. T., Kyttaris, V. C., . . . Tsokos, G. C. (2005). Increased caspase-3 expression and activity contribute to reduced CD3zeta expression in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol*, *175*(5), 3417-3423. doi:10.4049/jimmunol.175.5.3417
- Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., . . . Klugewitz, K. (2009). Priming of CD4⁺ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology*, *50*(6), 1904-1913. doi:10.1002/hep.23191
- Lim, S. G., Agcaoili, J., De Souza, N. N. A., & Chan, E. (2019). Therapeutic vaccination for chronic hepatitis B: A systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat*, *26*(7), 803-817. doi:10.1111/jvh.13085

- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., . . . Knolle, P. A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med*, *6*(12), 1348-1354. doi:10.1038/82161
- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *N Engl J Med*, *370*(5), 455-465. doi:10.1056/NEJMra1310050
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., & Vignali, D. A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity*, *13*(5), 665-675. doi:10.1016/s1074-7613(00)00066-2
- Lopes, A. R., Kellam, P., Das, A., Dunn, C., Kwan, A., Turner, J., . . . Maini, M. K. (2008). Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest*, *118*(5), 1835-1845. doi:10.1172/jci33402
- Lou, J., Rossy, J., Deng, Q., Paveon, S. V., & Gaus, K. (2016). New Insights into How Trafficking Regulates T Cell Receptor Signaling. *Front Cell Dev Biol*, *4*, 77. doi:10.3389/fcell.2016.00077
- Macon-Lemaitre, L., & Triebel, F. (2005). The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology*, *115*(2), 170-178. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02145.x
- Maini, M. K., Boni, C., Lee, C. K., Larrubia, J. R., Reignat, S., Ogg, G. S., . . . Bertoletti, A. (2000). The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med*, *191*(8), 1269-1280.
- Manske, K., Kallin, N., Konig, V., Schneider, A., Kurz, S., Bosch, M., . . . 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. doi:10.1002/hep.30080
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, *440*(7081), 237-241. doi:10.1038/nature04516
- Masopust, D., & Schenkel, J. M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol*, *13*(5), 309-320. doi:10.1038/nri3442
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*, *296*(5566), 301-305. doi:10.1126/science.1071059
- Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. (2005). Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, *93*, 101-134.
- Miyagawa, F., Gutermuth, J., Zhang, H., & Katz, S. I. (2010). The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance. *J Autoimmun*, *35*(3), 192-198. doi:10.1016/j.jaut.2010.06.007

- Moffett, H. F., Cartwright, A. N. R., Kim, H. J., Godec, J., Pyrdol, J., Aijo, T., . . . Wucherpennig, K. W. (2017). Erratum: The microRNA miR-31 inhibits CD8(+) T cell function in chronic viral infection. *Nat Immunol*, *18*(10), 1173. doi:10.1038/ni1017-1173d
- Mogensen, T. H., & Paludan, S. R. (2005). Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *J Mol Med (Berl)*, *83*(3), 180-192. doi:10.1007/s00109-004-0620-6
- Nakagomi, H., Petersson, M., Magnusson, I., Juhlin, C., Matsuda, M., Mellstedt, H., . . . Kiessling, R. (1993). Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res*, *53*(23), 5610-5612.
- Oestreich, K. J., Yoon, H., Ahmed, R., & Boss, J. M. (2008). NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol*, *181*(7), 4832-4839. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4832
- Osborne, D. G., Piotrowski, J. T., Dick, C. J., Zhang, J. S., & Billadeau, D. D. (2015). SNX17 affects T cell activation by regulating TCR and integrin recycling. *J Immunol*, *194*(9), 4555-4566. doi:10.4049/jimmunol.1402734
- Otsuji, M., Kimura, Y., Aoe, T., Okamoto, Y., & Saito, T. (1996). Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(23), 13119-13124. doi:10.1073/pnas.93.23.13119
- Palacios, R. (1982). Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol*, *128*(1), 337-342.
- Peng, G., Li, S., Wu, W., Tan, X., Chen, Y., & Chen, Z. (2008). PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol*, *45*(4), 963-970. doi:10.1016/j.molimm.2007.07.038
- Protzer, U., Maini, M. K., & Knolle, P. A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol*, *12*(3), 201-213. doi:10.1038/nri3169
- Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., . . . Haining, W. N. (2010). Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med*, *16*(10), 1147-1151. doi:10.1038/nm.2232
- Rathinam, V. A., Vanaja, S. K., & Fitzgerald, K. A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*, *13*(4), 333-342. doi:10.1038/ni.2237
- Rawson, P. M., Molette, C., Videtta, M., Altieri, L., Franceschini, D., Donato, T., . . . Barnaba, V. (2007). Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat Med*, *13*(12), 1431-1439. doi:10.1038/nm1679
- Rehermann, B. (2013). Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med*, *19*(7), 859-868. doi:10.1038/nm.3251

