

**Charakterisierung zellulärer Mechanismen zur Etablierung einer
effektiven antiviralen Immunität gegen eine Hepatitis B Infektion**

DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Yvonne A. Gäbel

aus Essen

Bonn 2015

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Die vorliegende Arbeit wurde an den Instituten für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Percy A. Knolle
Institut für Molekulare Immunologie/Experimentelle Onkologie
Technische Universität München
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Joachim L. Schultze
Abteilung für Genomik und Immunregulation, LIMES-Institut
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Tag der Promotion: 06. Oktober 2015

Erscheinungsjahr: 2015

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch archiviert und publiziert.

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vom 03.06.2011 im Zeitraum von August 2010 bis Juni 2015 von Herrn Prof. Dr. med. Percy A. Knolle betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- die vorliegende Arbeit, abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln, persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde;
- die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind;
- die vorliegende Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate;
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorliegenden Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Arbeit stehen.

Bonn, den

Meiner Familie

Auszüge dieser Dissertation gingen in folgende Publikationen ein:

Li-Rung Huang, Yvonne A. Gäbel, Steffi Graf, Silke Arzberger, Christian Kurts, Mathias Heikenwalder, Percy A. Knolle & Ulrike Protzer. Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice.

Gastroenterology, June 2012; 142(7):1447-50.e3 (doi: 10.1053/j.gastro. 2012.03.006).

Yvonne A. Gäbel, Marc Ringelhan, Frank A. Schildberg, Ru-Lin Cheng, Li-Rung Huang, Zeinab Abdullah, Richard Kroczyk, Christian Kurts, Ulrike Protzer, Natalio Garbi. Mathias Heikenwalder, Percy A. Knolle. Spatio-temporally distinct layers of tolerance in the control of HBV-specific immunity.

Nature Immunology, July 2015; *in submission*

Auszüge dieser Dissertation sind Bestandteile folgender Kongressbeiträge:

2012 "7th ENII EFIS/EJI Spring School in Advanced Immunology", co-organized by Porto Conte Ricerche in Alghero, Sardinien.

Vortrag und Posterpräsentation

Titel: "The underlying mechanism responsible for the induction of persistent HBV infection"

2012 "European Congress of Immunology" (ECI) in Glasgow, Schottland.

Posterpräsentation

Titel: "The role of Foxp3⁺ regulatory T cells in the development of an adaptive immune response in a persistent HBV mouse model"

2013 "15th International Congress of Immunology" in Mailand, Italien.

Posterpräsentation

Titel: "The role of Foxp3⁺ regulatory T cells in the inhibition of an adaptive immune response in a persistent HBV mouse model"

2014 "44th Annual Meeting German Society For Immunology" in Bonn, Deutschland.

Posterpräsentation

Titel: " The role of Foxp3⁺ regulatory T cells in the inhibition of an adaptive immune response in a persistent HBV mouse model"

Weitere Publikationen:

Bastian Höchst, Frank A. Schildberg, Pia Sauerborn, Yvonne A. Gäbel, Heidrun Gevensleben, Diane Goltz, Lukas C. Heukamp, Andreas Türler, Matthias Ballmaier, Friederike Gieseke, Ingo Müller, Jörg Kalff, Christian Kurts, Percy A. Knolle, Linda Diehl. Activated human hepatic stellate cells induce myeloid derived suppressor cells from peripheral blood monocytes in a CD44-dependent fashion.

Journal of Hepatology, September 2013; 59(3):528-35 (doi: 10.1016/j.jhep.2013.04.033).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Die Hepatitis B Infektion	3
1.1.1 Das Hepatitis B Virus.....	4
1.1.2 Partikel Aufbau.....	5
1.1.3 Genomstruktur und Organisation	7
1.1.4 Viraler Replikationszyklus	9
1.1.5 Immunpathogenese der HBV Infektion	11
1.1.6 Therapiemöglichkeiten	13
1.1.7 Experimentelle HBV-Modelle	14
1.2 Einblick in das Immunsystem	16
1.2.1 Antigen-präsentierende Zellen	17
1.2.2 Antigenpräsentation	18
1.2.3 Aktivierung von T Zellen	19
1.2.4 T Zell Toleranz	20
1.2.4.1 Regulatorische T Zellen	21
1.3 Immunregulation in der Leber	24
1.3.1 Mikroanatomie der Leber	25
1.3.2 Zellpopulationen der Leber	26
2 Ziele der Arbeit	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 Geräte	30
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	32
3.1.4 Allgemeine Lösungen.....	34
3.1.4.1 Zellkulturmedien	34
3.1.4.2 Puffer.....	34
3.1.5 Kit Systeme	36
3.1.6 Antikörper.....	37
3.1.7 weitere Fluorochrome	37
3.1.8 Peptide und Dextramere	37
3.1.9 Enzyme.....	38
3.1.10 Inhibitoren und Toxine	38
3.1.11 Zelllinien.....	38
3.1.12 Mauslinien	38
3.1.13 rekombinante Viren, Bakterien und Plasmide	38

3.1.13.1 Viren	38
3.1.13.2 Bakterien	39
3.1.13.3 Plasmide	39
3.1.14 Computersoftware.....	40
3.2 Methoden	40
3.2.1 Mausexperimente.....	40
3.2.1.1 Injektion	40
3.2.1.2 Blutentnahme	40
3.2.1.3 Anästhesie	41
3.2.1.4 DNA Elektroporation	41
3.2.1.5 Hydrodynamische Injektion (HDI)	41
3.2.1.6 <i>In vivo</i> Biolumineszenz-Messung	42
3.2.2 Isolation primärer muriner Zellen	42
3.2.2.1 Einzelzell-Suspension aus der Leber	42
3.2.2.2 Einzelzell-Suspension aus der Milz.....	43
3.2.2.3 Einzelzell-Suspension aus dem Lymphknoten	43
3.2.2.4 Einzelzell-Suspension aus dem Blut	43
3.2.2.5 Bestimmung von Zellzahlen	43
3.2.3 Konservierung und Immunhistochemie von Organen	44
3.2.3.1 PFA Fixierung von Organen	44
3.2.3.2 Kryokonservierung von Lebergewebe	44
3.2.3.3 Immunhistochemische Färbungen von Organen.....	44
3.2.3.4 Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen	45
3.2.4 <i>ex vivo</i> Zellkultur	46
3.2.4.1 <i>in vivo</i> Zytotoxizitätstest	46
3.2.4.2 <i>in vitro</i> Peptidstimulation von T Zellen	47
3.2.4.3 Degranulations Assay	47
3.2.5 <i>in vitro</i> Zellkultur.....	48
3.2.5.1 HBV Virusstock	48
3.2.5.2 Bestimmung des Virustiter.....	49
3.2.5.3 LCMV (strain WE) Virusstock.....	50
3.2.5.4 Kryokonservierung von Zelllinien.....	50
3.2.6 Bakterienkultur	50
3.2.6.1 Listerienkultur zur Infektion.....	50
3.2.6.2 Plasmid-DNA Isolation aus Bakterien.....	51
3.2.7 FACS-basierte Durchflusszytometrie	51
3.2.7.1 Oberflächenfärbung	51
3.2.7.2 Intrazelluläre Färbung	51
3.2.7.3 Dextramer Färbung	52
3.2.7.4 Bestimmung absoluter Zellzahl im Durchflusszytometer	52
3.2.8 Statistik	53

4	Ergebnisse	54
4.1	Etablierung eines <i>in vivo</i> Mausmodells der Hepatitis B Virus-Infektion	54
4.1.1	AdHBV-Infektion führt zur Toleranzinduktion HBV-spezifischer Antigene	54
4.2	Eine akute HBV-HDI Infektion wird durch Kreuzpräsentation Batf3⁺ Dendritischer Zellen vermittelt	60
4.3	Die Rolle der regulatorischen T Zellen im persistenten HBV-Mausmodell	63
4.3.1	T _{REG} -Depletion in AdHBV-infizierten Mäusen induziert eine virale Hepatitis	65
4.3.2	T _{REG} -Depletion induziert HBs-spezifische Immunität in AdHBV-infizierten Mäusen	69
4.3.3	HBs-spezifische Immunität nach T _{REG} -Depletion ist nicht ausreichend zur Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten	71
4.3.4	Späte T _{REG} -Depletion induziert HBs-spezifische Immunität ohne eine Adenovirus-vermittelte Immunreaktion	75
4.4	B Zellen vermitteln die Etablierung einer HBs-spezifischen Immunität	78
4.5	AdHBV-Infektion inhibiert die weitere Expansion HBV-spezifischer CTL	82
4.6	Mechanismen zur Expansion einer HBc-spezifischen CTL-Antwort	84
4.6.1	DNA-Vakzinierung und induzierter Zelltod können keine HBc-spezifische Toleranz brechen	84
5	Diskussion	87
5.1	Niedrig-dosierte AdHBV-Infektion führt zur Toleranzinduktion HBV-spezifischer Antigene	87
5.2	T_{REG} Zellen vermitteln eine HBs-spezifische Toleranzinduktion	91
5.3	T_{REG} Zellen unterdrücken B Zellen in der Induktion einer HBs-spezifischen Immunität	94
5.4	Die Expansion, nicht das <i>priming</i> HBV-spezifischer CTL wird durch virale Mechanismen inhibiert	97
5.5	HBc-spezifische Toleranz wird durch robuste virale Mechanismen vermittelt	99
5.6	Weitere potenzielle Mechanismen zur Durchbrechung der HBV-spezifischen Antigentoleranz	100
6	Literaturverzeichnis	103
7	Abbildungsverzeichnis	115
8	Abkürzungsverzeichnis	117
9	Danksagung	123

Zusammenfassung

Neuesten Schätzungen zufolge gibt es weltweit über 240 Millionen Menschen, welche unter einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis B Virus leiden. Es kommt zu einer nicht ausreichenden antiviralen Immunantwort und induziert somit eine Immuntoleranz gegen HBV-spezifische Antigene mit dem klinischen Bild einer chronischen Hepatitis. Diese Patienten bergen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose und des hepatozellulären Karzinoms. Obwohl eine gut verträgliche prophylaktische HBV-Impfung zur Verfügung steht, gibt es jedoch kaum eine vollständige klinische Ausheilung chronisch HBV-infizierter Patienten.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von regulatorischen T Zellen (T_{REG} Zellen) während einer persistenten AdHBV-Infektion in der Maus untersucht, welches als Modellsystem der chronischen HBV-Infektion des Menschen dient. Es konnte gezeigt werden, dass T_{REG} Zellen HBV-spezifische B Zellen unterdrücken und die Etablierung einer humoralen Immunantwort verhindern. Werden T_{REG} Zellen depletiert, so können B Zellen eine partielle Immunität gegen HBsAg induzieren. B Zellen sind dann in der Lage anti-HBs Antikörper zu produzieren und führen somit zu einer HBs-spezifischen Serokonversion. Weiterhin ermöglichen B Zellen die Expansion von HBs-spezifischen $CD8^+$ T Zellen, welche nach Differenzierung in CTL und folgender Aktivierung der Effektorfunktionen die Anzahl HBV-infizierter Hepatozyten reduzieren. Dies konnte sowohl im zeitkinetischen Verlauf HBV-spezifischer Serumparameter als auch mittels immunhistochemischer Analyse des Leberparenchyms gezeigt werden. Diese B Zell-vermittelte partielle HBs-spezifische Immunität konnte jedoch weder eine Expansion klärender Hbc-spezifischer CTL noch eine vollständige Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten induzieren.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse erstmals, dass T_{REG} Zellen die Etablierung einer HBs-spezifischen adaptiven T Zell-Antwort in einer B Zell-anhängigen Art supprimieren. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auf die Existenz mindestens einer weiteren Zellpopulation, welche eine klärende und robuste Hbc-spezifische T Zell-Antwort inhibiert und zudem unabhängig vom Mechanismus der T_{REG} Zell-vermittelten Inhibition zu agieren scheint. Im Hinblick auf moderne therapeutische Strategien ermöglichen diese Erkenntnisse einen neuen Ansatz zur Optimierung der antiviralen Behandlung chronisch HBV-infizierter Patienten.

Abstract

According to the latest estimations, worldwide there are over 240 million people that suffer from a chronic infection with the Hepatitis B Virus. An insufficient antiviral immune response is mounted and induces thereby an immune tolerance against HBV-specific antigens with the clinical picture of chronic hepatitis. These patients display an increased risk for the development of liver-cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Although a well-tolerated prophylactic vaccination against HBV is readily available, there is only rarely a complete clinical recovery of chronically HBV-infected patients.

In this study, the role of regulatory T cells (T_{REG} cells) during a persistent AdHBV-infection in mice was analysed, which serves as a model system of chronic HBV-Infection in humans. It could be shown that T_{REG} cells suppress HBV-specific B cells and inhibit the establishment of a humoral immune response. When T_{REG} cells are depleted, B cells are able to induce a partial immunity against HBsAg. B cells are capable of producing neutralising anti-HBs antibodies and thereby induce an HBs-specific seroconversion. Further, B cells enable the expansion of HBs-specific $CD8^+$ T cells, which reduce the number of HBV-infected hepatocytes upon their differentiation into CTL and consequent activation of their effector functions. This could be clearly seen in the time-kinetic analysis of HBV-specific serum parameters as well as in immunohistochemical analysis of liver tissue. This B cell-mediated partial immunity could, however, neither induce the expansion of HBc-specific CTL nor lead to a complete elimination of HBV-infected hepatocytes.

Taken together, the presented results show for the first time that T_{REG} cells suppress the establishment of an HBs-specific adaptive T cell response in a B cell-dependent manner. Furthermore, the results indicate the existence of at least another cell population, which inhibits an effective and robust HBc-specific T cell response and additionally seems to act independently of the mechanism of a T_{REG} cell-mediated inhibition. In the context of modern therapeutic strategies, these findings facilitate a new approach for optimising current antiviral treatments for chronically HBV-infected patients.

1 Einleitung

1.1 Die Hepatitis B Infektion

Eine Hepatitis B Infektion ist seit je her ein globales Gesundheitsproblem, welches durch die Infektion mit dem human-pathogenen Hepatitis B Virus (HBV) verursacht wird. Eine horizontal transferierte primäre HBV-Infektion im adulten Menschen verläuft in etwa 90% der Fälle als akute und vom Patienten selbst-klärende Infektion (Ganem, 1982). In den anderen 10% der Infektionsfälle manifestiert sich eine chronische HBV-Infektion mit einhergehender T Zell-Dysfunktion (Rehermann and Nascimbeni 2005).

Weltweit zeigen ca. 2,2 Milliarden Menschen serologische Zeichen für eine momentane oder jemals durchgemachte HBV-Infektion, wovon neuesten Schätzungen zufolge über 240 Millionen Patienten chronische HBV-Träger sind. Häufig leiden diese an einer chronischen Hepatitis und zeigen eine substantiell erhöhte Wahrscheinlichkeit an Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) zu erkranken, welche zu einer jährlichen Sterberate von etwa einer Million HBV-infizierten Patienten führt (Lavanchy 2004; Perz et al. 2006). Die Wahrscheinlichkeit an Leberzirrhose, Leberversagen oder HCC zu erkranken liegt bei 15-40% aller chronischen HBV-Träger (Wright 2006). HCC ist weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen, wobei ca. 70-80% der HCC-erkrankten Patienten eine nachgewiesene HBV-Infektion tragen (Blumberg 2010). Der häufigste Übertragungsweg von HBV ist die horizontale Transmission zwischen adulten Menschen, hauptsächlich durch infizierte Körperflüssigkeiten (Blut-Transfusionen, gebrauchte Nadeln, Geschlechtsverkehr). In Regionen wie Afrika, Asien und dem West-Pazifik ist die Durchseuchungsrate von HBV sehr hoch (**Abb. 1-1**), da es dort wesentlich häufiger zu einer vertikalen Transmission kommt, bei der HBV-positive Mütter die Infektion perinatal auf ihr Neugeborenes übertragen. Solch eine Infektion resultiert im Gegensatz zu einer Transmission im adulten Stadium überwiegend (etwa 90% der Fälle) in einer chronisch verlaufenden HBV-Infektion.

Obwohl eine sehr effiziente und verträgliche Impfung als Prophylaxe gegen HBV zur Verfügung steht (Francis et al. 1982), hilft diese jedoch nicht bei einer bestehenden Infektion mit HBV. Ist es zu einer Infektion gekommen, werden als Therapien sowohl

pegyliertes Interferon α (Perrillo 2009) als auch Nukleotid- und Nukleosid- Analoga (Fung et al. 2011; Hoofnagle & di Bisceglie 1997) eingesetzt (**Abb. 1-4**). Entecavir und Tenofovir werden zur Zeit als erstes Mittel der Wahl zur Behandlung einer chronischen Hepatitis B Infektion eingesetzt, da diese beiden Medikamente effektiver in der Suppression der HBV-Replikation sind als Lamivudin (Lim et al. 2014). Diese zahlreichen Medikamente sind jedoch nicht immer erfolgreich zur Behandlung von HBV und bergen zudem viele Nebenwirkungen. Weiterhin erschweren immer neu dazukommende Mutationen des Virus die Kontrolle mit bekannten Medikamenten.

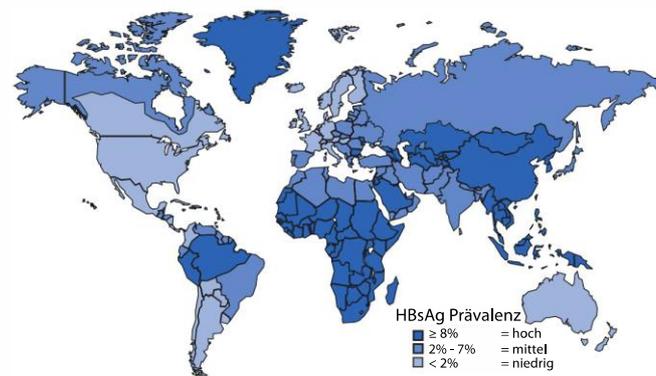


Abbildung 1-1 Globale Verteilung chronischer HBV-Träger in der Gesamtbevölkerung.
Modifiziert nach (FAQ about Hepatitis B - Stanford University School of Medicine; CDC 2008).

1.1.1 Das Hepatitis B Virus

Das humane Hepatitis B Virus wurde erstmals 1964 durch Baruch S. Blumberg (1925-2011) und seinen Kollegen untersucht (Blumberg 1964). Im Rahmen seiner anthropologischen Forschungen zu Polymorphismen untersuchte Blumberg Blutproben verschiedener ethnischer Völker. Dabei kam ihm auch das Blut von Aborigines, den australischen Ureinwohnern, zur Analyse vor (Gitnick 1972). Diese kreuzte er regelmäßig zur Kontrolle mit einer Blut-Negativkontrolle seiner Assistentin. Als diese Negativkontrolle positiv ausfiel, konnte Blumberg darauf zurück schließen dass sich seine Assistentin mit dem Serum des Aborigines infiziert hatte. Diese entwickelte Symptome einer akuten Hepatitis und Blumberg konnte erstmals durch diesen Kontext den Zusammenhang von Infektion und einer Hepatitis nachweisen. Das aktive Agens dieser Probe nannte er aufgrund der Herkunft Australien-Antigen (*Australia-antigen, Aa*) (Alter and Blumberg 1966).

Das humane Hepatitis B Virus ist ein prototypischer Vertreter der Familie der *Hepadnaviridae*, näher des Genus Orthohepadnavirus. Vertreter der *Hepadnaviridae* sind nicht-zytopathische, membranumhüllte, doppelsträngige DNA-Viren. HBV und dessen Verwandte zeigen ein enges Wirtsspektrum und einen Lebertropismus, das heißt sie replizieren ausschließlich in Hepatozyten. Weiterhin können HBV-Virione und -Proteine von Leber-residenten Immunzellen, wie Kupffer-Zellen und den Leber-residenten Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelial cell*, LSEC) durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Phagozytose aufgenommen werden (Breiner et al. 2001). Für eine natürliche HBV-Infektion sind ausschließlich Menschen und Menschenaffen (*Hominoides*), wie der Schimpanse, empfänglich (Barker et al. 1975). Es gibt jedoch mit HBV verwandte Viren, die auch andere Tiere infizieren. Darunter zählen folgende Lebewesen, die mit Verwandten des humanen HBV-infiziert werden können: das Waldmurmeltier (*Marmota monax*) mit dem *Woodchuck Hepatitis B Virus* (WHV) (Summers et al. 1978) und der Wollaffe (*Lagothrix lagotricha*) mit dem *Woolly Monkey Hepatitis B Virus* (WMHV) (Lanford et al. 1998). Zu Vertretern der Avihepadnaviren zählen unter anderem die Pekingente (*Anas platyrhynchos*) mit dem *Duck Hepatitis B Virus* (DHBV) (Mason et al. 1980) und der Reiher (Familie der *Ardeidae*) mit dem *Heron Hepatitis B Virus* (Sprengel et al. 1988).

HBV lässt sich weiterhin in verschiedene Serotypen und Genotypen aufteilen. Die serotypische Klassifikation unterteilt sich in vier Hauptserotypen: adw, adr, ayw, ayr (Le Bouvier et al. 1972; Norder et al. 1992) und basiert auf der Aminosäuresequenz des Oberflächenproteins Hepatitis B s Antigen (HBsAg) (Okamoto et al. 1988). Die genotypische Aufteilung von A bis J lässt 10 HBV-Genotypen zu und basiert auf DNA Sequenzunterschiede innerhalb des gesamten Genoms (Michailidis et al. 2012; Schaefer 2007).

1.1.2 Partikelbau

Virale Partikel des Hepatitis B Virus können in drei unterschiedlichen Formen von einer infizierten Zelle ausgeschieden werden (**Abb. 1-2**). Zum einem gibt es die 44nm großen infektiösen Dane-Partikel, benannt nach seinem Entdecker David M. S. Dane (1923–1998) im Jahre 1970 (Dane et al. 1970), wie auch zwei weitere nicht-infektiöse subvirale Partikel

(SVP). Die beiden SVP unterscheiden sich in ihrer Morphologie und werden daher in sphärische oder filamentöse Partikel unterteilt, wobei die Dane-Partikel zum Ersteren gezählt werden.

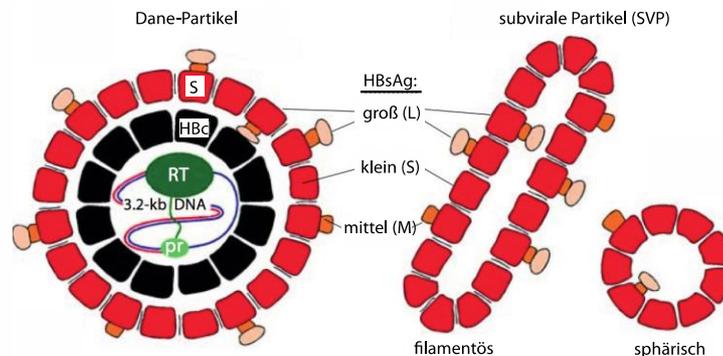


Abbildung 1-2 Aufbau und Übersicht der Virus (Dane)- und subviralen Partikel von HBV.