- Rehermann, B., & Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 215-229. doi:10.1038/nri1573
- Richter, K., Agnellini, P., & Oxenius, A. (2010). On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol*, 22(1), 13-23. doi:10.1093/intimm/dxp107
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., & Ochoa, A. C. (2002). Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem*, 277(24), 21123-21129. doi:10.1074/jbc.M110675200
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H., DeSalvo, J., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Quiceno, D. G., . . . Ochoa, A. C. (2003). L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol*, 171(3), 1232-1239. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1232
- Saeed, W. K., & Jun, D. W. (2014). Necroptosis: an emerging type of cell death in liver diseases. *World J Gastroenterol*, 20(35), 12526-12532. doi:10.3748/wjg.v20.i35.12526
- Saito, M., Iwakaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., . . . Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, 19(8), 746-750. doi:10.1038/90795
- Schietinger, A., & Greenberg, P. D. (2014). Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol*, 35(2), 51-60. doi:10.1016/j.it.2013.10.001
- Schurich, A., Khanna, P., Lopes, A. R., Han, K. J., Peppas, D., Micco, L., . . . Maini, M. K. (2011). Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 53(5), 1494-1503. doi:10.1002/hep.24249
- Shah, H., Bilodeau, M., Burak, K. W., Cooper, C., Klein, M., Ramji, A., . . . Feld, J. J. (2018). The management of chronic hepatitis C: 2018 guideline update from the Canadian Association for the Study of the Liver. *Cmaj*, 190(22), E677-e687. doi:10.1503/cmaj.170453
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, 8(3), 239-245. doi:10.1038/ni1443
- Shi, Y., Evans, J. E., & Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 425(6957), 516-521. doi:10.1038/nature01991
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J. F., Prenant, M., Belnoue, E., Renia, L., . . . Mazier, D. (2003). Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat Med*, 9(1), 93-96. doi:10.1038/nm808
- Simon, N. C., Aktories, K., & Barbieri, J. T. (2014). Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol*, 12(9), 599-611. doi:10.1038/nrmicro3310

- Spisek, R., Charalambous, A., Mazumder, A., Vesole, D. H., Jagannath, S., & Dhodapkar, M. V. (2007). Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood*, *109*(11), 4839-4845. doi:10.1182/blood-2006-10-054221
- Stabenow, D., Frings, M., Truck, C., Gartner, K., Forster, I., Kurts, C., . . . Knolle, P. A. (2010). Bioluminescence imaging allows measuring CD8 T cell function in the liver. *Hepatology*, *51*(4), 1430-1437. doi:10.1002/hep.23575
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., . . . Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, *313*(5791), 1287-1290. doi:10.1126/science.1129720
- Sussman, J. J., Bonifacino, J. S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A. M., Saito, T., Klausner, R. D., & Ashwell, J. D. (1988). Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*, *52*(1), 85-95. doi:10.1016/0092-8674(88)90533-8
- Tay, S. S., Wong, Y. C., McDonald, D. M., Wood, N. A., Roediger, B., Sierro, F., . . . Bowen, D. G. (2014). Antigen expression level threshold tunes the fate of CD8 T cells during primary hepatic immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(25), E2540-2549. doi:10.1073/pnas.1406674111
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(3), 231-241. doi:10.1038/nrm2312
- Teijaro, J. R. (2016). Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr Opin Virol*, *16*, 31-40. doi:10.1016/j.coviro.2016.01.001
- Thapa, R. J., Nogusa, S., Chen, P., Maki, J. L., Lerro, A., Andrade, M., . . . Balachandran, S. (2013). Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(33), E3109-3118. doi:10.1073/pnas.1301218110
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K. A., Purcell, R. H., & Chisari, F. V. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*, *77*(1), 68-76. doi:10.1128/jvi.77.1.68-76.2003
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, *267*(5203), 1456-1462.
- Thomson, A. W., & Knolle, P. A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*, *10*(11), 753-766. doi:10.1038/nri2858
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Curr Biol*, *27*(21), R1147-r1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
- Trimble, L. A., & Lieberman, J. (1998). Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and

- downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood*, 91(2), 585-594.
- Trimble, L. A., Shankar, P., Patterson, M., Daily, J. P., & Lieberman, J. (2000). Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have downmodulated CD3zeta and CD28, key signaling molecules for T-cell activation. *J Virol*, 74(16), 7320-7330. doi:10.1128/jvi.74.16.7320-7330.2000
- Tsokos, G. C., Nambiar, M. P., & Juang, Y. T. (2003). Activation of the Ets transcription factor Elf-1 requires phosphorylation and glycosylation: defective expression of activated Elf-1 is involved in the decreased TCR zeta chain gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*, 987, 240-245. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb06054.x
- Upton, J. W., & Chan, F. K. (2014). Staying alive: cell death in antiviral immunity. *Mol Cell*, 54(2), 273-280. doi:10.1016/j.molcel.2014.01.027
- Upton, J. W., Kaiser, W. J., & Mocarski, E. S. (2012). DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe*, 11(3), 290-297. doi:10.1016/j.chom.2012.01.016
- Utzschneider, D. T., Alfei, F., Roelli, P., Barras, D., Chennupati, V., Darbre, S., . . . Zehn, D. (2016). High antigen levels induce an exhausted phenotype in a chronic infection without impairing T cell expansion and survival. *J Exp Med*, 213(9), 1819-1834. doi:10.1084/jem.20150598
- von Oppen, N., Schurich, A., Hegenbarth, S., Stabenow, D., Tolba, R., Weiskirchen, R., . . . Diehl, L. (2009). Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology*, 49(5), 1664-1672. doi:10.1002/hep.22795
- Waddington, S. N., McVey, J. H., Bhella, D., Parker, A. L., Barker, K., Atoda, H., . . . Baker, A. H. (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell*, 132(3), 397-409. doi:10.1016/j.cell.2008.01.016
- Warnock, R. A., Askari, S., Butcher, E. C., & von Andrian, U. H. (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med*, 187(2), 205-216. doi:10.1084/jem.187.2.205
- Weninger, W., Crowley, M. A., Manjunath, N., & von Andrian, U. H. (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med*, 194(7), 953-966. doi:10.1084/jem.194.7.953
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 486-499. doi:10.1038/nri3862
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R. H., & Chisari, F. V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6669-6674. doi:10.1073/pnas.0401771101