RT: Reverse Transkriptase; HBC: Kapsid Antigen von HBV; pr: *primer* Domäne der Polymerase. Abbildung modifiziert nach (Gerlich et al. 2010).

Das infektiöse Dane-Partikel, auch Virion genannt, ist wie alle seine Vertreter der *Hepadnaviridae* mit einer äußeren Lipiddoppelmembran versehen, welche das Nukleokapsid des Virus umhüllt. Die Lipiddoppelmembran besteht aus sowohl wirtseigenen Lipoproteinen als auch viralen Hüllproteinen, welche als Oberflächenglykoproteine oder Oberflächenantigene bezeichnet werden. Diese unterscheiden sich vor allem in ihrer Größe und werden dementsprechend in drei Proteine unterteilt: dem großen (*large*, L), mittleren (*middle*, M) und kleinen (*small*, S) HBsAg (Neurath et al. 1985). Alle drei Proteine besitzen einen stark hydrophoben C-Terminus und sind durch vier transmembrane α -Helices in der Virusmembran verankert (Berting et al. 1995). Die Häufigkeit der drei HBV-spezifischen Hüllproteine liegen bei 4(S):1(M):1(L) (Heermann et al. 1984). Bei Virionen liegt das ikosaedrisch angeordnete Nukleokapsid unter der schützenden Lipiddoppelmembran und besitzt einen kleineren Durchmesser von 27nm. Es besteht aus 180 oder 240 Kapsid (*core*, HBcAg)-Proteineinheiten (Böttcher et al. 1997) und umschließt das virale DNA-Genom (Robinson et al. 1974). Die beiden ca. 22nm kleinen sphärischen und filamentösen SVP haben hingegen keine viralen Kapside, sind oktahedrisch symmetrisch und beinhalten auch keine virale Genomkopie (Gilbert et al. 2005). Sowohl Virione als auch SVP tragen

auf ihrer Oberfläche wirtseigene Lipide und alle drei HBV-spezifische Oberflächenmoleküle (S, M, L), wobei hauptsächlich S- aber auch M-Proteine auf der Oberfläche präsentiert werden. Im Verhältnis werden die SVP mit einer Konzentration von 10^{13} Partikel/ml am häufigsten ausgeschieden, wobei die filamentösen SVP mit einer Konzentration von 10^{10} Partikel/ml nachzuweisen sind. Mit einer Konzentration von 10^9 Partikel/ml repräsentieren die infektiösen Virionen den geringsten viralen Anteil im Serum von Patienten. Die exakte Funktion der beiden nicht-infektiösen subviralen Partikel ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Obwohl sie weder virale DNA noch Kapsid-Proteine (HBcAg) enthalten, verhalten sie sich stark immunogen. Da sie eine sehr große Menge an Oberflächenantigenen (HBsAg) auf ihrer Oberfläche aufweisen (Mangold and Streeck 1993), wird postuliert dass diese unter anderem dafür zuständig sind die vom Wirt als humorale Immunantwort gebildeten neutralisierenden anti-HBs Antikörper abzufangen. Dadurch werden freie virale Oberflächenantigene, vor allem das infektiöse Virion, nicht komplexiert und verbleiben weiterhin im Serum des Wirtes. Folglich wird einer Virus-Neutralisierung durch das Immunsystem entgegengewirkt oder zumindest zeitlich verzögert.

1.1.3 Genomstruktur und Organisation

Das Hepatitis B Virus wird durch das kleinste bekannte Virusgenom kodiert und zeigt eine kompakte Genomstruktur (**Abb. 1-3**). Es besteht aus ca. 3200 Basenpaaren (bp), welches je nach Serotyp, Genotyp und Mutationen (z.B. Insertionen) leicht variieren kann, ist partiell doppelsträngig und zirkulär angeordnet. Vier offene Leseraster, die *open reading frames* (ORF), sind aufgrund der Kompaktheit des Genoms partiell überlappend angeordnet und kodieren für insgesamt sieben HBV-spezifische Proteine: drei Oberflächenproteine (HBsAg), zwei Kapsid-Proteine (HBcAg, HBeAg), das X-Protein (HBx) und die Polymerase (P).

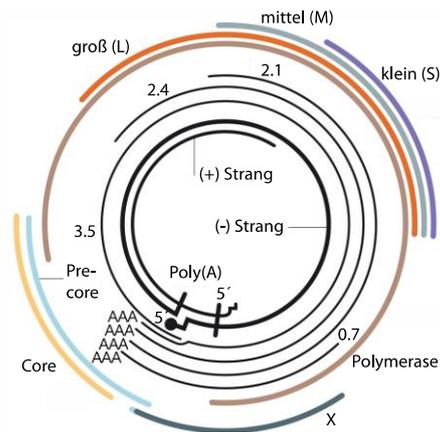


Abbildung 1-3 Genomorganisation von HBV.

Die innersten beiden Kreise stellen das partiell doppelsträngige Genom dar und repräsentieren den vollständigen Minus(-) Strang mit einem terminalen Protein am 5'-Ende und den unvollständigen Plus(+) Strang des HBV Genoms. Die mittleren feinen schwarzen Kreise repräsentieren die 3.5, 2.4, 2.1 und 0.7 kb mRNA Transkripte, welche alle nahe des poly-A Signals terminieren. Die farblich hervorgehobenen pfeilartigen Kreise stehen für die insgesamt sieben translatierten HBV Proteine: die drei Oberflächenproteine (S, M, L; HBsAg), die Polymerase, das X-Protein wie auch die beiden Kapsid-Proteine (Core, Pre-Core). Adaptiert nach (Rehermann and Nascimbeni 2005).

Das erste offene Leseraster kodiert für die drei verschiedenen Hüllproteine (HBsAg) auf der Lipiddoppelmembran, den S, M und L Proteinen. Da hierbei die mRNA für alle drei Proteine von nur einem ORF kodiert wird, gibt es rasterinterne Startcodons. Daraus ergeben sich Proteine, welche unterschiedlich lange N-terminale Domänen besitzen (Berting et al. 1995). Ein weiteres ORF kodiert für die beiden Kapsid-Proteine, dem HBcAg und dessen exkretorische Form des Proteins, das HBeAg (*Hepatitis B excretory Antigen*; PreC). Die sekretierte monomere Form (HBeAg) hat im reifen Stadium eine Überlänge von 10 Aminosäuren am N-Terminus des Proteins (Takahashi et al. 1983, 1991) und wird in die Blutbahn abgegeben und dient als serologischer Nachweis einer aktiven HBV-Replikation. Das nächste ORF kodiert nur für die virale Polymerase, welche Reverse Transkriptase (RT) Funktionen besitzt und auch als DNA Polymerase fungiert. Die RT Domänen zeigen hochkonservierte Sequenzen, welche auch bei der RT bei HIV zu finden sind (Bartholomeusz et al. 2004). Durch die RT Funktion und der Verwandtschaft zu den Retroviren, kommt es bei HBV zu einer 10-fach häufigeren Mutationsrate als bei anderen DNA-Viren und führt dadurch verstärkt zu Resistenzen gegenüber der Medikation z.B. mit Lamivudin und Adefovir (Locarnini 2004). Das letzte ORF kodiert für das HBV X-Protein (HBx). Die exakte Funktion ist immer noch unklar, es werden dem HBx Protein jedoch

onkogene Eigenschaften zugesprochen. Dabei soll HBx die wirtseigene Genexpression so ändern können, dass die Aktivität vieler verschiedener Transkriptionsaktivatoren reguliert wird und es dadurch zu verändertem Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose kommt. Dadurch kann der Prozess der Onkogenese beeinflusst werden und sogar zur Bildung hepatozellulärer Karzinome führen (Lee and Lee 2007).

1.1.4 Viraler Replikationszyklus

HBV zeigt einen starken Lebertropismus und kann ausschließlich in Hepatozyten replizieren (**Abb. 1-4**). Mit einer HBV-Infektion gelangen infektiöse Viruspartikel in die Blutbahn und erreichen diese über die Sinusoide der Leber und können folglich im Raum von Dissé direkten Kontakt mit den Hepatozyten aufnehmen.

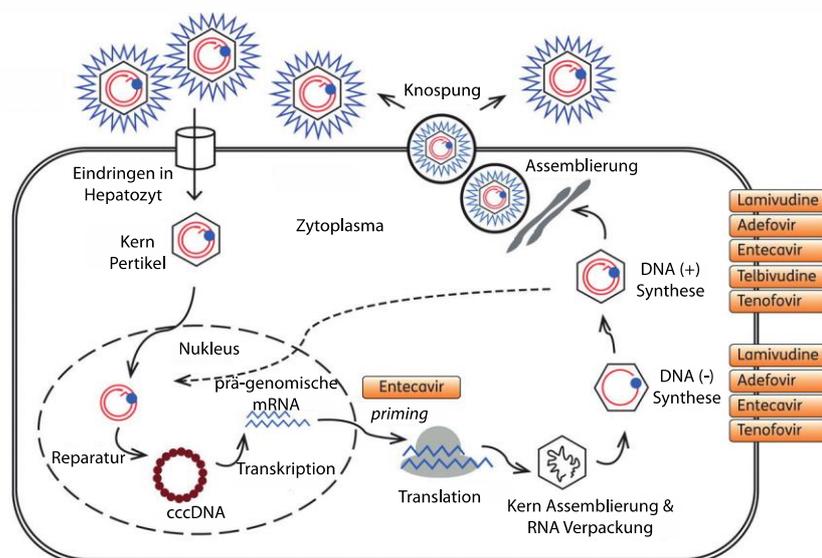


Abbildung 1-4 Infektion und Replikation von HBV.

Adaptiert nach (Fung et al. 2011).

In der frühen Phase der Infektion bindet das Virus an die Zelloberfläche von Hepatozyten. Bis vor kurzem war der genaue Mechanismus bzw. der hepatozelluläre Rezeptor für das Eindringen des infektiösen Virions in Hepatozyten nicht vollständig geklärt. Die Kollegen Yan et al. konnten nun zeigen, dass die PreS1-Region des L-Proteins (HBsAg) mit dem Natrium-Taurocholat Ko-Transport Polypeptid (*sodium (Na⁺) taurocholate cotransporting polypeptide*, NTCP) interagiert. NTCP ist ein multipler transmembraner Transporter, welcher hauptsächlich in der Leber exprimiert wird und sich bis zu 10-mal durch die

zelluläre Membran mit kleinen extrazellulären Schleifen (*loops*) spannen kann (Yan et al. 2012). Nach der Bindung kommt es zur Aufnahme vom Virus-Kapsid (Kern-Partikel) in die Zelle und zum Transport innerhalb des Zytoplasmas zum Nukleus der Wirtszelle, wahrscheinlich durch tubulären Transport. Das HBV-Genom kann in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen: als kovalent geschlossenen zirkulären Ring (*covalently closed circular DNA*, cccDNA) und als gewöhnliche zirkuläre Form (*relaxed circular DNA*, rcDNA). Nur die cccDNA kann als Transkriptionsmatrix abgelesen werden. Im Kapsid liegt das virale Genom als rcDNA vor und wird vom Kern-Partikel in den Nukleus freigelassen. Dies geschieht indem das Kapsid, welches ein nukleäres Lokalisationssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) trägt, zum nukleären Porenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) transportiert wird und damit interagiert. Mit Hilfe der Rezeptoren Importin a und b kann das Kapsid teilweise in den Nukleus aufgenommen werden, verhardt innerhalb der Pore, wird dort disassembliert und kann folglich das Genom freilassen (Kann et al. 2007). Anschließend kann die freigelassene rcDNA Form in den cccDNA Zustand konvertiert werden (Reparatur). Mit Hilfe der wirtseigenen Polymerase II wird das partiell doppelsträngige Genom komplettiert. Diese nun episomal vorliegende cccDNA dient als Matrix zur weiteren Genomsynthese des Virus. Im Nukleus findet folglich die virale Transkription mit RNA-Zwischenprodukten, wie der prä-genomischen mRNA, statt. Anschließend werden die RNA Intermediate über posttranskriptionelle Regulationselemente (*post-transcriptional regulatory element*, PRE) in das Zytoplasma geschleust und dort mit Hilfe der Ribosomen und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zu Proteinen translatiert und synthetisiert (Huang and Yen 1995). Für neue Virione werden die Nukleokapside mit einer Lipiddoppelmembran umhüllt (Kern Assemblierung & RNA Verpackung) und dann mittels des Golgi-Apparatus als reife Partikel auf sekretorischem Weg aus der Wirtszelle geschleust (Knospung) (Huovila et al. 1992; Patzer et al. 1986). Diese Virione sind infektiös und daher in der Lage weitere Hepatozyten zu infizieren. Zusätzlich werden auch nicht-infektiöse SVP assembliert und freigelassen.

1.1.5 Immunpathogenese der HBV Infektion

Wie schon erwähnt, herrscht ein starker Lebertropismus des Virus und es kommt nur in Hepatozyten zu einer viralen Replikation. In etwa 10% der horizontal vermittelten Infektionsfälle manifestiert sich eine chronische Hepatitis B Infektion. Die Prävalenz einer chronischen HBV-Infektion bei Kleinkindern liegt bei 30% und bei infizierten Neugeborenen mittels perinataler Transmission durch eine HBeAg-positive Mutter liegt die Inzidenz einer chronischen Hepatitis B Infektion bei 70-90% (Chisari and Ferrari 1995). Ist die HBV-infizierte Mutter hingegen HBeAg-negativ verringert sich die Infektionswahrscheinlichkeit des Neugeborenen auf 10-40% (Alter 2003). Eine vertikale Transmission findet meist in HBV-endemischen Gebieten statt (**Abb. 1-1**), wobei eine horizontale Transmission eher in westlichen Industrieländern prävalent ist.

Der Infektionsverlauf hängt stark von der Immunantwort des Patienten ab (**Abb. 1-5**). Ziel des Immunsystems ist es, das Virus aus dem Körper zu eliminieren. Obwohl HBV ein nicht-zytopathisches Virus ist und demnach die Wirtszelle während der viralen Replikation nicht zerstört, können dennoch Gewebeschäden und Entzündungsreaktionen durch das Immunsystem hervorgerufen werden (Dienes and Drebber 2010). Nach initialer Infektion der Hepatozyten beginnt sofort die virale Replikation, welche näher unter Abschnitt 1.1.4 beschrieben ist. Als erster Abwehrmechanismus des Wirtes dient das angeborene Immunsystem. Dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) sind in der Lage nach Aktivierung in der Leber in die Lymphknoten zu wandern und dort die zuvor prozessierten viralen Antigene an CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen zu präsentieren. Weiterhin können in der Leber sowohl die residenten Makrophagen, auch Kupffer Zellen genannt, als auch LSEC virale Antigene an T Zellen präsentieren und unterstützen zusammen mit den DC die Induktion einer adaptiven Immunantwort. HBV-spezifische T Zellen proliferieren und siedeln sich in der Leber an, wo sie ihre Effektorfunktionen als zytotoxische T Zelle (*cytotoxic T-lymphocyte*, CTL) ausüben können. Zusätzlich sekretieren HBV-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen Interferon γ (IFN γ), welches die HBV-Replikation inhibiert (Whitmire 2011). B Zellen werden durch DC und CD4⁺ T Helferzellen (T_H Zellen) aktiviert und differenzieren daraufhin in HBV-spezifische Plasmazellen, welche in der Lage sind HBV-spezifische Antikörper zu produzieren (anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs).

Die Eliminierung des Virus wird durch HBV-spezifische CTL vermittelt, welche infizierte Hepatozyten erkennen und töten können. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Rate apoptotischer Hepatozyten, welche eine chronische Leberentzündung mit sich führen kann. Diese können wiederum durch die regenerativen Heilungsprozesse und der kompensatorischen hepatischen Proliferation letztendlich in der Etablierung einer HCC resultieren (Chisari and Ferrari 1995). Bei akut verlaufenden HBV-Infektionen sind starke und polyklonale T Zell-Antworten zu beobachten, welche eine Ausheilung der Infektion zur Folge haben (Bertoletti et al. 1991; Rehermann et al. 1995). Chronische HBV-Infektionen sind mit schwachen, oligoklonalen T Zell-Antworten gegen Antigene assoziiert, welche nicht im peripheren Blut nachzuweisen sind (Penna et al. 1996). Die Ausprägung der T Zell-Antwort ist folglich von großer Bedeutung für den weiteren Infektionsverlauf.

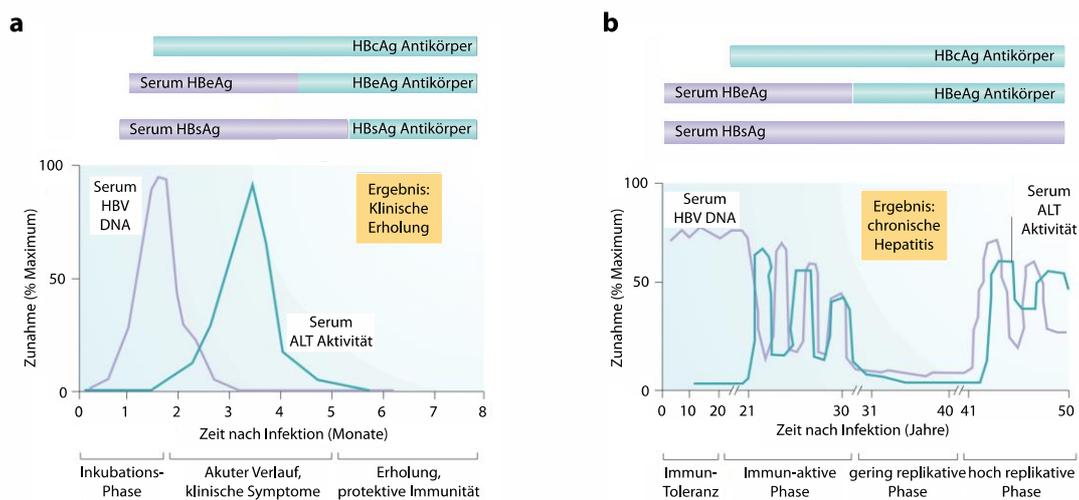


Abbildung 1-5 Verlauf einer (a) akuten und (b) chronischen HBV-Infektion.
Adaptiert nach (Rehermann & Nascimbeni 2005).

Während einer akuten HBV-Infektion (**Abb. 1-5a**) ist innerhalb eines Monats HBV-DNA im Blut infizierter Patienten nachzuweisen, wobei es sich noch um geringe Menge von ca. 10^2 - 10^4 Kopien/ml handelt. Die Infektiösität des Patienten ist zu diesem Zeitpunkt eher gering. Innerhalb weiterer sechs Wochen erreichen sowohl die Werte der HBV-DNA als auch des HBsAg und HBeAg ihr Maximum. HBcAg-spezifische IgM Antikörper werden relativ früh gebildet und verbleiben auch ein Leben lang, unabhängig des weiteren Verlaufs der Erkrankung. Als Zeichen der Leberschädigung kann nach etwa 10-15 Wochen

nach Infektion das Hepatozyten-spezifische Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum nachgewiesen werden. Bei einer akuten, selbst ausheilenden HBV-Infektion werden alle klinischen Symptome geklärt und es werden sowohl HBe- als auch neutralisierende HBs-spezifische Antikörper gebildet, so dass eine lebenslange protektive Immunität gegeben ist (Ergebnis: klinische Ausheilung).

Der Infektionsverlauf einer chronischen HBV-Infektion (**Abb. 1-5b**) ist durch hohe Werte von HBV-DNA und HBeAg charakterisiert, wobei eine erhöhte ALT-Aktivität und die damit einhergehende Leberschädigung ausbleiben. Diese Phase der chronischen HBV-Infektion wird als immuntolerant definiert und kann mehrere Dekaden anhalten. Kommt es zu einem Übergang in eine immunaktive Phase, sinken die HBV-DNA Werte aber es kommt zu einer Leberschädigung mit erhöhter ALT-Aktivität, welche sogar bis zu einer Leberzirrhose fortschreiten kann. Diese Phase kann daraufhin in eine schwach-replikative übergehen, wo freies HBeAg durch die Produktion von anti-HBe Antikörpern gebunden werden kann. Die ALT-Aktivität sinkt und die Leberschädigung reduziert sich. Dieser Zustand kann lebenslang anhalten, wobei es auch wieder zu einer hoch-replikativen Phase kommen kann und mit einhergehender schwerer Hepatitis (Ergebnis: chronische Hepatitis).

1.1.6 Therapiemöglichkeiten

Eine chronische Hepatitis B Infektion wird charakterisiert durch eine dauerhafte Präsenz von HBV-DNA und HBeAg im Serum (Lau & Wright 1993). Ist ein Patient in Remission, so wird dies mit fehlender HBV-DNA ($<10^5$ Genomkopien/ml) und HBeAg im Blut nachgewiesen, wobei HBsAg weiterhin nachweisbar bleibt (Horn et al. 1997; Kuhns 1990). Dies hat eine Verbesserung der Leberhistologie und biochemischen Parametern zur Folge, welche auch Ziel antiviraler Therapien sind und damit einen erfolgreichen Abschluss der Behandlung darstellen (Hoofnagle and di Bisceglie 1997). Als Therapiekonzept stehen zwei verschiedene Ansätze zur Verfügung: immunstimulierende alpha-Interferone ($IFN\alpha$) oder Nukleosid/Nukleotid-Analoga (*nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor*, NRTI), welche die Virusreplikation inhibieren (Michailidis et al. 2012). Wird die antivirale Immunantwort des Patienten durch Gabe von pegyliertem Interferon α -2a (peg $IFN\alpha$ -2a) stimuliert, so kommt es zu einer stärkeren CTL-Antwort, welche das aktive Eliminieren

infizierter Hepatozyten steigert. Der Vorteil einer IFN α Behandlung gegenüber NRTI liegt darin, dass sich keine Resistenzen bilden und es sich um einen zeitlich definierten Behandlungszeitraum handelt. Die Remissionsrate liegt bei 30-40% nach Beendigung einer 48-wöchigen Behandlung mit pegIFN α -2a (Perrillo 2009). Als wesentlicher Nachteil der IFN α Behandlung sind jedoch die starken Nebenwirkungen im Patienten zu nennen. Demnach kann die Replikation des Virus durch den Gebrauch von Nukleosid- (Entecavir, Telbivudin und Lamivudin) oder Nukleotid-Analoga (Tenofovir und Adefovir) inhibiert werden (Yuen and Lai 2011) (**Abb. 1-4**). Diese inhibieren die Aktivität der viralen DNA-Polymerase und unterdrücken so die virale Replikation (Fung et al. 2011). Eine vollständige Eliminierung von HBV ist nicht möglich, da die cccDNA Form im Nukleus der Hepatozyte persistiert, sofern diese Zelle nicht vom Immunsystem eliminiert wird. Obwohl die NRTI-Therapie eine bessere Verträglichkeit verspricht, da die wirtseigene DNA Synthese nicht blockiert wird, so induziert diese bei Langzeitmedikation Mutationen des HBV-Genoms und komplizieren durch erworbene Resistenzen eine effektive Behandlung.