- Wieland, S. F., & Chisari, F. V. (2005). Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol*, *79*(15), 9369-9380. doi:10.1128/jvi.79.15.9369-9380.2005
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gartner, K., Frings, M. K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., . . . Knolle, P. A. (2012). TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell Rep*, *2*(3), 478-487. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.001
- Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2018). Mechanisms of Inflammatory Liver Injury and Drug-Induced Hepatotoxicity. *Curr Pharmacol Rep*, *4*(5), 346-357. doi:10.1007/s40495-018-0147-0
- Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Johnson, C. D., Canbay, A., . . . Feldstein, A. E. (2014). NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*, *59*(3), 898-910. doi:10.1002/hep.26592
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., . . . Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, *445*(7128), 656-660. doi:10.1038/nature05529
- Yamaguchi, H., Fujimoto, T., Nakamura, S., Ohmura, K., Mimori, T., Matsuda, F., & Nagata, S. (2010). Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*, *40*(6), 1778-1785. doi:10.1002/eji.200940096
- Yatim, N., Cullen, S., & Albert, M. L. (2017). Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*, *17*(4), 262-275. doi:10.1038/nri.2017.9
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., . . . Albert, M. L. (2015). RIPK1 and NF-kappaB signaling in dying cells determines cross-priming of CD8(+) T cells. *Science*, *350*(6258), 328-334. doi:10.1126/science.aad0395
- Zitvogel, L., Casares, N., Pequignot, M. O., Chaput, N., Albert, M. L., & Kroemer, G. (2004). Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol*, *84*, 131-179. doi:10.1016/s0065-2776(04)84004-5

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Infektion mit einer hohen Dosis Ad-CMV-GOL geht mit fehlender Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten einher.	47
Abbildung 2: Immunhistochemische Analyse der GFP-Expression im Lebergewebe bestätigt fehlende Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis.	49
Abbildung 3: Detektion von Leberschaden und Immunzellinfiltration in früher Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektionsdosis.	51
Abbildung 4: Leberschaden in früher Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion ist nicht CD8 T-Zell-vermittelt.	53
Abbildung 5: Leberschaden in später Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion ist CD8 T-Zell-vermittelt.	53
Abbildung 6: Innate Immunaktivierung in früher Phase nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion.	55
Abbildung 7: Vermindert Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zelle nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion.	57
Abbildung 8: Phänotypische Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zelle nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion.	59
Abbildung 9: Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion produzieren Virus-spezifische CD8 T-Zellen nach Antigen-spezifischer Restimulation keine Effektorzytokine.	62
Abbildung 10: Virus-spezifische CD8 T-Zellen aus geschädigtem Lebergewebe zeigen verminderte Expression von T-Zell-Rezeptoren an ihrer Oberfläche.	65

Abbildung 11: Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen, wenn diese ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen.	66
Abbildung 12: Nach hoher Ad-CMV-GOL Infektion zeigen Virus-spezifische CD8 T-Zellen verminderte Fähigkeit Virus-infizierte Hepatozyten zu eliminieren.	68
Abbildung 13: In vivo Modellsystem für die gezielte Induktion von Leberschaden mittels Diphtherietoxin.	69
Abbildung 14: Transfer naiver CD8 T-Zellen vor gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.	70
Abbildung 15: Verminderte Anzahl Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.	72
Abbildung 16: Virus-spezifische CD8 T-Zellen zeigen nach gezielter Induktion von Leberschaden nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion eine verminderte Expression von T-Zell-Rezeptoren an ihrer Oberfläche.	73
Abbildung 17: Verlust von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen, wenn diese ihr spezifisches Antigen in der Leber erkennen.	75
Abbildung 18: Phänotypische Veränderungen Virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.	75
Abbildung 19: Leberschaden-induzierter Verlust der TZR Expression betrifft auch adoptiv transferierte in vitro aktivierte CD8 Effektorzellen.	76
Abbildung 20: Verminderte Anzahl adoptiv transferierter CD8 Effektorzellen nach gezielter Induktion von Leberschaden in früher Phase nach niedriger Ad-CMV-GOL Infektion.	77

Abbildung 21: Leberschaden-induzierter Verlust von T-Zell-Rezeptoren betrifft auch CD8 Effektorzellen...... 78

Abbildung 22: TZR-Verlust auf der Oberfläche Virus-spezifischer CD8 T-Zellen wird nicht durch L-Arginin Mangel im Kontext von Leberschaden bedingt. 80