1.1.7 Experimentelle HBV-Modelle

Aufgrund der strikten Wirtsspezifität und des Lebertropismus ist ein geeignetes Tiermodell für HBV eher limitiert. Da Primatenforschung wegen ethischer Grundsätze, limitierter Verfügbarkeit und sehr hoher Kosten nur äußerst begrenzt möglich ist, so ist es von noch größerer Bedeutung ein geeignetes Tiermodell einer HBV-Infektion zu finden.

Im Rahmen von Zellkultur Modellen gibt es *in vitro* Zelllinien, welche durch transiente oder stabil integrierte HBV-DNA infektiöse Virionen produzieren können, wie HuH-7 (Chang et al. 1987) und HepG2 (Sureau et al. 1986). Mit HBV infizierbar hingegen sind nur primäre humane Hepatozyten (*primary human hepatocyte*, PHH), welche jedoch in ihrer Verfügbarkeit limitiert sind, und die Zelllinie HepaRG (Gripon et al. 2002).

Ein geeignetes Tiermodell ist zunächst ein kleines Säugetier, welches mit wenig Platz und geringen Kosten gehalten werden kann und zudem ein komplett sequenziertes Genom vorweisen kann. Ein geeigneter Kandidat dafür ist die Maus. Als chronisches HBV-Modell dienen schon seit längerem HBV-transgene Mäuse, welche eine erworbene Toleranz gegen HBV besitzen und das Virus nicht eliminieren können (Chisari et al. 1985; Guidotti et al. 1995). Zur Untersuchung von Faktoren, welche die HBV-spezifische Immunantwort

und die Eliminierung des Virus beeinflussen wie auch den genauen Verlauf der Infektion, ist es notwendig ein akutes HBV-Modell zu untersuchen. Es gibt mehrere Ansätze zur Infektion adulter Mäuse mit HBV. Dabei muss beachtet werden, dass murine Hepatozyten aufgrund der Spezifität nicht natürlich mit HBV infiziert werden können, da der HBV-spezifische Rezeptor nicht vorhanden ist.

Zum einen können murine Hepatozyten mittels hydrodynamischer Injektion (HDI) *in vivo* transfiziert werden (Yang et al. 2002). Dabei wurde gezeigt, dass replikationsfähige HBV-DNA (pT-MCS-HBV1.3) zu einer akut verlaufenden, selbst-limitierenden Infektion führt. Dabei spielt die Wahl des Vektors eine entscheidende Rolle: wird ein Adeno-assoziiertes Virus-Vektor (pAAV) zur Injektion der HBV-DNA benutzt (pAAV-HBV1.2), so kommt es zu einer persistenten HBV-Infektion nach Applikation mittels HDI. Weiterhin ist der genetische Hintergrund der Mäuse für den viralen Verlauf von Bedeutung: wurde pAAV-HBV1.2 in C57BL/6 Mäuse (H-2K^b Haplotyp) appliziert, resultierte dies in einer persistenten HBV-Infektion. Wurden hingegen BALB/c Mäuse (H-2K^d Haplotyp) mit dem gleichen Vektor-Konstrukt infiziert, so resultierte dies in einer akut verlaufenden HBV-Infektion (Huang et al., 2006). Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die Wahl des Vektors, sondern auch der genetische Hintergrund des MHC-Haplotyps der Mäuse einen bedeutenden Einfluss auf den Verlauf der Infektion haben (Milich & McLachlan 1986; Milich & Chisari 1982; Milich et al. 1985).

Eine weitere Möglichkeit stellt die adenovirale Infektion mit HBV (AdHBV) dar. Hierbei dient das Adenovirus als Transportvehikel zur Infektion muriner Hepatozyten, welche für Adenoviren natürlich empfänglich sind. Dadurch kann HBV-DNA in die Zelle gelangen und dort replizieren (Sprinzl et al. 2001). Der Infektionsverlauf hängt hierbei von der Virusdosis ab: wird eine C57BL/6 Maus mit einer hohen Virusdosis von 1×10^9 infektiösen Einheiten (*infectious unit*, iu) AdHBV infiziert, so resultiert dies in einer akuten HBV-Infektion (Stross et al. 2012). Wird hingegen eine geringere Virusdosis von 1×10^8 iu AdHBV injiziert, so kommt es zu einem persistenten Infektionsverlauf (Huang et al. 2012). Beide Methoden, mittels hydrodynamischer Injektion und AdHBV, induzieren eine reproduzierbare HBV-Infektion von immunkompetenten Mäusen und erlauben somit eine Analyse über den Verlauf und die Dynamik der Infektion. Weiterhin ermöglichen diese Methoden eine Applikation von manipulierten HBV-Genomen, wo z.B. einzelne Gene

ausgeschaltet werden oder durch Insertion von GFP- oder Luziferase-Genkassetten ein Verfolgen infizierter Zellen erlaubt wird. Zudem können nicht nur wildtypische, sondern auch transgene Mäuse ohne zusätzlichen Aufwand infiziert werden. Dies ermöglicht die Untersuchung von HBV-spezifischen Immunantworten unter verschiedenen immunologischen Konditionen, wie etwa nach Depletion einzelner Zellpopulationen.

1.2 Einblick in das Immunsystem

Das Immunsystem dient als Schutz des lebenden Organismus und als Barriere vor eindringenden Pathogenen wie Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen. In Säugetieren lässt sich das Immunsystem in zwei Teile unterscheiden: in erster Instanz ermöglicht das angeborene Immunsystem eine schnelle Reaktion auf das Eindringen von Pathogenen und eliminiert diese schon in großen Mengen. Als zweite Instanz greift das erworbene, adaptive Immunsystem und bekämpft noch verbleibende Infektionen nun hochspezifisch und effizient. Dieser erworbene Teil des Immunsystems kann weiterhin in ein T Zell-vermitteltes zelluläres System und in ein humorales, B Zell-vermitteltes System unterteilt werden.

Das angeborene Immunsystem ist evolutionär hoch konserviert (Hoffmann et al. 1999) und erkennt eindringende Pathogene an bestimmten, eindeutigen Strukturen, die es als fremd bezeichnet und welche daher in Säugetieren nicht vorkommen (Janeway and Medzhitov 2002). Diese Strukturen werden als Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) bezeichnet, wie z. B. Lipidpolysaccharide (LPS) in der Membran von Bakterien, Zymosan bei Hefepilzen oder unmethylierte CpG-reiche DNA von Bakterien. Der Organismus besitzt dafür spezifische Struktur-erkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR) welche in professionell Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) exprimiert werden (Banchereau and Steinman 1998; Reis e Sousa 2001). Eine intensiv charakterisierte Gruppe von PRR in Säugetieren sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptor*, TLR). Finden TLR nun einen passenden Stimulus, wird die APC aktiviert und schüttet als Antwort darauf eine Vielzahl von stimulierenden Zytokinen aus (Iwasaki and Medzhitov 2004). Diese wiederum agieren mit Zellen des adaptiven Immunsystems, so dass es zu einem abhängigen Zusammenspiel beider Teile des Immunsystems kommt.

Der adaptive Teil des Immunsystems kommt dann zum Tragen, wenn das Pathogen durch das angeborene Immunsystem nicht vollständig beseitigt werden konnte. Es agiert hoch spezifisch auf die Strukturen fremder Proteine und kann nach einem ersten Kontakt mit solch einem Fremdartigen ein Gedächtnis entwickeln, welches als *memory* bekannt ist. Kommt es dann zu einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Fremdartigen, ist eine wesentlich schnellere Immunantwort dagegen möglich und es kommt zu einer rapiden Expansion solcher Gedächtniszellen (Kaech et al. 2002a; Kaech et al. 2002b). Der humorale Arm des adaptiven Immunsystems wird von B Zellen vermittelt und führt zu einer Produktion von Antikörpern, welche spezifisch fremde Antigene binden und diese zum Teil neutralisieren können, also für den Organismus unschädlich machen. Die T Zell-vermittelte zelluläre Immunantwort des adaptiven Immunsystems wird von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen ausgeübt. Diese erkennen prozessierte Fremdartigene, welche von APC präsentiert werden, so dass T Zellen nun für das Antigen spezifisch sind und im Falle von CD8⁺ T Zellen ihre zytotoxische Wirkung ausüben können.

1.2.1 Antigen-präsentierende Zellen

Zu den wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) gehören die dendritischen Zellen (DC). Daneben werden Makrophagen wie auch B Zellen zu den professionellen APC gezählt (Sertl et al. 1986). Im unreifen Stadium verweilen die DC im peripheren Gewebe, wo sie konstant sowohl körpereigene als auch Fremdartigene aufnehmen und dort eine Wächterfunktion ausüben (Kurts et al. 1996). Die Antigenpräsentation in diesem unreifen Stadium ist ineffizient, so dass eine periphere Immuntoleranz begünstigt wird (Guermontprez et al. 2002; Pulendran et al. 2001). DC exprimieren eine Reihe von PRR, welche spezifische und hochkonservierte PAMPs erkennen können. Erkennen DC nun pathogenes Antigen und Strukturen, entwickeln sich diese in reife DC und migrieren aus dem Gewebe in umliegende Lymphknoten (Banchereau and Steinman 1998). Dort angekommen, präsentieren sie das aufgenommene Antigen nun verstärkt über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) an T Zellen. Die T Zellen und ihr Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) brauchen zur Aktivierung nicht nur den MHC-Komplex, sondern auch kostimulatorische Moleküle wie CD80/86, welches zur effizienteren Aktivierung der T Zellen auf den DC hochreguliert wird. Weiterhin

schüttet die reife DC verschiedene Zytokine, wie Interleukin 12 (IL-12) und Typ-I Interferone aus, welche folglich die Aktivierung und Differenzierung der T Zellen weiter erhöht (Trinchieri 2003).

1.2.2 Antigenpräsentation

Damit im Rahmen des adaptiven Immunsystems die T Zellen ihrer Aufgabe zur Eliminierung der Pathogene nachkommen können, nehmen die APC fremdes Protein auf, prozessieren dies intrazellulär und präsentieren es über bestimmte Oberflächenmoleküle, den sogenannten MHC-Komplexen (Lanzavecchia 1996). Die MHC-Moleküle lassen sich in zwei Klassen unterscheiden: MHC-I und MHC-II. Diese Peptid:MHC-Komplexe werden seitens der T Zellen über den eigenen T Zell-Rezeptor (TCR) erkannt und gebunden. MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen eines Organismus exprimiert, wobei Antigen-präsentierende Zellen zusätzlich MHC-II-Moleküle aufweisen.

Über MHC-I-Moleküle werden überwiegend endogene Peptide präsentiert, welche aus dem Zytoplasma der APC kommen und daher auch Selbstantigene beinhalten. Die zytosolischen Proteine werden im Proteasom der Zelle verdaut und dann weiter ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort werden die prozessierten Peptide auf MHC-I-Moleküle geladen und der Peptid:MHC-I-Komplex wird zur Oberfläche der APC geschleust. Infiziert nun ein Pathogen eine Zelle, so können endogen transkribierte Proteine von der APC prozessiert werden und über MHC-I-Moleküle an CD8⁺ T Zellen präsentiert werden (Wong and Pamer 2003). Diese erkennen ein Fremdartigen und können in CTL differenzieren und infizierte Zellen gezielt eliminieren.

Nimmt die Zelle jedoch exogenes Protein auf und prozessiert dieses, werden diese Peptide über MHC-II-Moleküle an der Oberfläche präsentiert, welche dann von CD4⁺ T Zellen erkannt werden (Lanzavecchia 1996). Hierfür gelangt das exogene Protein zunächst in das Endosom oder Phagosome der APC, welches dann nach Fusion mit einem Lysosom weiter enzymatisch prozessiert wird. Dort findet dann die Beladung des MHC-II-Moleküls statt und der Peptid:MHC-II-Komplex wird zur Zelloberfläche gebracht. CD4⁺ T Zellen werden auch T Helferzellen (T_H Zellen) genannt, da sie z.B. B Zellen helfen Antikörper und Zytokine zu produzieren, welche zur weiteren Proliferation und Differenzierung von T Zellen beisteuern und zur Eliminierung der Pathogene führen.

Ein weiterer Mechanismus der Antigen-Präsentation nennt sich Kreuzpräsentation (Bevan 1976; Sigal et al. 1999). Darunter versteht man die Peptid-Präsentation exogen gewonnener Proteine anstatt über den bekannten MHC-II-Molekül Weg, nun über MHC-I-Moleküle an CD8⁺ T Zellen (Heath and Carbone 2001). Wenn ein Virus nicht in der Lage ist APC zu infizieren, so ermöglichen kreuzpräsentierende Zellen die Induktion und Expansion CD8⁺ CTL welche eine gezielte Eliminierung von Virus-infizierten Zellen vollziehen.

1.2.3 Aktivierung von T Zellen

T Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen, den Thymozyten, welche aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark stammen, von wo aus sie über die Blutbahn in den Thymus einwandern und dort reifen. Naive Vorläuferzellen der T Zellen werden im Thymus selektioniert bevor sie diesen verlassen dürfen und in die Peripherie auswandern, wo sie einen Großteil des adaptiven Immunsystems ausmachen. Ziel ist es, T Zellen mit Rezeptoren zu generieren welche in der Lage sind Pathogen-assoziierte Antigene zu erkennen, jedoch nicht gegen körpereigene Strukturen reagieren. Dies geschieht durch zwei aufeinander folgende Selektionsprozesse: Die positive Selektion im Thymus dient der Erkennung von Selbstantigenen, so dass später die präsentierenden Fremdartigene über körpereigene MHC-Moleküle erkannt werden können. Kommt es zu stark selbstreaktiven Vorläuferzellen, werden diese im Rahmen der negativen Selektion im Thymus eliminiert (Starr et al. 2003), um z.B. Autoimmunreaktionen zu verhindern.

Treffen nun naive T Zellen auf APC, welche Fremdartige über den Peptid:MHC-Komplex präsentieren, so differenzieren die naiven T Zellen in Antigen-erfahrene T Zellen. Ob ein bestimmtes Peptid seitens der T Zelle erkannt werden kann hängt von dem TCR auf deren Oberfläche ab, wobei jede Zelle nur einen bestimmten TCR exprimiert. Das TCR-Repertoire wird durch eine zufällige Kombination der diversen bestehenden Gensegmente kodiert (somatische Rekombination), so dass eine große Anzahl an Fremdpeptiden erkannt werden kann (Thompson 1995). Nur so ist die Erkennung der extrem großen Anzahl an Fremdpeptiden von ca. 10^7 bis sogar 10^9 seitens des Immunsystems gegeben (Goldrath and Bevan 1999). Der TCR erkennt nur Peptide, welche über ein MHC-Molekül auf der Oberfläche einer anderen Zelle präsentiert werden. T Zellen tragen zusätzlich den

Korezeptor CD4 oder CD8, der nur mit MHC-II oder MHC-I-Molekülen interagieren kann. Somit können T Zellen mit nur einem einzigen MHC-Molekül (MHC-I oder MHC-II) interagieren. Trifft eine T Zelle im Laufe seines Lebens von ca. ein bis drei Monaten auf kein spezifisches Antigen um aktiviert zu werden, so wird die Zelle vom Körper eliminiert und neue T Zellen werden gebildet.

Nachdem eine T Zelle ihr Antigen über den TCR erkannt hat (Signal 1), benötigt diese Kostimulation (Signal 2) in Form von z.B. CD80/86 auf der Oberfläche der APC, welches an den Rezeptor CD28 auf der T Zelloberfläche bindet. Dies ist essentiell zum Überleben der T Zelle (Boise et al. 1995) und zur Produktion bestimmter Zytokine, wie Interleukin-2 (IL-2). IL-2 dient als Wachstumsfaktor und unterstützt die Proliferationsaktivität der T Zelle (Feau et al. 2011; Malek 2008). Wird z.B. der Kostimulationsfaktor ICOS (*inducible costimulator*) anstelle von CD28 aktiviert, so resultiert die Aktivierung in der Produktion von Interleukin 10 (IL-10) mit dem ein regulatorischer Phänotyp assoziiert ist (van Berkel and Oosterwegel 2006). Das Signal 3 wird über die Ausschüttung von Zytokinen, wie Interleukin 12 (IL-12) und Typ-I-Interferone durch reife DC gegeben (Trinchieri 2003). Sind alle drei Signale zur Aktivierung der T Zelle erfüllt, so kann die T Zelle ihre Effektorfunktionen ausführen.

1.2.4 T Zell Toleranz

Damit der Organismus spezifische jedoch nicht autoreaktive Immunzellen produzieren und in die Peripherie frei lassen kann, ist es notwendig die T und B Zellen des Immunsystems noch im Vorläuferstadium auf deren Kompatibilität Selbstantigene aber auch Fremdantigene in einer angemessenen Reaktion zu erkennen, zu prüfen.

Wie schon unter 1.2.3 erwähnt, wird zuerst die zentrale Toleranz im Thymus induziert wo die Vorläuferzellen zuerst einer positiven Selektion auf das Erkennen des eigenen MHC-Moleküls und folglich der negativen Selektion unterzogen werden, um stark selbst-reaktive Thymozyten zu eliminieren. Ist diese Selektion mangelhaft, kommt es im Organismus zu einer Immunantwort gegen körpereigene Antigene und wird als Autoimmunreaktion bezeichnet. Die Antigene, welche im Thymus von den Epithelzellen (*thymic epithelial cell*, TEC) und DC präsentiert werden, sind zum einen Thymus-spezifisch aber auch solche aus dem peripheren Gewebe, wie Insulin. Die Regulation der Diversität

der Antigenpräsentation unterliegt dem Transkriptionsfaktor AIRE (*autoimmune regulator*), welcher eine entscheidende Rolle bei der zentralen Toleranzinduktion spielt (Anderson et al. 2002). Es werden nur 2-4% der im Thymus selektionierten T Zellen in die Peripherie gelassen, wobei noch vorhandene autoreaktive T Zellen durch die periphere Toleranzinduktion eliminiert werden (Liu et al. 1995; Zehn and Bevan 2006).

Die wesentlichen Mechanismen der peripheren Toleranz sind Anergie, Ignoranz und die Suppression durch regulatorische T Zellen (T_{REG} Zellen). Das gemeinsame Ziel dieser Strategien ist es, autoreaktive T Zellen in der Peripherie daran zu hindern aktiviert zu werden und ihre Effektorfunktionen auszuführen (Arnold 2002).

Anerge T Zellen entstehen durch die Antigenpräsentation ohne vorhandene Kostimulation (Signal 2). Dadurch werden nicht ausreichende Signale zur Aktivierung an die T Zelle gegeben, so dass diese inaktiviert wird und keine Effektorfunktionen ausüben kann (Jenkins and Schwartz 1987; Schwartz 2003). Neben fehlender Kostimulation kann aber auch die Expression von inhibitorischen Molekülen wie PD-1 (*programmed death-1*) und CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) zu einem ähnlich toleranten Ergebnis führen (Probst et al. 2005). Für anerge T Zellen ist dieses Schicksal dauerhaft und kann auch nicht durch inflammatorische Bedingungen während einer Infektion geändert werden (Hamilton-Williams et al. 2005).

Ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranz stellt die Ignoranz dar. Dabei weisen T Zellen eine zu geringe Affinität zum Antigen auf, da es nicht in ausreichender Konzentration vorhanden ist oder die T Zelle noch gar nicht mit dem spezifischen Antigen in Kontakt getreten ist (Kurts et al. 1998). Dies passiert z.B. in Regionen, wo es aufgrund einer Organbarriere keinen Zutritt der T Zelle zum Antigen gibt, wie im Gehirn (Alferink et al. 1998) oder im Auge (Forrester 2009).

1.2.4.1 Regulatorische T Zellen

Da in der vorliegenden Arbeit ein besonderer Fokus auf der Rolle regulatorischer T Zellen (T_{REG} Zellen) im Rahmen einer persistenten viralen Infektion liegt, wird dieser Teil der peripheren Toleranzinduktion im Folgenden ausführlicher diskutiert.

Suppressive oder auch regulatorische T Zellen regulieren die Aktivierung von anderen T Zellen und können somit z.B. Autoimmunreaktionen unterdrücken (Vignali et al. 2008)

aber auch virale Infektionen regulieren. Obwohl eine regulatorische Aktivität von T Zellen schon früher beobachtet werden konnte, wurden die suppressiven Eigenschaften von CD4⁺CD25⁺ T Zellen zuerst im Jahre 1995 von Sakaguchi et al. bewiesen, als es gelang autoreaktive T Zellen durch die Anwesenheit von CD4⁺CD25⁺ T Zellen zu kontrollieren (Sakaguchi et al. 1995). Zunächst wurden T_{REG} Zellen über die konstitutive Expression großer Mengen von CD25, den IL-2 Rezeptor, auf der Oberfläche charakterisiert, wobei CD4⁺CD25⁻ T Zellen auch eine geringe Suppression zeigten (Olivares-Villagómez et al. 2000; Beissert et al. 2006). Einige Jahre später wurde der intranukleäre Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box protein P3*) als spezifisches Merkmal für T_{REG} Zellen entdeckt und definierte diese nun mit einem CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Phänotypen (Brunkow et al. 2001). Mutationen im humanen Foxp3 Gen führen im Menschen zur Etablierung des IPEX-Syndroms (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) (Wildin et al. 2001) mit einhergehenden Autoimmunreaktionen in diversen Organen, wie z.B im Darm als chronisch entzündliche Darmerkrankung. Eine Mutation im Foxp3-Gen in der Maus resultiert im *scurfy* (*sf*) Phänotyp, welcher eine übermäßige Proliferation von CD4⁺ T Zellen, extensive multiple Organinfiltration und eine enorme Ausschüttung von Zytokinen zur Folge hat. Dies führt schließlich zu einer frühen Letalität männlicher *sf* Mäusen innerhalb von 16-25 Tagen nach Geburt (Brunkow et al. 2001).

Generell lassen sich zwei Klassen von T_{REG} Zellen identifizieren, welche über die Jahre der experimentellen Forschung verschiedene Bezeichnungen zugewiesen bekamen und hier mit der aktuellsten Benennung vorgestellt werden (Dhamne et al. 2013): Zum einen gibt es die natürlichen, im Thymus herangereiften tT_{REG} (*thymic T_{REG}*) Zellen, welche Foxp3 konstitutiv exprimieren (Bensinger et al. 2001; Maloy & Powrie 2001). Zum anderen können aus normalen CD4⁺ T Zellen in der Peripherie pT_{REG} (*peripheral T_{REG}*) Zellen induziert werden, welche auch dort heranreifen (Jonuleit et al. 2001). Der Prozess der induzierten pT_{REG} Zellen wird bei geringer Antigenmenge durch tolerogene DC (Wakkach et al. 2003) oder durch tT_{REG} selbst induziert (Jonuleit et al. 2002). Weiterhin exprimieren T_{REG} Zellen einige Oberflächenmarker, wie GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*) (Shimizu et al. 2002), Ox40/CD134 (McHugh et al. 2002), L-Selectin/CD62L (Lepault and Gagnerault 2000) oder CTLA-4/CD152 (Read et al. 2000), wobei letzteres bei induzierten

pT_{REG} Zellen zur Weiterleitung der regulatorischen Funktionen notwendig ist (Zheng et al. 2006).

T_{REG} Zellen können ihre Zielzelle auf unterschiedliche Art und Weise kontrollieren. Zum einen agieren sie indirekt und inhibieren die Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen durch CTLA-4, welches mit CD80/86 z.B. auf DC interagiert, oder inhibieren direkt durch Zell-Zell Interaktionen und Zytokinausschüttung. Die Mechanismen der direkten Suppression werden im Folgenden näher erläutert (**Abb. 1-6**).

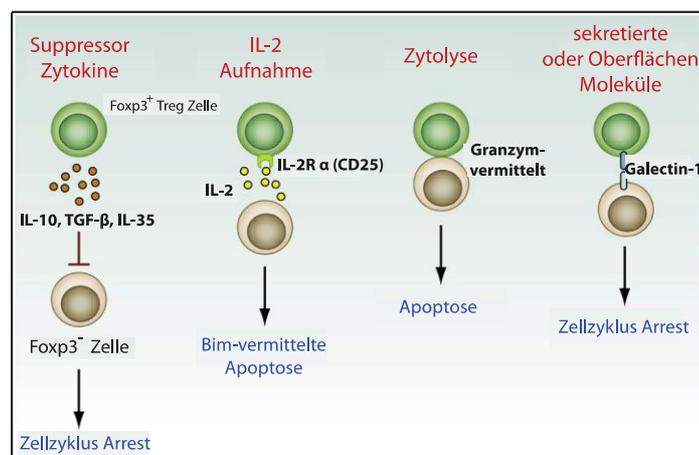


Abbildung 1-6 Hauptmechanismen der direkten Suppression von T Zellen durch regulatorische T Zellen. Adaptiert nach (Shevach 2009).

Es kann zwischen vier Hauptmechanismen der direkten T Zell Suppression unterschieden werden: i) Suppression durch inhibierende Zytokine, ii) kompetitive IL-2 Bindung durch CD25, iii) Granzym-vermittelte Apoptose und iv) Zellzyklus Arrest durch Galectin-1.

T_{REG} sind in der Lage lösliche Zytokine, wie Interleukin-10 (IL-10), TGFβ (*tumor growth factor beta*) und Interleukin-35 (IL-35) zu produzieren und somit die Aktivität und Effektorfunktionen weiterer T Zellen zu inhibieren. Die Sekretion von IL-10 hemmt unter anderem die Fähigkeit von DC, T Zellen zu aktivieren wobei TGFβ die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T Zellen inhibiert. Die Produktion von IL-10 bringt für den Organismus nicht nur protektive Eigenschaften mit, sondern kann auch eine Immunantwort gegen Tumore inhibieren.

IL-2 ist für die Aktivierung von T Zellen essentiell und wird über den IL-2 Rezeptor α (IL-2Rα oder auch CD25) aufgenommen. Um die Aktivierung der T Zellen zu inhibieren,

konkurrieren T_{REG} Zellen mit anderen T Zellen um freies IL-2. Dies würde auch die enorme Menge an CD25 auf der Oberfläche von T_{REG} Zellen erklären. Wenn nicht ausreichend IL-2 zur Aktivierung vorhanden ist, so wird die Bim (*BH3-only Bcl-2 family member Bim*)-vermittelte Apoptose eingeleitet und die Zelle stirbt (Pandiyan et al. 2007).

Neben der Zytokin-vermittelten Suppression gibt es auch eine direkte Zell-Zell vermittelte Inhibition seitens der T_{REG} Zellen. Diese kann durch Granzym vermittelt werden, welches zur Induktion von Apoptose führt oder aber auch durch Galectin-1. Letzteres kann sekretorisch oder als Oberflächenmolekül vorliegen und bindet an T Zellen (z.B. an CD45) und führt zum Zellzyklusarrest bis hin zur Lyse der Zielzelle.

1.3 Immunregulation in der Leber

Die Leber agiert im Körper immunologisch aktiv und übernimmt die Funktion des zentralen Stoffwechselorgans und hat somit viele Aufgaben zu erfüllen. Weiterhin steuert sie entscheidend zur Entgiftung des Organismus bei und dient als Energiespeicher, indem sie Glykogen speichert. Dafür metabolisiert die Leber Nährstoffe, welche über das Blut des Gastrointestinaltraktes durch die hepatische Pfortader (*Vena portae*) dorthin transportiert werden (Crispe 2009) und somit stark mit Nahrungsmittelantigenen beladen ist. Dadurch gelangt eine große Anzahl an verschiedenen harmlosen Antigenen in die Leber, wo kontinuierlich T Zellen zirkulieren und mit diesen fremden Antigenen interagieren können. Aufgrund dessen ist ein tolerogenes Milieu in der Leber besonders wichtig, so dass dauerhafte und schädigende Immunantworten unterbunden werden können (Crispe 2003; Knolle & Limmer 2001; von Oppen et al. 2009). Andererseits gelangen auf diesem Wege vermehrt Pathogene in die Leber, welche durch das stark tolerogene Umfeld nicht ausreichend bekämpft werden. Dadurch können sich persistierende Infektionen manifestieren, wie durch eine *Plasmodium sp.*-induzierte Malaria-Erkrankung (Good 1995) oder viral induzierte Hepatitiden durch HBV oder dem Hepatitis C Virus (HCV) (Rehermann et al. 1996; Spengler et al. 1996).

1.3.1 Mikroanatomie der Leber

Anatomisch gesehen ist die Leber aus mehreren funktionellen Einheiten aufgebaut, welche sich durch ihre Struktur der Vaskularisierung voneinander abgrenzen (**Abb. 1-7**). Die Blutzufuhr zur Leber besteht zu 75-80% hauptsächlich aus venösem, sauerstoffarmen Blut der hepatischen Pfortader. Der restliche Anteil der Blutzufuhr wird durch arterielles, sauerstoffreiches Blut der hepatischen Arterie (*Arteria hepatica*) geliefert, welches sich in den sogenannten Sinusoiden der Leber vermischt. Die Sinusoide sind kleine Verästelungen der Blutgefäße in der Leber mit nur einem Durchmesser von ca. 5-7µm, welches zu einer sehr langsamen Blutzirkulation führt (MacPhee et al. 1995). Sowohl der geringe Durchmesser als auch die langsame Flussgeschwindigkeit haben zur Folge, dass eine effiziente Aufnahme von Nahrungsantigenen und Toxinen seitens der Hepatozyten stattfinden kann, wie auch eine Interaktion zwischen Immunzellen im Blut mit lokal residenten APC der Leber (Knolle & Gerken 2000; Thomson & Knolle 2010).

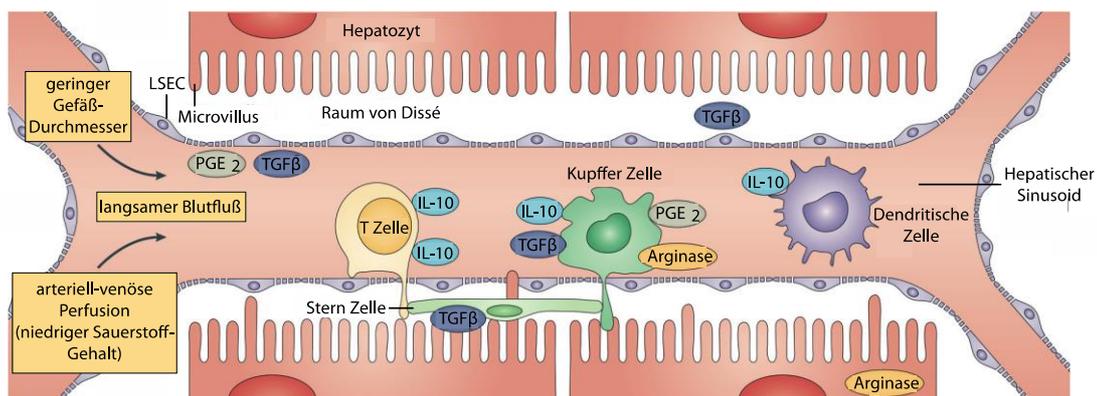


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung des Aufbaus eines hepatischen Sinusoids.
Adaptiert nach (Thomson and Knolle 2010).

Der markanteste Unterschied zwischen den Sinusoiden und anderen Blutgefäßen besteht darin, dass ihnen eine Basalmembran fehlt. Stattdessen treten sinusoidale Endothelzellen (LSEC) ein, welche die Sinusoide von innen her auskleiden und somit in direktem Kontakt mit dem Blut stehen. Zwischen den einzelnen LSEC sind kleine Poren, die sogenannten *fenestrae*, von ca. 150-175nm Durchmesser und einer Häufigkeit von 9-13 *fenestrae* pro µm² (Braet and Wisse 2002). LSEC bilden somit eine Barriere zwischen dem Parenchym (Hepatozyten) und dem Blutfluss. Direkt hinter der Reihe an LSEC befindet sich der Raum

von Dissé welcher bis zu den Hepatozyten reicht. LSEC sind in der Lage durch Aufnahme von Molekülen und deren Transzytose diese zu den Hepatozyten zu transportieren (Knolle & Limmer 2003). Weiterhin erlauben die *fenestrae* eine Diffusion von kleinen Molekülen bis 15nm Durchmesser in den Raum von Dissé (Wisse 1970; Wisse et al. 1985). Durch diese Transportwege sind ein maximaler Stoffaustausch zwischen den Hepatozyten und dem Blut gegeben, so dass die Leber ihrer Funktion als zentrales Entgiftungs- und Stoffwechselorgan bestens nachkommen kann. Zusätzlich können Lymphozyten des Blutstroms mittels feinen Ausläufern auch direkt mit Hepatozyten in Verbindung treten, indem sie die *fenestrae* im Leberendothel nutzen (Bertolino et al. 1998). Innerhalb des Raums von Dissé befinden sich noch weitere Immunzellen, wie die hepatischen Sternzellen (*hepatic stellate cell*, HSC) und einen Großteil der Kupffer-Zellen (Racanelli and Rehermann 2006; Thomson and Knolle 2010).

1.3.2 Zellpopulationen der Leber

Die Leber besteht aus einer Vielzahl von Zellpopulationen, wobei hauptsächlich die Hepatozyten, LSEC, Sternzellen, Kupffer Zellen, DC und intrahepatische Lymphozyten zu nennen sind (Racanelli & Rehermann 2006; **Abb. 1-7**).

Den Großteil der Leber mit etwa 60-80% machen die Hepatozyten aus, welche das Leberparenchym formen und metabolische Funktionen des Stoffwechsels von Molekülen und der Entgiftung des Organismus ausüben. Weiterhin erfüllen die Hepatozyten auch immunologische Aufgaben und können in Folge einer Entzündung Akut-Phase-Proteine und Proteine des Komplementsystems produzieren (Janeway and Medzhitov 2002).

Unter die restlichen 20-40% fallen alle nicht-parenchymalen Zellen der Leber: Die LSEC sind professionelle APC der Leber und machen etwa 50% der nicht-parenchymalen APC aus (Racanelli and Rehermann 2006). Sie nehmen effizient im Blut zirkulierende Antigene und mikrobielle Produkte meist durch Rezeptor-vermittelte Endozytose auf, wobei LSEC dafür verschiedene Rezeptoren, wie den Mannose-Rezeptor, Fc-Rezeptoren und *scavenger*-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (Elvevold et al. 2004; Elvevold et al. 2008). Weiterhin werden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54 (*intracellular adhesion molecule-1*), VCAM-1/CD106 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und L-SIGN/CD209L (*Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*) konstitutiv

exprimiert, so dass eine direkte Interaktion mit Lymphozyten im Blut stattfinden kann (Knolle & Gerken 2000; Thomson & Knolle 2010). LSEC können auch kreuzpräsentieren und somit lösliche Antigene aus der Umgebung aufnehmen, prozessieren und an CD8⁺ T Zellen über MHC-I-Moleküle präsentieren (Knolle et al. 1999; Limmer et al. 2000). Als professionelle APC exprimieren LSEC auch MHC-II-Moleküle, die kostimulatorischen Moleküle CD80/86 sowie die koinhibitorischen Moleküle B7-H1 (Diehl et al. 2008; Knolle et al. 1999; Lohse et al. 1996). Weiterhin sind LSEC an dem Transport von Molekülen vom Blutstrom über den Raum von Dissé direkt zu den Hepatozyten mittels Transzytose mit verantwortlich. Im Rahmen einer Infektion nutzen hepatotrope Viren, wie HBV oder HCV diesen Weg, um Hepatozyten besonders schnell zu infizieren (Protzer et al. 2012; Rehermann & Nascimbeni 2005).

Hepatische Sternzellen (HSC), oder auch Ito Zellen genannt, sind im Raum von Dissé lokalisiert und durch die LSEC vom Blutfluss getrennt und können nicht direkt mit Lymphozyten in Kontakt treten. HSC dienen als Lipid- und größten Vitamin A Speicher des Organismus und machen mit etwa 1% der nicht-parenchymalen Zellen die kleinste Zellpopulation in der Leber aus (Racanelli and Rehermann 2006). Unter zellulärem Stress können HSC zu Myofibroblasten transdifferenzieren und in Folge dessen vermehrt extrazelluläre Matrix im Raum von Dissé produzieren, welches wiederum die Entstehung einer Leberfibrose begünstigt (Geerts 2001).

Kupffer Zellen sind Leber-residente Makrophagen und dienen in erster Linie der Reinigung von Nahrungsmittelantigen-reichem Blut aus dem Gastrointestinaltrakt durch Phagozytose (MacPhee et al. 1992). Zum einen nehmen Kupffer Zellen Nahrungsmittelantigene und bakterielle Abbauprodukte auf, unterstützen aber auch die Eliminierung von toten Hepatozyten und Mikroorganismen und sorgen so dafür, dass diese in der Zirkulation nicht mehr vorhanden sind (Gregory et al. 1992; Shi et al. 1996). Kupffer Zellen machen etwa 20% der nicht-parenchymalen Zellen aus, können mit T Zellen interagieren und dienen als APC.

Hepatische DC zirkulieren auch im Lumen der Sinusoide und nehmen kontinuierlich Antigene aus dem Blut auf und präsentieren dann im hepatischen Lymphknoten das Antigen an weitere Lymphozyten (Barbier et al. 2012). Wie die Leber selbst, weisen auch hepatische DC einen stark tolerogenen Phänotypen auf und sind weniger stimulatorisch;

dies wird durch ein antiinflammatorisches Lebermilieu mittels der Produktion von IL-10 und TGF β seitens der Kupffer Zellen und LSEC gegeben (Lau and Thomson 2003; Racanelli and Rehermann 2006).

Intrahepatische Lymphozyten sind über das ganze Leberparenchym verteilt und bestehen aus Zellen des angeborenen (NKT und NK Zellen) und des adaptiven (T und B Zellen) Immunsystems. NK (*natural killer cell*) und NKT (*natural killer T cell*) Zellen sind mitverantwortlich, weitere T Zellen in die Leber zu rekrutieren, so dass diese ihre Aufgabe als CTL in der Leber ausüben können (Crispe & Mehal 1996). Durchschnittlich enthält die Lymphozytenpopulation 10^{10} Zellen, welche etwa 20% der nicht-parenchymalen Zellen der Leber ausmachen. Als Besonderheit in der Leber ist zu beachten, dass die Anzahl von CD8⁺ T Zellen über die von CD4⁺ T Zellen dominiert (Racanelli and Rehermann 2006).

2 Ziele der Arbeit

Patienten mit einer chronischen Hepatitis B Infektion haben ein stark erhöhtes Risiko an Leberfibrose, -zirrhose oder sogar einem hepatozellulärem Karzinom zu erkranken. Mit diesem Krankheitsverlauf geht eine nicht ausreichende antivirale Immunität einher, bei der sich eine Immuntoleranz gegenüber HBV-spezifischen Antigenen manifestiert.

Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es, eine funktionale CD8⁺ T Zell Antwort gegen infizierte Zellen im persistenten HBV-Mausmodel zu induzieren und somit die Toleranz gegen HBV-spezifische Antigene zu überwinden. Zytotoxische CD8⁺ T Zellen (CTL) bilden einen außerordentlich wichtigen Teil des adaptiven Immunsystems zur Bekämpfung von Pathogenen und sind in der Lage HBV-infizierte Hepatozyten des Wirtes zu eliminieren und zu einer Klärung der Infektion beizutragen. Der Organismus hat jene immunologischen Zellpopulationen entwickelt, wie die regulatorischen T Zellen (T_{REG} Zellen), welche stark überschwängliche oder auch autoimmune und somit für den Organismus gefährliche Immunantworten regulieren. Diese Immunzellen können durch virale Mechanismen in so weit reguliert werden, dass diese entweder selbst in der Ausübung ihrer Effektorfunktionen inhibiert werden oder nicht mehr in der Lage sind, andere Immunzellen in ihrer Funktion zu aktivieren.

Zusammenfassend ergaben sich hieraus folgende zentrale Fragestellungen:

- Welche Immunzellen induzieren eine effektive HBV-spezifische CTL-Antwort?
- Welche Rolle übernehmen T_{REG} Zellen in einer persistenten AdHBV-Infektion?
- Welchen Einfluss haben T_{REG} Zellen auf die humorale Immunantwort von HBV-spezifischen B Zellen?
- Gibt es immunologische Stimuli, welche die Immuntoleranz gegenüber Hbc-spezifischer Antigene überwindet?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

ALT-Messgerät	Reflovet® Plus (Roche, Schweiz)
Analysewaagen	Sartorius (Sartorius AG, Göttingen)
Autoklav	Laboklav (VWR, USA), Lautenschläger (Köln)
AutoMACS®	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Durchflusszytometer	FACSCanto™ II (BD, Heidelberg)
Eismaschine	Scotsman® MF26 (HTG Trading Ltd., Suffolk, GB)
Einfriergerät, Kryo-	Qualifreeze (Nunc, Wiesbaden)
Elektroporationsgerät	ECM 830 Electro Square Porator™ (BTX; Havard Apparatus, UK)
Erlenmeyerkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1l, 2l (Schott, Mainz)
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr comfort (Liebherr, Biberach)
Gefrierschrank (-80°C)	HERAfreeze™ (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
Gewindeflaschen	100ml, 250ml, 500ml, 1l, 2l (Schott, Mainz)
Heizblock	Thermomixer® comfort (Eppendorf, Wesseling)
Inkubator	HERAcell™ 240 (Thermo Scientific Inc., USA)
Inkubator, Schüttel-	INNOVA 4400 (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr Premium (Liebherr, Biberach) Bosch economic cooler (Bosch, Gerlingen)
MACS Zellseparator	Mini und MidiMACS™ (Miltenyi, Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	Heidolph MR 3002 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Messzylinder	Rotilabo 50ml, 100ml, 500ml, 1l (Roth, Karlsruhe)
Metallsiebe	Universität Bonn, Abteilung Feinmechanik
Mikroskope	DM IL (Leica, Wetzlar), CKX41 (Olympus, Japan)
Narkoseanlage	Fluovac (Havard Apparatus, UK)
Perfusionspumpe	Masterflex® (Novodirect, Kehl/Rhein)
pH-Meter	pH 523 (WTW, Weilheim)

Pipette	0,2-2µl, 0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl PIPETMAN® (Gilson, Thermo Scientific Inc., USA)
Pipette, Multikanal-	Transferpipette® (Brand, Wertheim)
Pipettierhilfe	Handy-Step® (Brand, Wertheim)
Präparationsbesteck	Labotec, (Labortechnik, Göttingen)
Reinstwasseranlage	NANOpure® Diamond™ (Barnstead; Iowa, USA)
Spektralphotometer	NanoDrop™ ND 1000 (NanoDrop Products, USA)
Sterilwerkbank	HERASafe (Thermo Scientific Inc., USA)
Vortexer	VMR® (VWR International, USA)
Wasserbad	TW8 (Julabo, Seelbach)
Wasserbad, Schüttel-	GFL® 1092 (GFL®, Burgwedel)
Zellzählkammer	Neubauer (Labotec, Labor-Technik Göttingen)
Zentrifuge, klein	Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge, groß	Multifuge 3s-r (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge, Ultra-	Optima™ LE-80K (SW41) (Beckman Coulter, USA)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

ALT-Streifen	Reflotron® GPT (ALT) (Roche, Schweiz)
Durchflusszytometerröhrchen	Polystyren 12/75mm (Sarstedt, Nürnberg)
Gaze (Polyamidgewebe)	40µm (Labomedic, Bonn)
Insulinspritzen	1ml Omnican® (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) 0,5ml BD Micro-Fine™ (BD, Heidelberg)
Kanülen	Sterican® 27G, 26G, 23G, 20G (B.Braun Melsungen AG, Melsungen)
Kryoverschlussröhrchen	CryoPure Röhrchen (Sarstedt AG, Sevelen)
Mikrotiterplatten	6-, 24-, 48-, 96-well (TPP, Schweiz; Corning, USA)
Parafilm	Parafilm® M (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Pasteurpipette	150mm, 230mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	10cm (Greiner, Solingen)
Pipettenspitzen	10µl, 20µl Nerbe plus (Winsen) 200µl, 1000µl Greiner bio-one (Greiner, Solingen)
Plastikmesspipetten	5ml, 10ml, 25ml Falcon® (BD, Heidelberg)

Reaktionsgefäße	PP-Röhrchen 15ml/50ml steril (Greiner, Solingen)
Schnappdeckelgefäß	0,5ml, 1,5ml, 2ml (Sarstedt AG, Sevelen)
Skalpelle	N° 10/11 Feather® (Osaka, Japan)
Slide-A-Lyzer™	Dialyse-Kassette (Thermo Scientific Inc., USA) Spritzen 2ml, 5ml, 10ml, 20ml BD Discardit™ (BD, Heidelberg)
Sterilfilter	0,22µm GP Millipore Express® PlusMembrane für Gewindeflaschen (Merck-Millipore, Darmstadt) 0,2µm Acrodisc® für Spritzen (Pall GmbH, Dreieich)
Tissue Tec® Cryomold®	Sakura Finetek (USA)
Zellkulturplatten	150x20mm (Sarstedt AG, Sevelen)
Zellkulturflaschen	T25, T75 Cellstar® (Greiner, Solingen) T175 (TPP, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen, Ultra-	Thinwall, Ultra-Clear™ (Beckman Coulter, USA)

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ampicillin	Applichem (Darmstadt)
BBL Brain-Heart-Infusion (BHI)	BD (Heidelberg)
Cäsium-Chlorid (CsCl)	Applichem (Darmstadt)
CpG 1668	TIB (Molbiol, Berlin)
D(+)-Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DMEM-Medium	Gibco (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, absolut (C ₂ H ₄ O ₂)	Applichem (Darmstadt)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA (Pasching, Österreich)
GBSS	PAN™ BioTech (Aidenbach)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Isolfuran	Forene® 100% (v/v) (AbbVie, Ludwigshafen)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Kanamycin	Applichem (Darmstadt)
Ketamin	Medistar (Ascheberg)
L-Glutamin (200mM; C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃)	Gibco (Karlsruhe)
Luciferin	Caliper Lifesciences (Rüsselsheim)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck (Darmstadt)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat (NaHPO ₄)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Ovalbumin (OVA)	Serva (Heidelberg)
Paraformaldehyd (PFA; H(-OCH ₂) _n -OH)	Fluca (Buchs, Schweiz)
PBS (mit Mg ²⁺ /Ca ²⁺)	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10mg/ml)	Gibco (Karlsruhe)
Percoll	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	Gibco (Karlsruhe)
Saccharose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Stickstoff, flüssig	Linde (Wiesbaden)
Tissue-Tek® OCT	Sakura Finetek (USA)
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Serva (Heidelberg)
Xylazin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
β-Mercaptoethanol (HS(CH ₂) ₂ OH)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Cäsium-Chlorid Puffer (10x) (sterilfiltriert)	100mM MgCl ₂ 500mM Tris-Base
Cäsium-Chlorid Gradient	<u>Dichte 1,25:</u> 36,16g CsCl 10ml 10x Cäsium-Chlorid Puffer ad 100ml H ₂ O <u>Dichte 1,34:</u> 51,20g CsCl 10ml 10x Cäsium-Chlorid Puffer ad 100ml H ₂ O <u>Dichte 1,40:</u> 62,00g CsCl 10ml 10x Cäsium-Chlorid Puffer ad 100ml H ₂ O
Dialyse-Puffer (10x) (pH 7,8; sterilfiltriert)	30% (w/v) Saccharose 1,5M NaCl 0,1M MgCl ₂ -Hexahydrat 0,1M Tris-HCL, pH 7,8 ad 1000ml H ₂ O
EDTA (0,5M) (pH 7,8-8,0)	186,1g EDTA ca. 20g NaOH 1000ml H ₂ O
FACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS, Hitze-inaktiviert 2mM EDTA 0,005% (w/v) NaN ₃

GBSS (PAN Biotech) (pH 7,4)	5mM KCl 1,6mM CaCl ₂ 0,9mM MgCl ₂ 0,3mM MgSO ₄ 0,2mM KH ₂ PO ₄ 1,7mM Na ₂ HPO ₄ 2,7mM NaHCO ₃ 5,5mM D(+)-Glukose 50mM HEPES
MACS-Puffer (pH 7,4)	PBS, 2mM EDTA 1% (v/v) FCS, Hitze-inaktiviert
PBS (pH 7,4)	80g/l NaCl 0,2g/l KCl 1,44g/l NaHPO ₄ x 2H ₂ O 0,2g/l KH ₂ PO ₄
Trypanblau-Lösung	10% (v/v) Trypanblau in PBS
Virus-Puffer	10mM Tris-HCL, pH7,8 20mM MgCl ₂

3.1.5 Kit Systeme

Alle Kits wurden nach Angaben des Herstellers benutzt.