Abbildung 23: Leberschaden-induzierter Verlust der Oberflächenexpression von T-Zell-Rezeptoren geht nicht mit einer intrazellulären Retention von T-Zell-Rezeptoren einher.
..... 81

Abbildung 24: Verlust der CD3 ζ -Signalweiterleitungsdomäne ist ebenfalls unabhängig vom Vorhandensein von L-Arginin im geschädigten Lebergewebe...... 82

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Formen von Zelltod in der Leber.....	12
--	-----------

6.4 Abkürzungsverzeichnis

°C *Grad Celsius*

ACK *engl.: Ammonium Chloride Potassium*

ACLF *engl.: Acute-on-chronic liver failure*

Ad *Adenovirus*

Ad-CMV-GOL *Adenovirus kodierend für eGFP, Ovalbumin und Luziferase*

AICD *engl.: Activation-induced cell death*

ALD *engl.: Alcoholic liver disease*

APAP *Acetaminophen*

APC *engl.: Antigen presenting cell*

ASC *engl.: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ATP *Adenosintriphosphat*

BSA *engl.: Bovine serum albumine*

CMV *Cytomegalievirus*

CTLA *engl.: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

DAA *engl.: Direct acting antiviral*

DAMP *engl.: Damage-associated molecular pattern*

DC *engl.: Dendritic cell*

DILI *engl.: Drug-induced liver injury*

DMEM *engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO *Dimethylsulfoxid*

DNA *engl.: Deoxyribonucleic acid*

DNS *Desoxiribonukleinsäure*

DTR *Diphtherie-Toxin-Rezeptor*

DTT *Dithiothreitol*

DTX *Diphtherie-Toxin*

engl. *Englisch*

FACS *engl.: fluorescence-activated cell sorting*

FCS *engl.: Fetal calf serum*

FMO *engl.: Fluorescence Minus One*

g *Erdbeschleunigung (9,81 m/s²), Gramm*

GBSS *Gey's Balanced Salt Solution*

GFP *engl.: Green fluorescent protein*

Anhang

GOT *Glutamat-Oxalacetat-Transaminase*

GTP *Guanosintriphosphat*

h *Stunde*

HBSS *Hank's Balanced Salt Solution*

HBV *Hepatitis B Virus*

HCC *engl.: Hepatocellular carcinoma*

HCV *Hepatitis C Virus*

HE *Hämatoxilin-Eosin*

HEK *engl.: Human embryonic kidney*

HMGB *engl.: High-mobility group box*

HRP *engl.: Horseradish peroxidase*

HSP *engl.: Heat shock protein*

i.p. intraperitoneal

i.v. intravenös

IFN *Interferon*

IFT *engl.: Intraflagellar transport system protein*

IL *Interleukin*

IU *engl.: Infectious unit*

KG *Körpergewicht*

L *Liter*

LAG *engl.: Lymphocyte-activation gene-3*

LCMV *engl.: Lymphocytic choriomeningitis virus*

LPS *Lipopolysaccharid*

LSEC *engl.: Liver sinusoidal endothelial cells*

m *Meter bzw. milli-*

M *Molar*

MACS *engl.: Magnetic-activated cell sorting*

MCMV *engl.: Murine Cytomegalievirus*

MDA *engl.: Melanoma differentiation-associated gene 5*

MHC *engl.: Major histocompatibility complex*

min *Minute*

MLKL *engl.: Mixed lineage kinase domain-like*

n *Gruppengröße bzw. nano-, Gruppengröße bzw. nano-*

NAFLD *engl.: Nonalcoholic fatty liver disease*

Anhang

Nf- κ B *engl.: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK *engl.: Natural killer*

NLRP *engl.: Nod-like receptor protein*

NO *Stickstoffmonoxid*

p.i. *nach Infektion (lat.: post infectionem)*

PAMP *engl.: Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC *engl.: Peripheral blood mononuclear cell*