BD Perm/Wash™	BD Biosciences (Heidelberg)
Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set	BD eBioscience (Heidelberg)
LIVE/DEAD Fixable NearIR Dead Cell Stain Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Nucleobond® PC 2000 EF	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleobond® PC 10000 EF	Macherey-Nagel (Düren)

3.1.6 Antikörper

Die im Folgenden aufgelisteten Antikörper wurden für FACS-basierte durchflusszytometrische Analysen verwendet. Alle Antikörper wurden zur Erkennung muriner Epitope verwendet und mit einem Fluorochrom konjugiert (Allophycocyanin (APC), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), PerCp Cy5.5) eingesetzt.

Antigen	Isotyp	Klon	Hersteller
CD4	IgG2b κ, Ratte	GK1.5	Biologend (San Diego, USA)
CD8α	IgG2a κ, Ratte	53-6.7	Biologend (San Diego, USA)
CD16/32	IgG2b κ, Ratte	2.4G2	eigene Produktion
CD19	IgG2a κ, Ratte	eBio1D3	eBioscience (San Diego, USA)
CD25	IgG1 λ, Ratte	PC61.5	eBioscience (San Diego, USA)
CD45R/B220	IgG2a κ, Ratte	RA3-6B2	eBioscience (San Diego, USA)
CD107α	IgG2a κ, Ratte	eBio1D4B	eBioscience (San Diego, USA)
Foxp3	IgG2a κ, Ratte	FJK-16s	eBioscience (San Diego, USA)
IFNγ	IgG1 κ, Ratte	XMG1.2	eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp Antikörper	IgG1 κ, Ratte	eBRG1	eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp Antikörper	IgG2a κ, Ratte	eBR2a	eBioscience (San Diego, USA)

3.1.7 weitere Fluorochrome

CFSE (CFDA-SE) Molecular Probes (Leiden, Niederlande)

FarRed (DDAO-SE) Molecular Probes (Leiden, Niederlande)

CountBright™

absolute counting beads Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.8 Peptide und Dextramere

Peptide	Dextramere	Allel/Sequenz	Hersteller
HBC₉₃₋₁₀₀		H-2K ^b , MGLKFRQL	Pineda (Berlin)
HBS₁₉₀₋₉₇		H-2K ^b , VWLSVIWM	Pineda (Berlin)
OVA₂₅₇₋₂₆₄		H-2K ^b , SIINFEKL	Pineda (Berlin)
	HBC ₉₃₋₁₀₀	H-2K ^b , MGLKFRQL	Immudex (Kopenhagen, Dänemark)
	HBS ₁₉₀₋₉₇	H-2K ^b , VWLSVIWM	Immudex (Kopenhagen, Dänemark)
	OVA ₂₅₇₋₂₆₄	H-2K ^b , SIINFEKL	Immudex (Kopenhagen, Dänemark)
	GP ₃₃₋₄₁	H-2D ^b , KAVYNFATC	Immudex (Kopenhagen, Dänemark)

3.1.9 Enzyme

Kollagenase A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin/EDTA	PAA (Pasching, Steinheim)

3.1.10 Inhibitoren und Toxine

Brefeldin A	eBioscience (San Diego, USA)
Diphtheria Toxin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Monensin	eBioscience (San Diego, USA)

3.1.11 Zelllinien

HEK293 Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie
---------------	-----------------------------------

3.1.12 Mauslinien

Alle Versuchstiere wurden im Haus für Experimentelle Therapie (HET) oder im Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie (IMMEI) am Universitätsklinikum Bonn unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Konditionen gehalten bzw. gezüchtet.

Mauslinie	Beschreibung
BALB/c	Inzuchtstamm mit dem MHC-I-Haplotyp H-2K ^d
C57BL/6	Inzuchtstamm mit dem MHC-I-Haplotyp H-2K ^b
Foxp3.LuciDTR-4	Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund. Dem Foxp3-Gen wurden mittels BAC-Mutagenese Gensequenzen zur Ko-Expression folgender Proteine inseriert: verstärktes GFP (eGFP); Luziferase für Biolumineszenz Visualisierung der T _{REG} Zellen; Diphtherie-Toxin Rezeptor (DTR) zur spezifischen Ablation der T _{REG} Zellen (Suffner et al. 2010).

3.1.13 rekombinante Viren, Bakterien und Plasmide**3.1.13.1 Viren**

AdHBV1.3	von Dr. Dirk Wohlleber (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Bonn) zur Verfügung gestellt.
----------	---

LCMV (strain WE) von Dr. Zeinab Abdullah (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Bonn) zur Verfügung gestellt.

3.1.13.2 Bakterien

Escherichia coli One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli (Invitrogen, Karlsruhe)

Listeria monocytogenes-OVA von Prof. Dr. Dirk Busch (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) zur Verfügung gestellt.

3.1.13.3 Plasmide

pCI-HBc pCI-Vektor mit inseriertem HBcore-Gen, Ampicillin-Resistenz; von Dr. Dirk Wohlleber (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Bonn) zur Verfügung gestellt.

pCI-HBs pCI-Vektor mit inseriertem HBsurface-Gen, Ampicillin-Resistenz; von Dr. Dirk Wohlleber (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Bonn) zur Verfügung gestellt.

pCI-OVA pCI-Vektor mit inseriertem Ovalbumin-Gen, Ampicillin-Resistenz; von Dr. Dirk Wohlleber (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Bonn) zur Verfügung gestellt.

pENTRY-HBV1.3 pENTRY-Vektor mit inseriertem HBV1.3-Genom, Kanamycin-Resistenz; von Prof. Dr. Ulrike Protzer (Institut für Virologie, TU München; Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt.

3.1.14 Computersoftware

FACS Diva V6.1.2	FACS-Messung	BD (Heidelberg)
Flowjo V8.7	Analyse von FACS-Daten	Tree Star, Inc.
Illustrator CS5 V15.0.0	Graphische Aufbereitung	Adobe
Microsoft Office 2011	Auswertung	Microsoft (USA)
Prism V4.0b	Statistik, Graph. Aufbereitung	GraphPad Software
Mendeley	Literaturverwaltung	Mendeley Ltd., Elsevier

3.2 Methoden

3.2.1 Mausexperimente

3.2.1.1 Injektion

Zur intravenösen (i.v.) Injektion wurden Mäuse vor dem Spritzen zur Anregung des Blutflusses und einer besseren Erkennung der Schwanzvene unter Rotlicht in einem Käfig erwärmt. Das zu applizierende Agens (z.B. Virus) wurde in der gewünschten Konzentration in PBS verdünnt und in eine 1ml Insulinspritze (40 Units/ml) aufgenommen. Ein Gesamtvolumen von 100-200µl wurde intravenös in die Schwanzvene der Maus appliziert.

Zur intraperitonealen (i.p.) Injektion von z.B. Diphtheria Toxin (DTX) wurde das Toxin in PBS verdünnt und in einer Konzentration von 15ng/g Körpergewicht in eine 1ml Insulinspritze aufgezogen. Zur Injektion wurde die dorsale Seite der Maus mit der einen Hand fixiert und im seitlichen ventralen unteren Bauchraum die Nadel eingestochen und das Toxin injiziert, ohne die inneren Organe (Blase, Darm) zu punktieren.

Bei der intramuskulären (i.m.) Injektion von Narkosemitteln wurde die Maus mit einer Hand fixiert und das Narkosemittel in den Oberschenkelmuskel injiziert. Dabei wurde eine Insulinspritze mit kurzer Nadel (0,5cm) verwendet.

3.2.1.2 Blutentnahme

Zur Serumgewinnung und Bestimmung von viralen Parametern wurde den Mäusen an der Schwanzvene Blut entnommen. Dafür wurden sie wie oben beschrieben unter Rotlicht erwärmt und dann in einer speziell angefertigten Maushalterung kurzzeitig leicht fixiert. Mit Hilfe eines Skalpell wurde die Schwanzvene angeritzt und wenige Tropfen Blut in einem 1,5

ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Dies wurde zur Agglutination bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (6min., 6000rpm, 4°C). Das überstehende klare Serum wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.2.1.3 Anästhesie

Kurzzeitige Anästhesien wurden durch eine intramuskuläre Applikation von Ketamin/Xylacin (im Verhältnis 3:2, in PBS verdünnt) erreicht. Für längere Anästhesien wurden die Mäuse mit einem Narkosegerät und Isofluran/Sauerstoff Gemisch durch eine Gesichtsmaske narkotisiert.

3.2.1.4 DNA Elektroporation

Zur Induktion einer spezifischen T Zell-Antwort wurde eine *in vivo* Elektroporation durchgeführt. Dafür wurde die Maus narkotisiert und der Oberschenkelmuskel äußerlich mit Ethanol desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde ein ca. 0,5cm langer Schnitt durch die Haut geführt und die in PBS gelöste DNA in einem Volumen von 50µl in den Oberschenkelmuskel (Quadrizeps) gespritzt. Die Elektrode wurde anschließend durch die Muskelhaut in den Muskel geführt und ein Stromimpuls gegeben (200V/cm; 3x50ms *pulse*; 100ms *interval*). Die Elektrode wurde um 180° gedreht, erneut in den Muskel geführt und ein weiterer Stromimpuls gegeben. Zur Vermeidung einer zu starken Unterkühlung der Maus, wurde diese auf eine beheizbare Unterlage bis zum Erlangen des Bewusstseins gehalten. Zudem wurde zum Schutz vor Austrocknung etwas "Bepanthen Augen und Nasensalbe" auf die Augen gegeben.

3.2.1.5 Hydrodynamische Injektion (HDI)

Zur Etablierung einer HBV-Infektion wurden Mäuse mittels einer *in vivo* Transfektion des pENTRY-HBV1.3 Plasmids infiziert. Dafür wurden die Mäuse unter Rotlicht erwärmt und anschließend mit Ketamin/Xylacin narkotisiert. 10µg Plasmid-DNA wurde in einer Menge PBS (mit Mg²⁺ und Ca²⁺) verdünnt, welche 8% des Körpergewichtes entspricht (20g Maus entspricht einem Volumen von 1,6ml PBS). Dieses Volumen wurde intravenös über die Schwanzvene in einer Zeitspanne von 5 Sekunden appliziert.

3.2.1.6 *In vivo* Biolumineszenz-Messung

Die Visualisierung der *in vivo* Biolumineszenz von transgenen Foxp3.LuciDTR-4 wurde mittels des IVIS (*in vivo imaging system*) durchgeführt. Das Prinzip der Visualisierung beruht darauf, dass das vorhandene Luziferase-Gen das Substrat Luziferin zu Oxyluziferin spaltet, welches wiederum Energie in Form von Photonen freisetzt. Die Kamera des IVIS kann die Photonen-Freigabe quantitativ visualisieren.

Zur Analyse der Photonen-Messung wurde den zu untersuchenden Mäusen 2,5mg Luziferin i.p. appliziert. Für eine gleichmäßige Verteilung des Luziferin, wurden die Mäuse erst nach 10min. mit Isofluran/Sauerstoff anästhesiert und zur Biolumineszenz-Messung unter die IVIS-Kamera bei ständiger Inhalationsnarkose analysiert.

3.2.2 Isolation primärer muriner Zellen

Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch Begasung mit CO₂ oder durch eine zervikale Dislokation getötet. Der Körper wurde mit Ethanol zur äußerlichen Desinfektion benetzt und die Körperhöhle mit Hilfe von Präparationsbesteck (Schere, Pinzette) geöffnet. Zur Stabilisierung der Maus während der Organentnahme wurde diese auf einer Gummiunterlage fixiert.

3.2.2.1 Einzelzell-Suspension aus der Leber

Zur Isolierung Leber-assoziiierter Lymphozyten (LAL) wurde die Leber mit Hilfe einer Kanüle mit PBS perfundiert und die *Vena cava* zum Abfließen der Flüssigkeiten durchtrennt. Die Leber wurde mit einer Geschwindigkeit von 4ml/min perfundiert bis diese heller wurde. Die Gallenblase wurde entfernt, die Leber gewogen und in ein Gefäß mit GBSS überführt zur kurzzeitigen Lagerung auf Eis. Mit Hilfe des Stempels einer 5ml Spritze und GBSS wurde sie durch ein Metallsieb gedrückt und zentrifugiert (10min., 1500rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 4ml 40% Percoll aufgenommen und in ein 15ml Gefäß überführt und mit 3ml 80% Percoll unterschichtet. Der Gradient wurde mit einer Beschleunigung von 7 und einer Bremsgeschwindigkeit von 1 zentrifugiert (20min., 1400g, RT). Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und mit ACK zur Erythrozytenlyse 10min. bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (10min., 1500rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 250µl 5% FCS/PBS resuspendiert. Für Dextramer Färbungen wurde 25µl Zellsuspension verwendet.

3.2.2.2 Einzelzell-Suspension aus der Milz

Die Milz wurde der Maus entnommen und wie oben beschrieben durch ein Metallsieb gedrückt und in PBS aufgenommen. Die Suspension wurde zentrifugiert (10min., 1500rpm, 4°C) und das Pellet zur Erythrozytenlyse in ACK-Lyse für 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert (10min., 1500rpm, 4°C) und in PBS oder FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

3.2.2.3 Einzelzell-Suspension aus dem Lymphknoten

Die zu analysierenden Lymphknoten wurden der Maus mit Hilfe einer sehr spitzen Pinzette vorsichtig entnommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit PBS überführt. Diese wurden entweder vorsichtig durch ein Metallsieb gedrückt oder mittels eines passenden Plastikstumpfers im Reaktionsgefäß homogenisiert, in PBS aufgenommen und gewaschen (10min., 1500rpm, 4°C). Das Pellet wurde direkt in PBS oder FACS-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Antikörperfärbung auf Eis gelagert.

3.2.2.4 Einzelzell-Suspension aus dem Blut

Zur Vermeidung der Agglutination des Blutes wurde es mit Hilfe von heparinisierten Kapillaren entnommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit PBS überführt. Das Blut wurde zentrifugiert (5min., 3000rpm, 4°C), der Überstand abgesaugt und mit ACK-Lyse 10min. bei RT inkubiert und dann erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS oder FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

3.2.2.5 Bestimmung von Zellzahlen

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dafür wurde zuerst eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau angefertigt und 10µl davon in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Es wurden alle vier großen Quadrate mit jeweils 16 kleineren Quadraten ausgezählt, wobei nur die nicht-gefärbten lebenden Zellen ausgezählt wurden. Aus der Summe der Zellen lässt sich die absolute Zellzahl folgendermaßen berechnen:

$$\text{Absolute Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.2.3 Konservierung und Immunhistochemie von Organen

3.2.3.1 PFA Fixierung von Organen

Die zu fixierenden Organe wurden entnommen, wobei die Leber vor der Entnahme kurz mit PBS perfundiert wurde. Das untere Stück des größten Leberlappens wurde mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt und wie die weiteren Organe zur Konservierung in mindestens der 5-fachen Menge 4% PFA-Lösung für 72-96h bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Organe in eine 0,4% PFA-Lösung überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert.

3.2.3.2 Kryokonservierung von Lebergewebe

Für die Isolierung von RNA oder DNA aus Lebergewebe wurde ein sehr kleines Leberstück des größten Leberlappens in ein 1,5ml Schnappdeckelgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Für immunhistochemische Analysen aus kryokonserviertem Lebergewebe, wurden kleine Stücke des Lebergewebes in dafür vorgesehene Tissue-Tek® Cryomold® Plastikschaalen in ausreichend Tissue-Tek® OCT eingebettet und bei -80°C gelagert.

3.2.3.3 Immunhistochemische Färbungen von Organen

Die Aufbereitung des konservierten Lebergewebes und die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt. Die Aufbereitung des Lebergewebes wurde wie beschrieben durchgeführt (Haybaeck et al. 2009; Huang et al. 2013).

2µm dicke Schnitte von FFPE (*fixed in 4% paraformaldehyd and paraffin-embedded*) Leberproben wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) oder verschiedenen Antikörpern gefärbt. Für die Färbung mit Ox40L wurden 5µm dicke Schnitte kryokonservierten Lebergewebes genommen. Für alle Färbungen wurden sowohl der "Bond-MAX Immunhistochemistry Robot" (Leica) als auch das "Bond Polymer Refine Detection Kit" (Leica) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden folgende Antikörper benutzt:

Primärer Antikörper	Klon	Hersteller
F4/80	T-2006	BMA Biomedicals (Schweitz)
HBsAg	70-HG15	Fitzgerald (USA)
HBcAg	RP 017/-05	Diagnostic BioSystems (USA)
cleaved Caspase-3	9661	Cell Signaling/ Merck (Darmstadt)
Ki67	RM-9106-S0	NeoMarkers/ Thermo Scientific Inc. (USA)
CD3	RBK024	Zytomed systems (Berlin)
CD45	550539	BD (Heidelberg)
MHC-II	NBP1-43312	Novus Biologicals/ R&D Systems (USA)
Ly6G	551459	BD (Heidelberg)
iNOS	ab15323	Abcam (UK)
Ox40L	MBS520053	MyBioSource (USA)
CD45R/B220	553084	BD (Heidelberg)

Primäre Antikörper wurden mit dem "Bond Polymer Refine Detection Kit "(Spezifität: Hase; Leica) detektiert oder mittels Spezies-spezifischen sekundären Antikörpern: Hase anti-Ziege IgG (Dako, P0449), Hase anti-Maus (Abcam, 125904), Hase anti-Ratte IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 112-035-003) und Hase anti-armenischem Hamster (Novus Biologicals, 120-6699).

3.2.3.4 Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen

Die Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen von Organen wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Die Quantifizierung der Zellzahl bzw. positiver Zellen von gefärbten histologischen Organschnitten wurde mit Hilfe eines "SCN400 Slide Scanner" (Leica) durchgeführt. Für die Analyse wurde die "Tissue IA" Analysesoftware (Slidepath, Leica) benutzt, mit einer optimierten Einstellung zur Farberkennung und einem spezifischen Quantifizierungsalgorithmus für jede Färbung in einer 20-fachen Vergrößerung. Zur Quantifizierung des Gewebes wurden 2-3 zufällig ausgewählte Flächen mit einer Größe von 8-15mm² pro histologischer Probe zur statistischen Analyse ausgewertet.

3.2.4 *ex vivo* Zellkultur

Zur weiteren Stimulation primärer Zellen wurden diese *ex vivo* unter der Sterilwerkbank weiter behandelt und kultiviert.

3.2.4.1 *in vivo* Zytotoxizitätstest

Zur Analyse der Proliferation von Zellen wurden primäre Milzzellen frisch isoliert und anschließend sofort mit CFSE oder FarRed gefärbt. Dafür wurden vier 50ml Reaktionsgefäße mit jeweils 5,0µM CFSE (CFSE^{high}), 0,5µM CFSE (CFSE^{low}), 1,0µM FarRed (FarRed^{high}) und 0,1µM FarRed (FarRed^{low}) in 10ml PBS angesetzt. Weitere vier 50ml Reaktionsgefäße wurden mit 10ml T-Zell Medium (TCM) und Peptid oder nicht (Kontrolle) angesetzt. Die Milzzellen wurden in 4 Reaktionsgefäße aufgeteilt und pelletiert. Das Pellet wurde dann in dem angesetzten T-Zell Medium mit oder ohne Peptid resuspendiert und für 15min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde den Zellen der Fluoreszenzfarbstoff in 10ml PBS (auch 37°C) zugegeben und erneut für 15min. bei 37°C inkubiert. Die Kombination der Farbstoffe und Peptidstimulation war folgendermaßen:

TCM + HBcore Peptid (20µM)	CFSE ^{high}
TCM -	CFSE ^{low}
TCM + HBsurface Peptid (20µM)	FarRed ^{high}
TCM -	FarRed ^{low}

Daraus ergibt sich eine Endkonzentration von 2,5/0,25µM CFSE und 0,5/0,05µM FarRed. Zum Abstoppen der Reaktion wurde den Zellen 5ml FCS zugegeben und mit PBS aufgefüllt und gewaschen (10min., 1500rpm, 4°C). Alle vier Ansätze wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und noch zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und 2×10^7 Zellen pro Maus in einem Volumen von 200µl intravenös gespritzt. Zur Kontrolle der Färbung und Analyse der Zahlenverhältnisse der einzelnen Zellgruppen wurden die Zellen zusätzlich durchflusszytometrisch untersucht.

Die Zytotoxizität wurde nach 19h gemessen. Dafür wurden erneut die Milzen aus den behandelten Mäusen isoliert, eine Einzelzell-Suspension hergestellt und durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil der spezifischen Zytotoxizität lässt sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$\text{Spezifische Zytotoxizität (\%)} = 100 - 100 \times \frac{(CFSE^{high} \div CFSE^{low})^{Probe}}{(CFSE^{high} \div CFSE^{low})^{Kontrolle}}$$

3.2.4.2 *in vitro* Peptidstimulation von T Zellen

Zur intrazellulären Bestimmung von IFN γ nach HBV-Peptidstimulation wurden LAL wie unter 3.2.2.1 beschrieben isoliert und drei Sätze (HBc/HBs/ohne Peptid) von jeweils 5×10^5 Zellen pro 96-well in 100 μ l T-Zell Medium ausplattiert. Die Proben wurden entweder mit 10 μ M HBc₉₃₋₁₀₀ Peptid, 10 μ M HBs₁₉₀₋₉₇ Peptid oder ohne Peptid inkubiert. Dafür wurde das HBV-Peptid in T-Zell Medium in doppelter Konzentration (20 μ M) verdünnt und 100 μ l zu den LAL gegeben. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde 0,1% Monensin und Brefeldin A zugegeben und für weitere 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2min., 1600rpm, 4°C), extrazellulär mit PerCP-Cy5.5-CD8 α , A405-Lebend/Tot-Farbstoff und Fc-Block gefärbt und 20min. bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 100 μ l 4% PFA fixiert und erneut zweimal gewaschen. Die Zellen konnten bei Bedarf so über Nacht bei 4°C gelagert werden. Die intrazelluläre Färbung von APC-IFN γ wurde mit dem Kit "BD Perm/Wash™" nach Angaben des Herstellers durchgeführt und anschließend mittels FACS analysiert.

3.2.4.3 Degranulations Assay

Zur Analyse der Degranulation von T Zellen wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben LAL isoliert. Es wurden vier Sätze (CD107 α /Isotyp; HBc/HBs) von 5×10^5 LAL pro 96-well ausplattiert. Zwei davon wurden mit 10 μ M HBc₉₃₋₁₀₀ stimuliert und entweder mit PE-CD107 α oder der Isotyp Kontrolle PE-rat IgG2A inkubiert. Gleiches galt auch für die Behandlung mit dem HBs₁₉₀₋₉₇ Peptid. Die Zellen wurden für 1h bei 37°C stimuliert und nach Zugabe von 0,1% Monensin für weitere 4h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 5% FCS/PBS gewaschen (2min., 1600rpm, 4°C) und in 25 μ l 5% FCS/PBS aufgenommen und mit 5 μ l APC-Dextramer 10min. bei RT gefärbt. 20 μ l Antikörpersuspension für PerCpCy5.5-CD8 α und A405-Lebend/Tot-Farbstoff wurde für weitere 20min. bei 4°C zugegeben, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, mit 4% PFA fixiert und eine FACS-basierte Analyse genommen.

3.2.5 *in vitro* Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden steril unter einer Sterilwerkbank mit laminarer Strömung behandelt und passagiert. Zur Kultivierung der Zellen wurden diese je nach Wachstumseigenschaften im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 geteilt. Dafür wurden adhärente Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst und in neue sterile Zellkultur-Flaschen oder -Platten ausplattiert. Die Inkubatoren hatten eine stabile Temperatur von 37°C und eine CO₂ Konzentration von 5%.

3.2.5.1 HBV Virusstock

Zur Virusanzucht wurden 40x 150mm Zellkulturschalen mit HEK293 Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-90% ($1,2 \times 10^7$ Zellen/Platte) in normalen DMEM-Medium im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden mit MOI 5 des AdHBV1.3 in 5ml des Infektionsmediums (2% FCS) infiziert. Alle 20min. wurden die Platten im Inkubator leicht geschüttelt, um ein Austrocknen der Zellen durch das geringe Flüssigkeitsvolumen zu vermeiden. Nach 90-minütiger Inkubation wurden 15ml normales DMEM-Medium vorsichtig zugefügt und weitere 24-48h inkubiert, bis fast alle Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten. Die Zellen wurden mit einer Pipette geerntet und in 50ml Reaktionsgefäße gesammelt und zentrifugiert (10 min., 1500rpm, 4°C). Das Pellet aller Reaktionsgefäße wurde in insgesamt 20ml Viruspuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension viermal im 37°C Wasserbad aufgetaut und bei -80°C wieder eingefroren um die Zellen vollständig zu lysieren. Die Suspension wurde in zwei 50ml Reaktionsgefäße zentrifugiert (10min., 4000rpm, 4°C) um die Zelltrümmer zu beseitigen. Der Überstand wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Für den ersten Gradienten wurden 2,5ml CsCl-1,25 in ein Ultra-Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 2,5ml CsCl-1,4 unterschichtet und mit 6ml der Virussuspension überschichtet. Die Ultra-Zentrifugenröhrchen wurden in die dafür vorgesehenen Metallbehälter des Rotors (SW41) der Ultrazentrifuge übertragen und mit einer Feinwaage und Viruspuffer auf das gleiche Gewicht gebracht. Der Gradient wurde bei 10°C und 35.000rpm für 60min. mit niedriger Brems- und Beschleunigungsgeschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer blauen Kanüle vorsichtig von außen durch das Röhrchen gestochen und die untere bläulich-weiß schimmernde Interphase abgenommen. Für den zweiten Gradienten wurden 8ml CsCl-1,34 in ein neues Ultra-Zentrifugenröhrchen gegeben, mit dem Viruslysat

des ersten Gradienten überschichtet und (falls nötig) mit PBS komplett aufgefüllt. Wie zuvor wurden die Metallbehälter des Rotors mit Hilfe der Feinwaage genau austariert. Der Gradient wurde bei 10°C und 30.000rpm für 18h mit niedriger Brems- und Beschleunigungsgeschwindigkeit zentrifugiert. Die untere der beiden Interphasen wurde wie zuvor mit einer blauen Kanüle von außen geerntet. Zur Entfernung des CsCl wurde der Virusstock einer Dialyse unterzogen. Dafür wurde die zweite Interphase in eine "Slide-A-Lyzer" Dialysekassette überführt, welche zuvor mit Dialyse-Puffer befeuchtet wurde. Die Dialysekassette wurde 4Std. in 1l Dialysepuffer bei 4°C rührend inkubiert. Jede Stunde wurde der Dialysepuffer erneuert. Danach wurde der Virusstock mit einer sterilen Spritze entfernt und in 0,5ml Schnappschlussgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.5.2 Bestimmung des Virustiter

Zur Bestimmung des Virustiters wurden HEK293 Zellen in einer 12-well Platte mit 1ml DMEM-Medium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% im Inkubator kultiviert. In die oberen vier Wells wurde vom AdHBV1.3 Virusstock jeweils 30µl, 10µl, 3µl und 1µl zugegeben, vorsichtig geschwenkt und dann erneut 10µl jeweils in das darunter befindliche Well pipettiert. Nach 48h wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Die niedrigste Konzentration bei der sich alle Zellen von der Platte abgelöst hatten, wurde für die Berechnung der Konzentration eingesetzt und ist folgendermaßen:

<u>Viruszugabe</u>	<u>Viruskonzentration (iu/ml)</u>
30µl	$1,7 \times 10^8$
10µl	5×10^8
3µl	$1,7 \times 10^9$
1µl	5×10^9
0,3µl	$1,7 \times 10^{10}$
0,1µl	5×10^{10}
0,03µl	$1,7 \times 10^{11}$
0,01µl	5×10^{11}

3.2.5.3 LCMV (strain WE) Virusstock

LCMV-WE wurde durch Dr. Zeinab Abdullah zur Verfügung gestellt und nach publizierter Methode hergestellt (Abdullah et al. 2007).

3.2.5.4 Kryokonservierung von Zelllinien

Zur Kryokonservierung immortalisierter Zelllinien wurden diese mit Hilfe von Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in einem 50ml Reaktionsgefäß gesammelt und zentrifugiert (10min., 1500rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 1ml FCS/10% DMSO resuspendiert, in 1,5ml Kryoröhrchen gefüllt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellaliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.6 Bakterienkultur

3.2.6.1 Listerienkultur zur Infektion

Zur Herstellung OVA-exprimierender *Listeria monocytogenes* (*Lm*-OVA), wurde eine Übernachtskultur von 1 µl des *Lm*-OVA-Stocks (Lagerung bei -80°C) in 10ml BHI-Medium bei 37°C angesetzt. Am nächsten Tag wurde zur Generierung einer Log-Kultur erneut 10ml frisches BHI-Medium mit 500µl der Übernachtskultur beimpft. Jede Stunde wurde die optische Dichte (OD_{600}) gemessen, bis die Kultur im logarithmischen Bereich von $OD_{600} = 0,1$ bis 0,3 lag. Die Kultur wurde anschließend bei RT und 4000rpm für 5min. zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut die optische Dichte gemessen.

Zur Bestimmung der Bakterienmenge (*colony forming units*, cfu) wurde die OD_{600} gemessen, wobei $OD_{600} = 0,5$ eine Bakterienkonzentration von 7×10^8 cfu/ml entsprechen.

Folgende allgemeine Formel ist anzuwenden:

$$\text{Bakterienkonzentration (cfu)} = 1,24 \times 10^9 \times OD_{600}^{\text{Probe}}$$

Die gewünschte Bakterienmenge (2×10^4 cfu) wurde verdünnt und in einem Volumen von 100µl in die Maus gespritzt.

3.2.6.2 Plasmid-DNA Isolation aus Bakterien

Zur Isolation von Endotoxin-freier Plasmid-DNA zur hydrodynamischen Injektion von pENTRY-HBV1.3 wurde eine Mega-Präparation mit "Nucleobond® PC 2000 EF" nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Isolation von Endotoxin-freier Plasmid-DNA zur Elektroporation von pCI-HBc und pCI-HBs wurde eine Giga-Präparation mit "Nucleobond® PC 10000 EF" nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.7 FACS-basierte Durchflusszytometrie

3.2.7.1 Oberflächenfärbung

Zur Färbung extrazellulärer Moleküle wurden 5×10^5 bis 5×10^6 Zellen in einer 96-well U-Form Platte ausplattiert und mit 50µl FACS-Puffer und den entsprechend verdünnten Antikörpern vermischt. Zusätzlich wurde 1µl Fc-Block/well dazu gegeben, um unspezifische Bindungen zu inhibieren und ein Lebend/Tot-Farbstoff ("LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit") zur Erkennung toter Zellen während der Analyse. Die Zellen wurden 20min. bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (2min., 1600rpm, 4°C). Wenn die zu untersuchenden Zellen unter S2-Standard geerntet wurden, mussten diese Zellen zusätzlich für 10min. in einer PFA-Lösung (4% in PBS) fixiert werden, bevor diese im FACS analysiert werden konnten.

3.2.7.2 Intrazelluläre Färbung

Zur intrazellulären Färbung von IFN γ und Foxp3 wurden zuerst die Oberflächenmoleküle gefärbt, wie unter 3.2.7.1 beschrieben. Vor der weiteren intrazellulären Färbung wurden alle Zellen zunächst für 10min. in 100µl PFA-Lösung (4%) fixiert. Zur weiteren Fixierung wurde das "Fixation/Permeabilization Kit" oder das "Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set" nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Kontrolle der Färbung des intrazellulären Proteins wurde zusätzlich eine Färbung mit dem entsprechenden Isotyp-Antikörper durchgeführt.

3.2.7.3 Dextramer Färbung

Zur extrazellulären Färbung mit Hilfe von Dextrameren wurden primäre LAL in 25µl PBS/5% FCS in einer 96-well Platte ausgesät und mit 5µl Dextramer bei RT für 10min. im Dunkeln vorinkubiert. Anschließend wurden weitere Antikörper zur extrazellulären Färbung in FACS-Puffer zugegeben und bei 4°C für weitere 20min. inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen wie unter 3.2.7.1 gewaschen, fixiert und wie folgt analysiert:

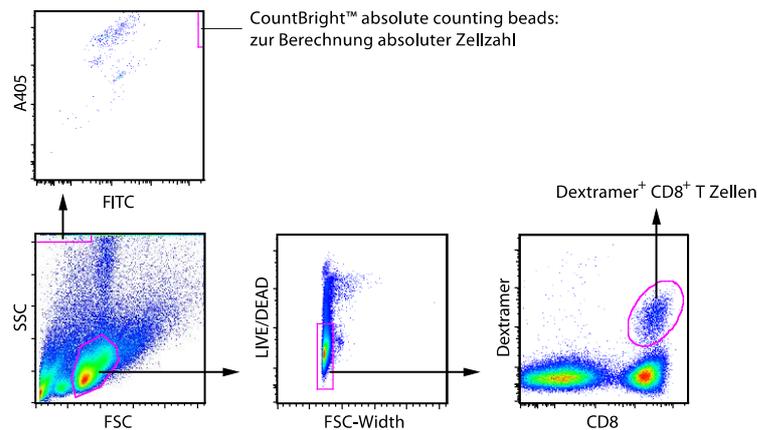


Abbildung 3-1 Gating-Strategie zur Analyse Dextramer⁺ CD8⁺ Zellen aus der Leber.

Einzelzellsuspensionen wurden mittels Oberflächen- oder intrazellulärer Färbung gefärbt und mittels FACS-basierter Analyse (Canto-II) analysiert. FSC und SSC wurden so eingestellt, dass die Lympozytenpopulation isoliert werden konnte. FSC-Width dient dem Ausschluss von Dubletten und die LIVE/DEAD-Färbung zum Ausschluss toter Zellen. Alle lebenden einzelnen Zellen wurden dann weiter auf CD8- und Dextramer-Expression analysiert. CountBright™ absolute counting beads wurden wie dargestellt gegatet und zur Berechnung der absoluten Zellzahl benutzt.

3.2.7.4 Bestimmung absoluter Zellzahl im Durchflusszytometer

Zur Bestimmung einer absoluten Zellzahl wurde jeder FACS-Probe 5µl der "CountBright™ absolute counting beads" zugegeben, welche eine klar definierte Menge an Fluorochrom-gebundenen Partikeln enthalten (z.B.: 5µl= 4900 Partikel). Zur Berechnung der absoluten Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Absolute Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{gezählte Partikel}} \times 4900$$

3.2.8 Statistik

Alle Experimente wurden wie angegeben, jedoch aber mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Bei Mausversuchen bestanden die Gruppen aus mindestens n=3 Tiere bzw. wie angegeben. Die Fehlerabweichung der statistischen Auswertung wird entweder als Standardabweichung (SD) oder als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student's *t*-Test verwendet (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines *in vivo* Mausmodells der Hepatitis B Virus-Infektion

Zur detaillierten Analyse einer Hepatitis B Infektion ist es von zentraler Bedeutung, ein Tiermodell zu etablieren, welches sich einfach und kosteneffektiv halten lässt, dessen Genom komplett entschlüsselt ist und somit durch Genmanipulation leicht verändern lässt und vor allem den Bezug zum Menschen ermöglicht. Im Mausmodell gibt es seit einiger Zeit HBV-transgene Mäuse, welche eine chronische HBV-Infektion tragen (Guidotti et al. 1995). Diese waren in den anfänglichen Untersuchungen bezüglich der perinatalen, chronischen HBV Infektion von Nutzen, jedoch erlaubt dieses Tiermodell keine näheren Untersuchungen zu Immunantworten einer ersten Infektion im adulten Stadium. Diesbezüglich musste eine neue Methode etabliert werden, um wildtypische Mäuse mit dem Hepatitis B Virus (HBV) zu infizieren und somit die Speziesbarriere zu überwinden.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von zwei verschiedenen HBV-Mausmodellen einerseits der Verlauf einer im adulten Stadium infizierten und persistent manifestierten und andererseits eine akute HBV-Infektion im Patienten simuliert werden. Ziel der Arbeit soll die eingehende Analyse diverser zellulärer Mechanismen der HBV-spezifischen Toleranzinduktion sein und somit potenzielle Eingriffsmöglichkeiten zur Induktion einer HBV-spezifischen Immunität bieten.

4.1.1 AdHBV-Infektion führt zur Toleranzinduktion HBV-spezifischer Antigene

In den folgenden Experimenten dieser Arbeit wurden zwei Methoden benutzt um eine HBV-Infektion in Mäusen zu induzieren:

(i) Die hydrodynamische Injektion (HDI) etabliert eine akute, selbst-regulierende HBV-Infektion in C57BL/6 Mäusen, wobei das in einen DNA-Vektor inserierte HBV-Genom (HBV-HDI) in einem großen Flüssigkeitsvolumen und mit einer hohen Geschwindigkeit in die Schwanzvene der Maus appliziert wird (Yang et al. 2002). Auf Venen-nahe Zellen wirkt dadurch ein sehr starker hydrostatischer Druck, wodurch sich die Oberflächenstruktur z.B. der Hepatozyten verändert und folglich HBV-DNA durch die Zellmembran passieren kann. Dadurch wird eine *in vivo* Transduktion der Hepatozyten erreicht. Das inserierte HBV-Genom kann mit Hilfe muriner Leber-spezifischer Enzyme replizieren, so dass die Hepatozyten

infektiöse Partikel wie auch HBV-spezifische Antigene produzieren und in die Peripherie freilassen können.

(ii) Eine persistente HBV-Infektion wird mit Hilfe eines Adenoviralen Vektors (Ad) induziert, der natürlicherweise in der Lage ist murine Hepatozyten zu infizieren und das HBV-Genom (AdHBV) enthält (Huang et al. 2012).

Der Verlauf einer AdHBV-Infektion ist zudem von der applizierten Virusdosis abhängig (Huang et al. 2012; Stross et al. 2012) und kann sich entweder als akute, selbst-regulierende oder persistente HBV-Infektion manifestieren. In den hier zugrunde liegenden Experimenten wurde eine AdHBV Virusdosis von 1×10^8 *infectious units* (iu; Maßeinheit von Viren) appliziert. Zur weiteren Analyse HBV-spezifischer Immunantworten wurde neben der AdHBV-Infektion im Folgenden auch eine HBV-HDI induzierte Infektion untersucht.

Zunächst sollte der Infektionsverlauf von HBV-HDI oder AdHBV-infizierten wildtypischen C57BL/6 Mäusen sowohl serologisch als auch immunhistochemisch analysiert werden, wofür Mäuse über einen Zeitraum von 98 Tagen nach HBV-Infektion zeitkinetisch untersucht wurden. Hinsichtlich des serologischen Verlaufs viraler Parameter, konnten nach AdHBV-Infektion sowohl HBsAg- als auch HBeAg-Werte konstant im Serum aller Mäuse nachgewiesen werden (**Abb. 4-1a,b**). Wurden Mäuse mittels HBV-HDI infiziert, so konnte im Gegensatz zu AdHBV-Infizierten eine Reduktion der HBsAg-Werte nach etwa 14 Tagen und der HBeAg-Werte nach 21 Tagen bis unter die Nachweisgrenze detektiert werden (**Abb. 4-1a,b**). Einhergehend mit der Reduktion der HBsAg-Werte konnten anti-HBs Antikörper nur im Serum HBV-HDI infizierter Mäuse nachgewiesen werden (**Abb. 4-1c**), welche in der Lage sind HBsAg zu neutralisieren (**Abb. 4-1a**). Anhand der niedrigen ALT-Aktivität in der Leber, konnte ein durch die AdHBV-Infektion induzierter Leberschaden ausgeschlossen werden (**Abb. 4-1d**). Zudem wurde ein früher transienter Anstieg der ALT-Aktivität auf ca. 300 IU/L an Tag 4 in HBV-HDI infizierten Mäusen verzeichnet, welcher sich bis Tag 7 jedoch wieder auf Werte von <40 IU/L normalisierte.

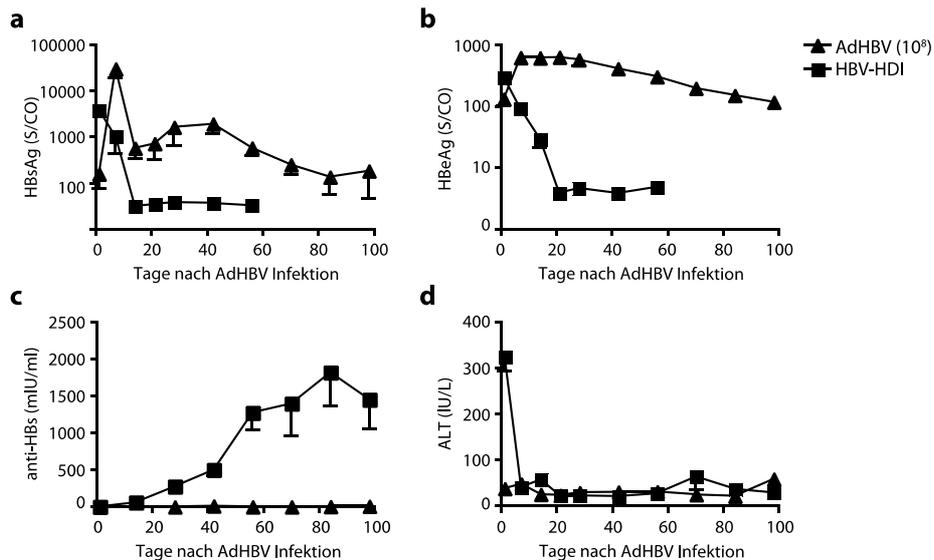


Abbildung 4-1 AdHBV-Infektion führt zur Toleranz von HBV-Antigenen ohne virale Hepatitis.

Zeitkinetische Analyse der Serumparameter von HBV-HDI oder AdHBV-infizierten C57BL/6 Mäusen.

(a) Hepatitis B s Antigen (HBsAg), (b) Hepatitis B e Antigen (HBeAg), (c) anti-HBs Antikörper und (d) Alanin-Aminotransferase (ALT). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe.

Des Weiteren sollte der virale Verlauf im Lebergewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach HBV-Infektion näher untersucht werden. Dafür wurde die Integrität des Lebergewebes mittels Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung und die Verteilung HBV-infizierter Hepatozyten mittels HBcAg-spezifischer Antikörperfärbung immunhistochemisch untersucht (**Abb. 4-2**). Die H&E-Färbung zeigt, dass weder eine HBV-HDI noch AdHBV-Infektion einen signifikanten Leberschaden und dadurch bedingte abweichende Integrität der Hepatozyten induziert. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass im Lebergewebe HBV-HDI infizierter Mäuse HBcAg⁺ Hepatozyten bis Tag 21 nach Infektion komplett eliminiert werden. Im Gegensatz dazu sind an Tag 98 nach AdHBV-Infektion immer noch HBcAg⁺ Hepatozyten nachweisbar.