PBS *engl.: Phosphate-buffered saline*

PCD *engl.: Programmed cell death*

PCR *engl.: Polymerase chain reaction*

PD *engl.: Programmed cell death protein 1*

PFA *Paraformaldehyd*

PGE₂ *Prostaglandin E2*

PMA *Phorbol 12-Myristat 13-Acetat*

PRR *engl.: Pattern recognition receptor*

RIG *engl.: Retinoic acid-inducible gene I*

RIPK *engl.: Receptor interacting protein kinase*

RNA *engl.: Ribonucleic acid*

RNS *Ribonukleinsäure*

ROI *engl.: Region of interest*

ROS *engl.: Reactive oxygen species*

RTCA *engl.: Real-time Cell Analyzer*

sALT *Serum Alanin-Aminotransferase*

sAST *Serum Aspartat-Aminotransferase*

SEM *engl.: Standard Error of the Mean*

SILAC *engl.: Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*

SNX *engl.: Sorting nexin*

TBC *engl.: Tuberculosis*

TEMED *Tetramethyldiamin*

TGF- β *engl.: Transforming growth factor beta*

TIM *engl.: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3*

TLR *engl.: Toll like receptor*

TNF *engl.: Tumor necrosis factor alpha*

TNFR *engl.: Tumor necrosis factor receptor*

Anhang

Tox *engl.: Thymocyte selection-associated high mobility group box*

TRAILR *engl.: Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor*

Upm *Umdrehungen pro Minute*

UZ *Ultrazentrifuge*

vIRA *engl.: Viral inhibitor of RIPK activation*

μ *mikro-*

6.5 Vorveröffentlichungen

Publikation (Ko-Autorenschaft):

Manske K., Kallin N., König V., Schneider A., Kurz S., Bosch M., Welz M., Cheng R.-L., Bensch B., Steiger K., Protzer U., Thimme R., Knolle P., 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.

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Kongressbeiträge:

König V., Manske K., Schneider A., Kurz S., Kallin N., Bosch M., Steiger K., Wohlleber D., Knolle P. „Liver Damage dampens antiviral Immunity by inducing loss of surface T cell receptors on virus-specific CD8 T cells.”

Poster auf dem *Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL), 2018, Hamburg, Deutschland*

König V., Manske K., Schneider A., Kurz S., Kallin N., Bosch M., Steiger K., Wohlleber D., Knolle P. „Liver Damage dampens antiviral Immunity by inducing loss of surface T cell receptors on virus-specific CD8 T cells.”

Poster auf dem *Global Hepatitis Summit, 2018, Toronto, Kanada*

König V., Manske K., Schneider A., Kurz S., Kallin N., Bosch M., Steiger K., Wohlleber D., Knolle P. „Liver Damage dampens antiviral Immunity by inducing loss of surface T cell receptors on virus-specific CD8 T cells.”

Poster auf dem *Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL), 2019, Heidelberg, Deutschland*

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank denjenigen Personen aussprechen, ohne deren Unterstützung die Anfertigung meiner Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre:

Ein besonderer Dank gilt Prof. Percy A. Knolle für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für molekulare Immunologie und experimentelle Onkologie bearbeiten zu können. Die zahlreichen Gespräche auf fachlicher und auch persönlicher Ebene waren für mich eine große Unterstützung.

Ich danke Prof. Michael Groll sehr für die hilfsbereite Betreuung als Zweitgutachter.

Des Weiteren danke ich Dr. Dirk Wohlleber für den kritischen Diskurs im Rahmen der Mentorenschaft und für die Bereitstellung der *in vivo* Modellsysteme.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit und Hilfe im Labor bedanken. Insbesondere danke ich Katrin Manske, Annika Schneider, Sandra Kurz, Silke Hegenbarth und Savvoula Michailidou.

Meinen Freunden danke ich für ihren Rückhalt und die Unterstützung in allen Höhen und Tiefen.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meinen Eltern, Astrid und Martin König, sowie meinen Großeltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und in schwierigen Zeiten eine große Unterstützung waren.