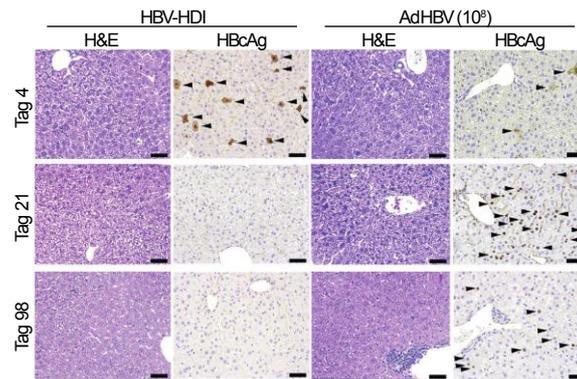


Abbildung 4-2 AdHBV-Infektion führt zu einer persistenten Etablierung HBV-infizierter Hepatozyten. Immunohistochemische Analyse von Lebergewebe an Tag 4, 21 und 98 von HBV-HDI oder AdHBV-infizierten C57BL/6 Mäusen. Es werden H&E- und HBcAg-Färbungen dargestellt. Die Pfeile zeigen HBcAg⁺ Hepatozyten. Die Maßbalken entsprechen 50µm. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunohistochemischen Analyse wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Zur Analyse der adaptiven Immunantwort nach HBV-Infektion wurden Leber-assoziierte Lymphozyten (LAL) an Tag 14 oder Tag 21 nach Infektion isoliert und auf HBV-spezifische CD8⁺ zytotoxische T Lymphozyten (CTL) mittels FACS-basierter Analyse untersucht. Wie in **Abb. 4-3a** zu erkennen ist, kommt es nur nach akuter HBV-HDI Infektion der Mäuse zu einer Proliferation sowohl HBS- als auch HBc-spezifischer CTL, wobei eine AdHBV-Infektion keine HBV-spezifische CTL-Antwort induzieren kann. Im zeitkinetischen Verlauf zeigte sich weiterhin, dass die CTL-Antwort auch an Tag 21 nach HBV-HDI Infektion noch nachweisbar ist (**Abb. 4-3b**). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine HBV-HDI Infektion in C57BL/6 Mäusen zu einer anhaltenden und robusten HBV-spezifischen CTL-Antwort führt, welche in der Lage ist HBV-infizierte Hepatozyten zu eliminieren ohne jedoch einen anhaltenden Leberschaden zu induzieren.

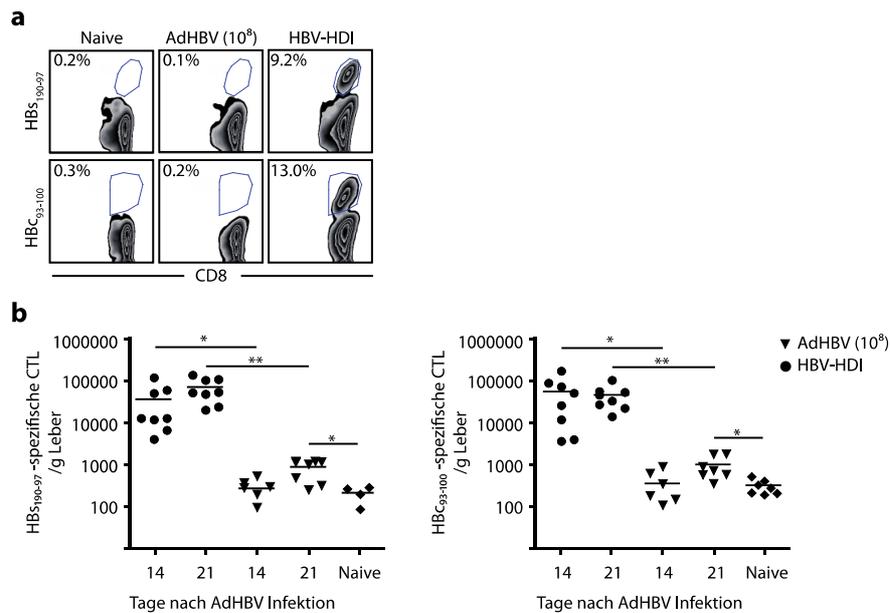


Abbildung 4-3 AdHBV-Infektion verhindert die Expansion HBV-spezifischer CTL.

Aus HBV-HDI oder AdHBV-infizierten C57BL/6 Mäusen wurden an Tag 14 oder 21 LAL isoliert und auf HBV-spezifische CTL untersucht. **(a)** FACS-basierte Analyse HBV-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe HBs₁₉₀₋₉₇- oder Hbc₉₃₋₁₀₀-spezifischer Dextramere an Tag 14 nach Infektion mit AdHBV, HBV-HDI oder ohne Infektion (Naive). **(b)** Quantitative Bestimmung der HBV-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe an Tag 14 oder 21 nach Infektion. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=7-8 Tieren pro Gruppe. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 (Student's *t*-Test).

Nach einer MHC-vermittelten Erkennung von spezifischen Peptiden, besitzen CD8⁺ zytotoxische T Zellen zwei verschiedene Effektorfunktionen: (i) zum einen produzieren CTL lösliche Faktoren, wie Zytokine und Chemokine und (ii) zum anderen besitzen sie die Kapazität Zielzellen spezifisch zu eliminieren. CTL töten ihre Zielzellen auf hauptsächlich zwei unterschiedliche Weisen: Granulations-anhängige Eliminierung mittels der Produktion von Perforin/Granzym oder durch eine Liganden-abhängige Erkennung von z.B. Fas-FasL (Trapani and Smyth 2002). Findet eine CTL ihre Zielzelle mit geeignetem Antigen, so wird der T Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert und es entsteht eine immunologische Synapse zwischen den Zellen. Daraufhin wandern lytische Lysosomen an die Membran der CTL, so dass lösliche Mediatoren, wie z.B. Perforin/Granzym, in die Zielzelle ausgeschüttet werden können, welches zur Eliminierung dieser führt. Dieser Vorgang führt zu einer Degranulation der CTL und kann durch den Nachweis von membranständigem CD107 α (LAMP-1) auf der Oberfläche dieser Zellen nachgewiesen werden (Betts et al. 2003). Dafür wurden LAL an Tag 14 nach HBV-Infektion isoliert und für 5h *ex vivo* mit Hbc- oder HBs-spezifischem Peptid inkubiert und anschließend für eine FACS-basierte Analyse entsprechend gefärbt. Wie in **Abb. 4-4a** dargestellt, exprimieren Hbc-spezifische CTL nach HBV-HDI Infektion den

Oberflächenmarker CD107 α , welcher zeigt dass nicht nur die Proliferation HBV-spezifischer CTL nach akuter HBV-HDI Infektion induziert wird (**Abb. 4-3a,b**), sondern diese auch funktional aktiv sind und in der Lage ihre Zielzellen, die HBV-infizierte Hepatozyten, zu eliminieren. Zur weiteren Analyse wurden erneut LAL *ex vivo* mit HBV-spezifischen Peptiden inkubiert, um die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie IFN γ , nachzuweisen. Als CTL-spezifische Immunantwort auf intrazelluläre Pathogene wird vermehrt IFN γ produziert, welches in akut infizierten HBV-HDI Mäusen auch bestätigt werden konnte (**Abb. 4-4b**). Zur weiteren Analyse der Effektorfunktionen, wurde die CTL-vermittelte Zytotoxizität *in vivo* gemessen. Dafür wurden Zielzellen, welche vorher mit HBe- oder HBs-spezifischem Peptid *in vitro* vorinkubiert und mit CFSE oder FarRed farblich markiert wurden, adoptiv in HBV-infizierte Mäuse transferiert. Durch die farbliche Markierung der Zielzellen vor dem Transfer wird bei der anschließenden Analyse der spezifischen Zytotoxizität die Unterscheidung Peptid-stimulierter (CFSE^{high} oder FarRed^{high}) und unstimulierter (CFSE^{low} oder FarRed^{low}) Zielzellen ermöglicht. An Tag 19 nach HBV-Infektion und weiteren 19h des adoptiven Transfers, wurden LAL isoliert und mit Hilfe der CFSE- und FarRed-Markierung auf das quantitative Vorhandensein der adoptiv transferierten Zielzellen untersucht. In HBV-HDI infizierten Mäusen konnte eine spezifische Zytotoxizität gegen sowohl HBe- als auch HBs-spezifische Zielzellen von etwa 60-70% gemessen werden (**Abb. 4-4c**). In AdHBV-infizierten Mäusen konnte keine gerichtete Eliminierung der transferierten HBV-spezifischen Zielzellen induziert werden, welches mit der zuvor untersuchten fehlenden HBV-spezifischen Immunantwort einhergeht.

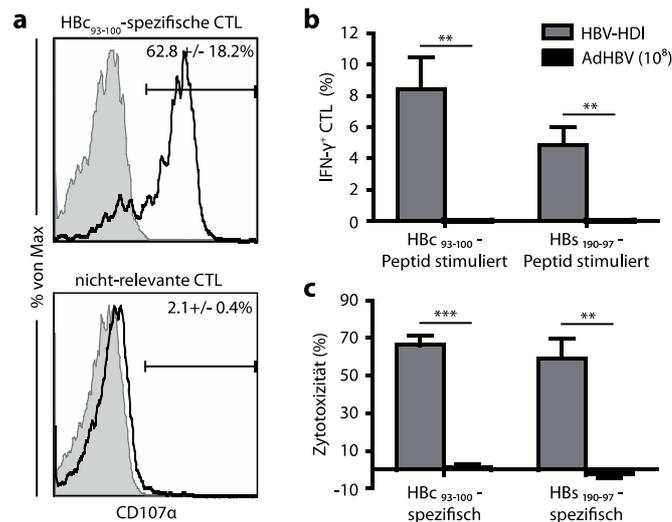


Abbildung 4-4 AdHBV-Infektion supprimiert HBV-spezifische CTL-Effektorfunktionen.

LAL wurden *ex vivo* für 5h mit HBV-Peptid stimuliert. **(a)** CD107α (LAMP-1) Oberflächenexpression auf HBC₉₃₋₁₀₀-Dextramer⁺ CTL wurde an Tag 14 nach HBV-HDI Infektion mittels FACS-basierter Analyse bestimmt. Die grau hinterlegten Areale repräsentieren die Isotyp-Kontrolle. **(b)** Prozentualer Anteil IFNγ-exprimierender HBV-spezifischer CTL von der gesamten CD8⁺ T Zell Population an Tag 21 nach HBV-HDI oder AdHBV- Infektion. **(c)** HBV-spezifische *in vivo* Zytotoxizität an Tag 19 nach HBV-HDI oder AdHBV-Infektion. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=3-4 Tieren pro Gruppe. ***P*< 0.01; ****P*< 0.001 (Student's *t*-Test).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass eine AdHBV-Infektion in wildtypischen C57BL/6 Mäusen zu einer fehlenden HBV-spezifischen Immunität und somit zur Entstehung einer Toleranz gegenüber HBV führt. Es konnte folglich durch die Applikation von 10⁸ iu AdHBV die Etablierung einer persistenten HBV-Infektion in der Maus beschrieben werden.

4.2 Eine akute HBV-HDI Infektion wird durch Kreuzpräsentation Batf3⁺ Dendritischer Zellen vermittelt

Wie in Abschnitt 4.1 gezeigt, führt eine *in vivo* Transfektion von HBV-DNA zu einer Manifestierung einer selbst-regulierenden und somit akut verlaufenden HBV-Infektion in C57BL/6 Mäusen. Zur Bekämpfung viraler Pathogene bedient sich das Immunsystem unter anderem am Mechanismus der Kreuzpräsentation, bei der exogene virale Antigene von professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, über MHC-I-Moleküle präsentiert werden und somit eine CD8⁺ T Zell-Antwort induzieren. Zur näheren Betrachtung beteiligter Immunzellen an der Induktion einer HBV-spezifischen CTL-Antwort wurde zunächst eine Population von APC, genauer den CD11c⁺ dendritischen Zellen (DC), im Kontext einer akut verlaufenden HBV-HDI Infektion untersucht.

Zur Überprüfung ob DC eine Rolle in der Etablierung einer adaptiven Immunantwort im Kontext einer akuten HBV-HDI Infektion spielen, wurde eine transgene CD11c-DOG Mauslinie benutzt, bei der sich CD11c⁺ DC durch die intraperitoneale Applikation von Diphtherie-Toxin (DTX) spezifisch depletieren lassen. In CD11c-defizienten Mäusen führte eine akute HBV-HDI Infektion zu einer signifikanten Reduktion sowohl HBs- als auch HBc-spezifischer CTL gegenüber der HBV-HDI infizierten C57BL/6 Kontrollgruppe (**Abb. 4-5a,b**). Dies zeigt, dass CD11c⁺ DC für die Induktion einer HBV-spezifischen CTL-Antwort im akuten HBV-HDI Infektionsmodell beteiligt sind.

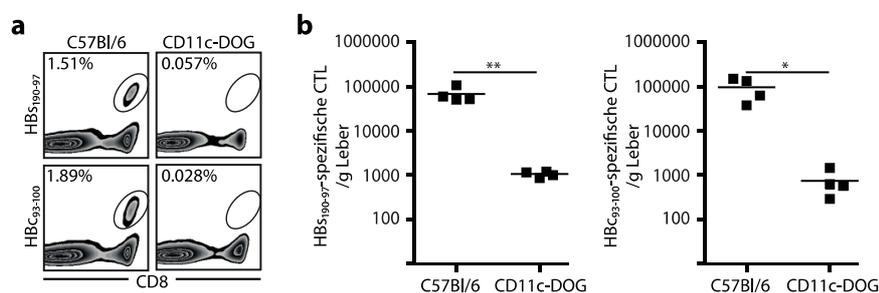


Abbildung 4-5 CD11c⁺ DC vermitteln eine HBV-spezifische CTL-Antwort während akuter HBV-HDI Infektion. C57BL/6 oder CD11c-DOG Mäuse wurden mittels HBV-HDI infiziert und LAL an Tag 14 nach Infektion isoliert. CD11c-DOG Mäuse wurden zusätzlich mittels DTX-Applikation CD11c-depletiert. **(a)** FACS-basierte Analyse HBV-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe HBs₁₉₀₋₉₇- oder HBc₉₃₋₁₀₀-spezifischer Dextramere. **(b)** Quantitative Bestimmung der HBV-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=4 Tieren pro Gruppe. **P*< 0.05; ***P*< 0.01 (Student's *t*-Test).

Zur Überprüfung der Rolle der Kreuzpräsentation von DC, wurde der Transkriptionsfaktor Batf3 als ein spezifischer Marker kreuzpräsentierender DC experimentell herangezogen (Hildner et al. 2008). Dies wurde mit Hilfe transgener Batf3-defizienter (Batf3^{-/-}) Mäuse durchgeführt, welche mittels HBV-HDI infiziert und über einen Zeitraum von 14 Tagen analysiert wurden. Wie in **Abb. 4-6a,b** gezeigt wird, können Batf3^{-/-} Mäuse, genau wie CD11c-depletierte Mäuse, weder eine HBs- noch HBc-spezifische CTL-Antwort nach akuter HBV-HDI Infektion induzieren. Damit einhergehend sind Batf3^{-/-} Mäuse im Vergleich zu wildtypischen C57BL/6 Mäusen nicht in der Lage HBV-infizierte Hepatozyten zu eliminieren, so dass an Tag 14 nach Infektion weiterhin HBsAg⁺ und HBcAg⁺ Hepatozyten immunhistochemisch nachweisbar sind (**Abb. 4-6c,d**).

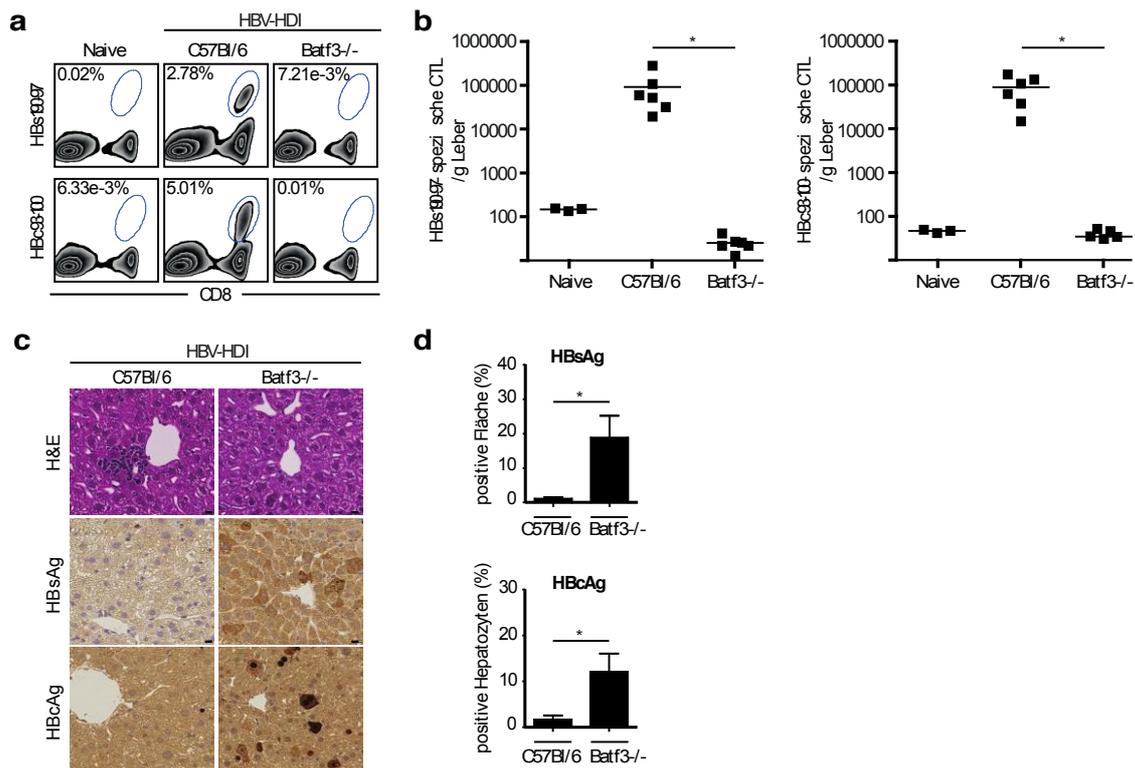


Abbildung 4-6 Batf3⁺ DC kreuzpräsentieren HBV-Antigene zur Induktion einer CTL-Antwort.

C57BL/6 oder Batf3^{-/-} Mäuse wurden mittels HBV-HDI infiziert und LAL an Tag 14 nach Infektion isoliert. **(a)** FACS-basierte Analyse HBV-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe HBs₁₉₀₋₉₇- oder Hbc₉₃₋₁₀₀-spezifischer Dextramere. **(b)** Quantitative Bestimmung der HBV-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe. **(c)** H&E-Färbung und immunhistochemische Analyse von HBsAg und HbcAg von Paraffinkonserviertem Lebergewebe. Die Maßbalken entsprechen 10µm. **(d)** Quantifizierung HBsAg⁺ Fläche und HbcAg⁺ Hepatozyten in Prozent. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=3 Tieren pro Gruppe. *P < 0.05 (Student's t-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in Abb. 4-6c,d wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Darüber hinaus benötigt eine Batf3⁺ DC-vermittelte Immunantwort gegen HBV keine kanonische Inflammasome-Aktivierung, da eine HBV-HDI Infektion in ASC-defizienten (ASC^{-/-}) Mäusen zu einer vergleichbaren CD8⁺ T Zell-vermittelten Immunantwort führt (Daten nicht gezeigt). ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain*) ist ein Adaptermolekül, welches eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von Caspase-1 spielt, welches essentiell für die Prozessierung und Freigabe der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 ist (Ozoren et al. 2006). Diese Zytokine spielen eine kritische Rolle in sowohl der angeborenen als auch adaptiven Immunität. Anhand der gezeigten Ergebnisse lässt sich ableiten, dass kreuzpräsentierende Batf3⁺ DC für die Generierung von sowohl HBs- als auch Hbc-spezifischen CD8⁺ T Zellen während einer akuten HBV-Infektion verantwortlich sind. Diese Immunantwort geht zusätzlich mit einer

frühen transienten Entzündungsreaktion einher und kann zu einer klärenden Immunreaktion führen.

In Patienten mit chronischer HBV-Infektion bleibt eine ausgeprägte Immunreaktion meist aus, da immunsupprimierende regulatorisch wirkende Zellpopulationen eine klärende Immunantwort unterdrücken und eine Toleranz gegenüber HBV vermitteln. Als Nächstes sollte die detaillierte Analyse von regulatorischen T Zellen (T_{REG}) im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion im Mausmodell untersucht werden.

4.3 Die Rolle der regulatorischen T Zellen im persistenten HBV-Mausmodell

Regulatorische $CD4^+$ T Zellen (T_{REG} Zellen) üben eine wichtige Funktion in der Regulierung von Autoimmunreaktionen aus und stehen in Zusammenhang mit der Entstehung von sowohl chronischen viralen, bakteriellen als auch parasitären Infektionen (Belkaid et al. 2002; Hisaeda et al. 2004; Rouse et al. 2006). Im Kontext einer akuten HBV-Infektion konnte bereits gezeigt werden, dass eine Depletion von T_{REG} Zellen zu einer zeitlich früheren Klärung der HBV-Infektion in Mäusen führt (Stross et al. 2012). In den folgenden Experimenten wurde die Relevanz von T_{REG} Zellen und deren Rolle in der Induktion einer HBV-spezifischen T Zell-Antwort im persistenten AdHBV-Mausmodell näher analysiert. Mit Hilfe der BAC-transgenen Mauslinie *Foxp3.LuciDTR-4* können T_{REG} Zellen mittels DTX-Applikation in Milz, Lymphknoten und Blut spezifisch depletiert werden (Suffner et al. 2010). Neben dem Diphtherie-Rezeptor (DTR), sind alle transgenen $Foxp3^+$ Zellen zum einen $eGFP^+$ und können so mittels FACS-basierter Analyse detektiert werden und exprimieren zum anderen das Enzym Luziferase, so dass eine *in vivo* Verfolgung dieser Zellen durch die Visualisierung der Biolumineszenz möglich ist. Zur Überprüfung der Effizienz einer T_{REG} -Depletion in der Leber, wurden transgene *Foxp3.LuciDTR-4* Mäuse täglich intraperitoneal mit DTX appliziert und zu angegebenen Zeitpunkten auf die transgene Expression von $eGFP$ oder Luziferase analysiert (**Abb. 4-8a-c**). Wie zu erkennen ist, weisen *Foxp3.LuciDTR-4* Mäuse eine Depletionseffizienz von 90-95% aller $eGFP^+$ Zellen auf (**Abb. 4-8a**). Zur weiteren Analyse der 5-10% nicht transgenen $Foxp3^+$ T_{REG} Zellen, wurde der Transkriptionsfaktor *Foxp3* zusätzlich mittels FACS-basierter Analyse miteinbezogen. Diese Ergebnisse zeigen eine kompensatorische Expansion nicht-transgener $Foxp3^+$ $eGFP^-$ T_{REG} Zellen ab Tag 4 nach erster aber kontinuierlichen DTX-Applikation, welche das T_{REG} Zellkompartiment vollständig und zum Teil sogar über den Ausgangswert hinaus wiederherstellen können (**Abb. 4a**). Zur Verfolgung

Foxp3⁺ Zellen *in vivo*, wurde die Biolumineszenz der Luciferase-exprimierenden T_{REG} Zellen zu Nutze gezogen. Luciferase⁺ Zellen können nach Zugabe des Substrates Luziferin zur Lichtemission angeregt werden und mit Hilfe des *In Vivo Imaging Systems* (IVIS) visualisiert werden. Dafür wurden Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse sowohl an Tag 0 vor als auch an Tag 2 nach DTX-Applikation analysiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass es an Tag 2 nach DTX-Applikation zu einer systemischen und signifikanten Depletion Luciferase⁺ T_{REG} Zellen in den Mäusen kommt (**Abb. 4-7b,c**).

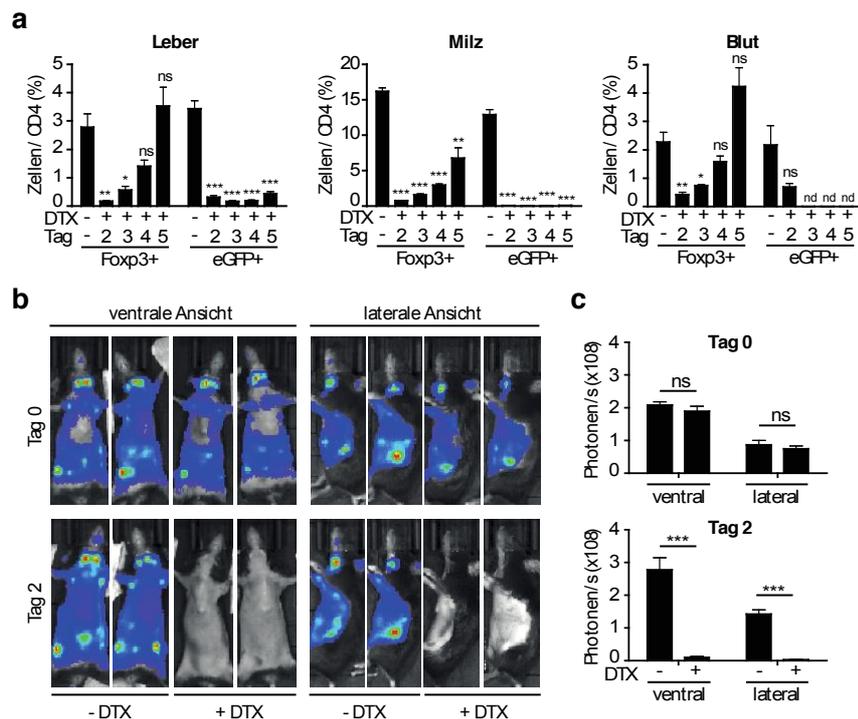


Abbildung 4-7 DTX-vermittelte Depletion eGFP⁺DTR⁺Luciferase⁺ T_{REG} Zellen in Foxp3.LuciDTR-4 Mäusen. Naive Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden täglich intraperitoneal mit DTX injiziert und die T_{REG}-Depletion zeitkinetisch untersucht. **(a)** Quantifizierung der FACS-basierten Analyse von Foxp3⁺CD4⁺ oder eGFP⁺CD4⁺ T_{REG} Zellen pro gesamter Anzahl CD4⁺ Zellen in verschiedenen Organen an verschiedenen Zeitpunkten nach DTX-Applikation. **(b)** Repräsentative Bilder der *in vivo* Biolumineszenz für Tag 0 und Tag 2 nach DTX-Applikation in ventraler und lateraler Ansicht. **(c)** Quantifizierung der gemessenen *in vivo* Biolumineszenz in Photonen pro Sekunde. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (Student's t-Test).

Da T_{REG} Zellen in der Regulation von Autoimmunkrankheiten sowohl des Menschen als auch der Maus eine wichtige Rolle übernehmen, wurde Nieren- und Lungengewebe immunhistochemisch auf intakte Gewebeintegrität mittels H&E-Färbung und auf eine mögliche CD3⁺ Immunzellinfiltration untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnte festgestellt werden, dass eine T_{REG}-Depletion in naiven Foxp3.LuciDTR-4 Mäusen weder eine gestörte Gewebeintegrität noch eine CD3⁺ Immunzellinfiltration induziert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine transiente Depletion Foxp3^+ T_{REG} Zellen über einen Zeitraum von 3 bis 4 Tagen gewährleistet werden kann ohne eine zusätzliche Autoimmunreaktion zu induzieren.

4.3.1 T_{REG} -Depletion in AdHBV-infizierten Mäusen induziert eine virale Hepatitis

In weiteren Versuchen wurde nun analysiert, welchen Einfluss T_{REG} Zellen auf die Etablierung einer persistenten AdHBV-Infektion haben. Dafür wurden Mäuse mit 10^8 iu AdHBV infiziert und mit DTX über einen Zeitraum von insgesamt 7 Tagen appliziert (**Abb. 4-8**). Zum Ausschluss einer toxischen Wirkung der DTX-Applikation (ohne T_{REG} -Depletion) und zeitgleicher AdHBV-Infektion, wurden neben transgenen Foxp3.LuciDTR-4 auch zusätzlich wildtypische C57BL/6 Mäuse experimentell miteinbezogen.

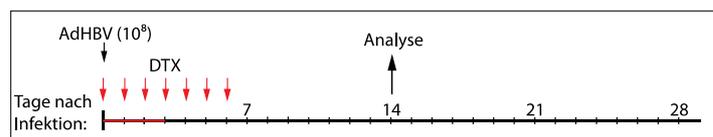


Abbildung 4-8 Applikationsschema der frühen DTX-vermittelten T_{REG} -Depletion.

C57BL/6 und Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert und über 7 Tage täglich intraperitoneal mit DTX (15ng/g Körpergewicht) injiziert. Der rote Balken entspricht der effektiven Depletion der Foxp3^+ Zellen in der Maus.

Eine frühe T_{REG} -Depletion führt zu einem signifikanten Leberschaden, welcher durch die erhöhte ALT-Aktivität von ca. 500 IU/L an Tag 10 nach AdHBV-Infektion nachweisbar ist (**Abb. 4-9a**). Anhand der immunhistochemischen H&E-Färbung des Lebergewebes, konnte an Tag 10 nach AdHBV-Infektion und gleichzeitiger T_{REG} -Depletion eine geringe Anomalie der Integrität des Leberparenchyms erkannt werden (**Abb. 4-9b**), welches die erhöhten ALT-Werte widerspiegelt. Weiterhin ist zu erkennen, dass eine DTX-Applikation in AdHBV-infizierten C57BL/6 Mäusen keinen weiteren Leberschaden induziert (**Abb. 4-9a,b**), welches auf eine nicht toxische Wirkung der applizierten DTX-Menge schließen lässt. Einhergehend mit dem Leberschaden nach T_{REG} -Depletion, konnte eine erhöhte Rate apoptotischer *Cleaved Caspase 3* (ClCasp3^+)-positiver Hepatozyten nachgewiesen werden (**Abb. 4-9b,c**). Zudem konnte eine kompensatorische Proliferation von Hepatozyten verzeichnet werden, welche durch die vermehrte Expression des nukleären Proliferationsmarkers Ki67 visualisiert wurde.

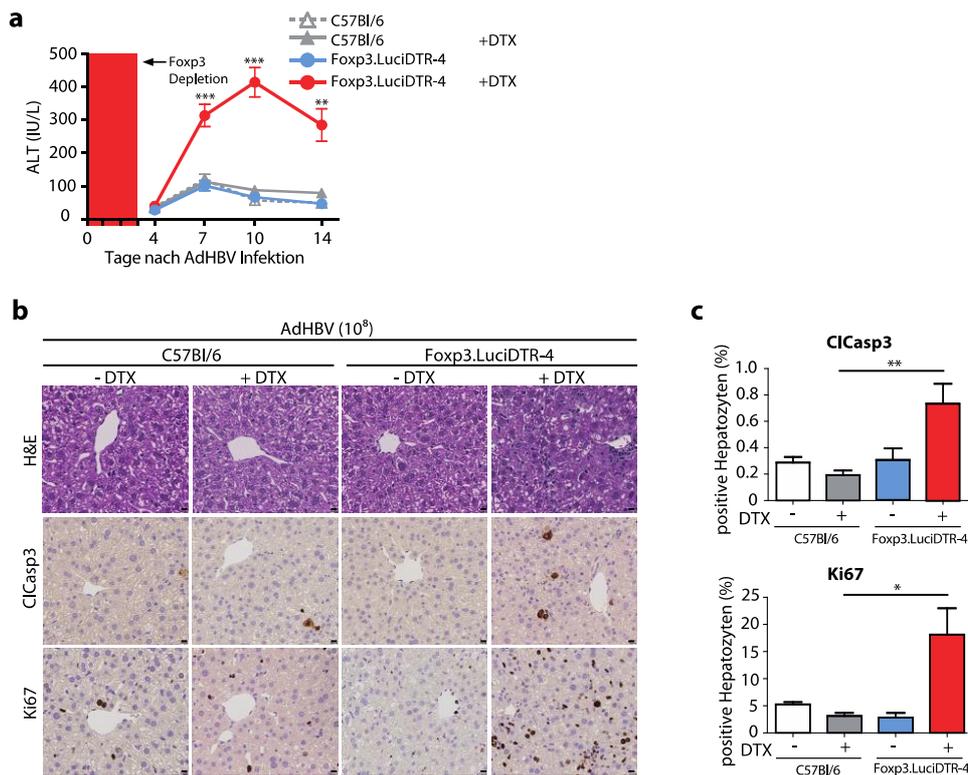


Abbildung 4-9 T_{REG}-Depletion induziert virale Hepatitis nach AdHBV-Infektion.

C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert, \pm DTX-Applikation. **(a)** Zeitkinetischer Verlauf der Leber-spezifischen ALT-Aktivität. **(b)** Immunhistologische Analyse von Paraffin-konserviertem Lebergewebe an Tag 10 nach AdHBV-Infektion für H&E, ClCasp3 und Ki67. Die Maßbalken entsprechen 10 μ m. **(c)** Quantifizierung positiver Hepatozyten von (b). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Student's *t*-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunohistochemischen Analyse in Abb. 4-9b,c wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Weitere immunohistochemische Analysen konnten einhergehend zeigen, dass es neben der verstärkten viralen Hepatitis auch zu einer Akkumulation diverser Immunzellen in der Leber AdHBV-infizierter und T_{REG}-depletierter Mäusen kommt (**Abb. 4-10a**). Diese Versuchsgruppe zeigte eine verstärkte Anhäufung MHC-II⁺ APC, wie z.B. Kupffer Zellen, CD45⁺ Immunzellen und insbesondere CD3⁺ Lymphozyten, jedoch kein verstärktes Einwandern Ly6G⁺ Granulozyten (**Abb. 4-10b**).

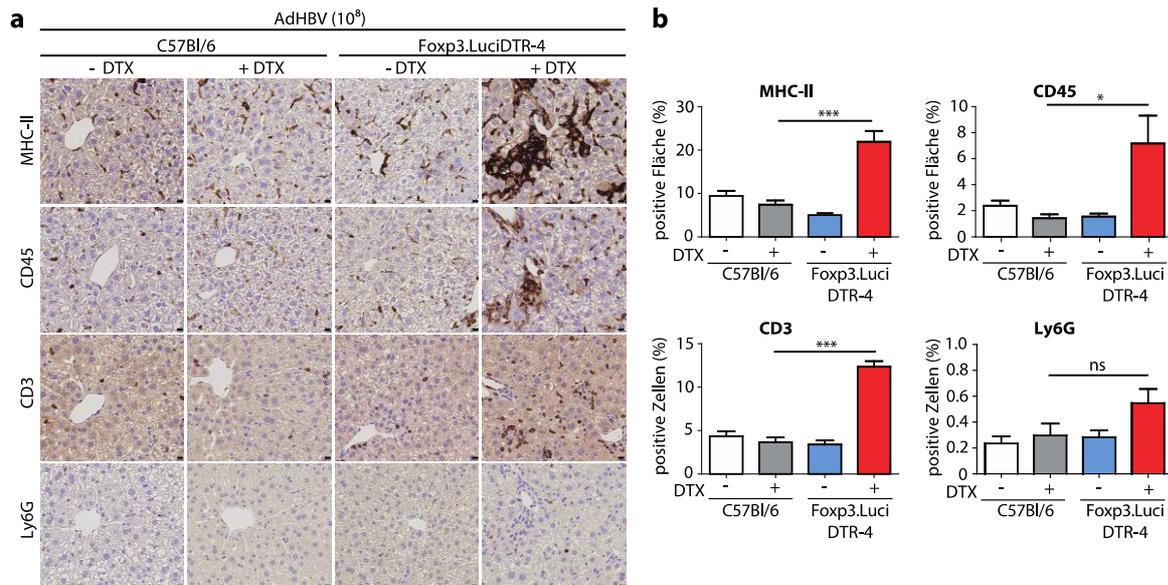


Abbildung 4-10 T_{REG}-Depletion induziert verstärkte Immunzellantwort in der Leber nach AdHBV-Infektion. C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert, \pm DTX-Applikation. Paraffinkonserviertes Lebergewebe wurde an Tag 10 nach AdHBV-Infektion analysiert. **(a)** Immunhistochemische Analyse von MHC-II⁺, CD45⁺, CD3⁺ und Ly6G⁺ Zellen. Die Maßbalken entsprechen 10 μ m. **(b)** Quantifizierung positiver Zellen oder Fläche von (a). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (Student's *t*-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in Abb. 4-10a,b wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Aufgrund der verstärkten lokalen Immunantwort in der Leber wurde zudem das Expressionsmuster verschiedener immunmodulierender Gene im Lebergewebe mittels quantitativer PCR eingehend untersucht werden. Es konnte eine signifikant erhöhte Expression proinflammatorischer Gene nachgewiesen werden, wie die der Chemokine CCL2, CCL3 und CCL4, der Zytokine IFN γ , TNF, LIGHT und BAFF wie auch der Zielgene des kanonischen NF κ B-Signalweges wie A20, VCAM und ICAM (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse antiinflammatorischer Gene, wie z.B. von IL-10, konnte hingegen keine erhöhte Genexpression gemessen werden.

Eine lokale Expression von TNF in der Leber steht mit der Induktion von iMATES, den *intrahepatic myloid-cell aggregates for T cell population expansion*, in Verbindung (Huang et al. 2013). Solche Kokon-ähnliche Strukturen bestehen aus inflammatorischen monozytären CD11b⁺ Zellen, welche mit Hilfe des kostimulatorischen Rezeptors Ox40 zur Expansion von CD8⁺ T Zellen führt. Eine TNF-induzierte iMATE-Formation wurde bisher nur im Kontext akuter Infektionen beschrieben, wobei diese Strukturen mit chronisch persistenten Infektionsmodellen nicht assoziiert werden. Obwohl es sich bei der AdHBV-Infektion um eine persistente Infektion handelt, konnte nach T_{REG}-Depletion eine partielle Leber-spezifische

Immunantwort nachgewiesen werden (**Abb. 4-9, 4-10**). Dies veranlasste die nähere Untersuchung von Lebergewebe auf die Induktion von iMATEs nach AdHBV-Infektion mit einhergehender T_{REG}-Depletion. Obwohl es zu einer verstärkten Infiltration MHC-II⁺ APC kommt, können keine für iMATE-Strukturen charakteristische iNOS⁺ oder Ox40L⁺ Zellaggregate im Lebergewebe nachgewiesen werden (**Abb. 4-11a,b**). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine DTX-Applikation in AdHBV-infizierten C57BL/6 Mäusen (ohne T_{REG}-Depletion) auch keine Induktion iMATE-ähnlicher Strukturen induziert.

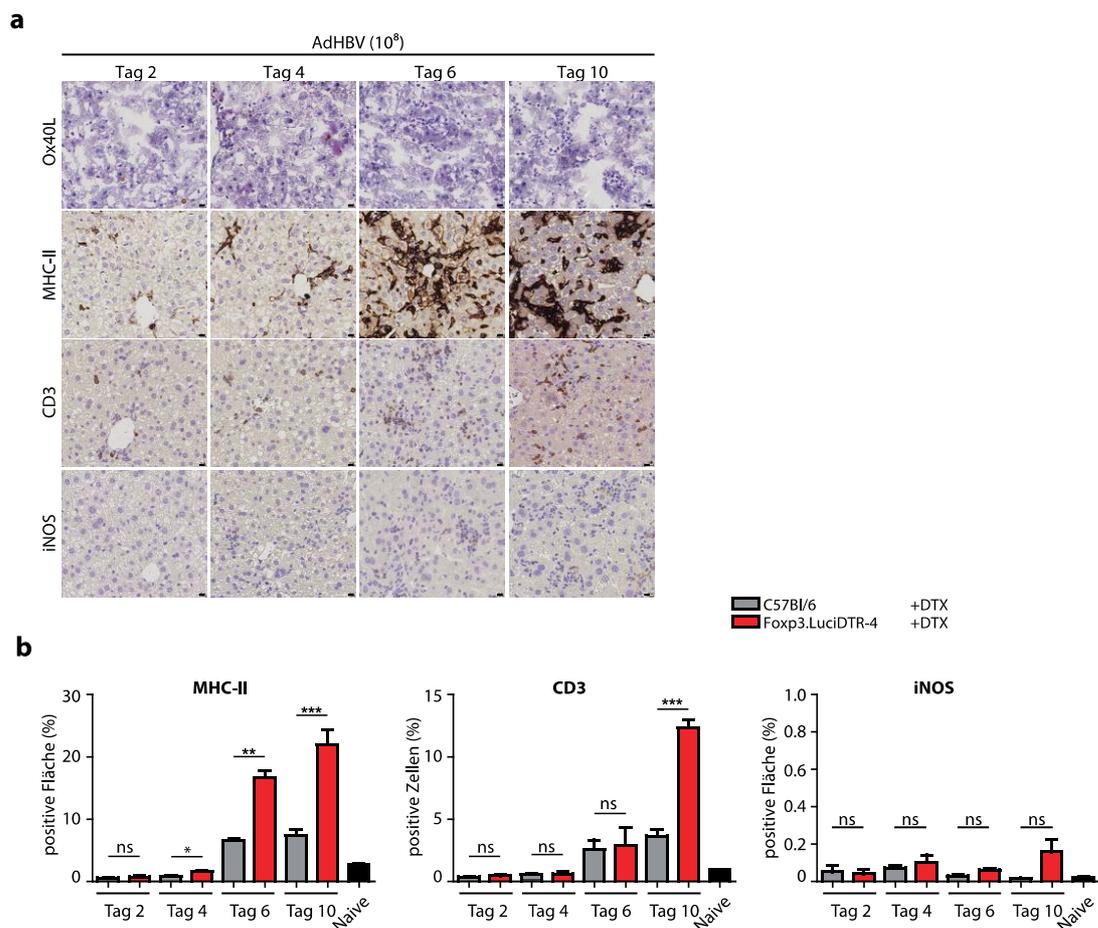


Abbildung 4-11 T_{REG}-Depletion induziert keine iMATE-ähnlichen Strukturen nach AdHBV-Infektion.

C57BL/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10⁸ iu AdHBV infiziert, ± DTX-Applikation. Paraffin- oder Kryo-konserviertes Lebergewebe wurde zeitkinetisch mittels Immunhistochemie analysiert. **(a)** Immunhistochemische Ox40L-Färbung von Kryo-konserviertem und MHC-II-, CD3- und iNOS-Färbung von Paraffin-konserviertem Lebergewebe. **(b)** Quantifizierung positiver Zellen oder Fläche von (a). Die Balken repräsentieren 10µm. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. *P< 0.05; ***P< 0.001 (Student's t-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in Abb. 4-11a,b wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Zum Ausschluss einer induzierten Autoimmunreaktion durch die T_{REG}-Depletion nun im Kontext einer AdHBV-Infektion, wurden H&E-Färbungen wie auch immunhistochemische Analysen von CD3⁺ Immunzellinfiltraten in Lungen- und Nierengewebe durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese zeigten sowohl an frühen Zeitpunkten nach AdHBV-Infektion (Tag 2, 4 und 6) und T_{REG}-Depletion als auch an Tag 98 keine sichtbare Veränderung der Gewebeintegrität und keine erhöhte Infiltration von CD3⁺ Immunzellen. Zusammengenommen lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass eine AdHBV-Infektion mit initialer jedoch transients T_{REG}-Depletion von 3 Tagen sowohl zu der Entstehung einer antiviralen Immunantwort als auch zu der Induktion einer viralen Hepatitis führt, ohne jedoch eine Autoimmunreaktion auszulösen.

4.3.2 T_{REG}-Depletion induziert HBs-spezifische Immunität in AdHBV-infizierten Mäusen

Als Nächstes sollte sowohl der Verlauf viraler Parameter als auch die adaptive CD8⁺ T Zell-Antwort gegen AdHBV in T_{REG}-depletierten Mäusen näher untersucht werden. Im zeitkinetischen Verlauf der HBsAg- und HBeAg-Werte im Serum infizierter Mäuse konnte eine Reduktion der HBsAg-Werte mit einer vollständigen Neutralisierung bis Tag 10 nur in T_{REG}-depletierten Mäusen im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen detektiert werden (**Abb. 4-12a**). Obwohl die HBeAg-Werte über den Zeitverlauf von 14 Tagen in T_{REG}-depletierten Mäusen etwas abnehmen, bleiben diese über den analysierten Zeitraum weiterhin deutlich nachweisbar (**Abb. 4-12b**). Zur Analyse der adaptiven T Zell-Antwort wurden LAL an Tag 14 nach AdHBV-Infektion aus den verschiedenen Gruppen isoliert und spezifisch für HBV-positive CD8⁺ CTL gefärbt. Dies wurde mit Hilfe H-2K^b-restringierter HBs₁₉₀₋₉₇- oder HBe₉₃₋₁₀₀-spezifischer Dextramere durchgeführt (**Abb. 4-12c**). Mit Hilfe FACS-basierter Analyse der LAL konnte eine HBs-spezifische CTL-Antwort detektiert werden, welche in den anderen Kontrollgruppen nicht nachweisbar ist (**Abb. 4-12c,d**). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die HBs-spezifische CTL-Antwort nach AdHBV-Infektion und T_{REG}-Depletion mit der durch HBs-Vakzinierung induzierten CTL-Antwort quantitativ vergleichbar ist (**Abb. 4-12d**). Dies demonstriert, dass T_{REG} Zellen die Expansion der HBs-spezifischen CTL im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion kontrollieren können.

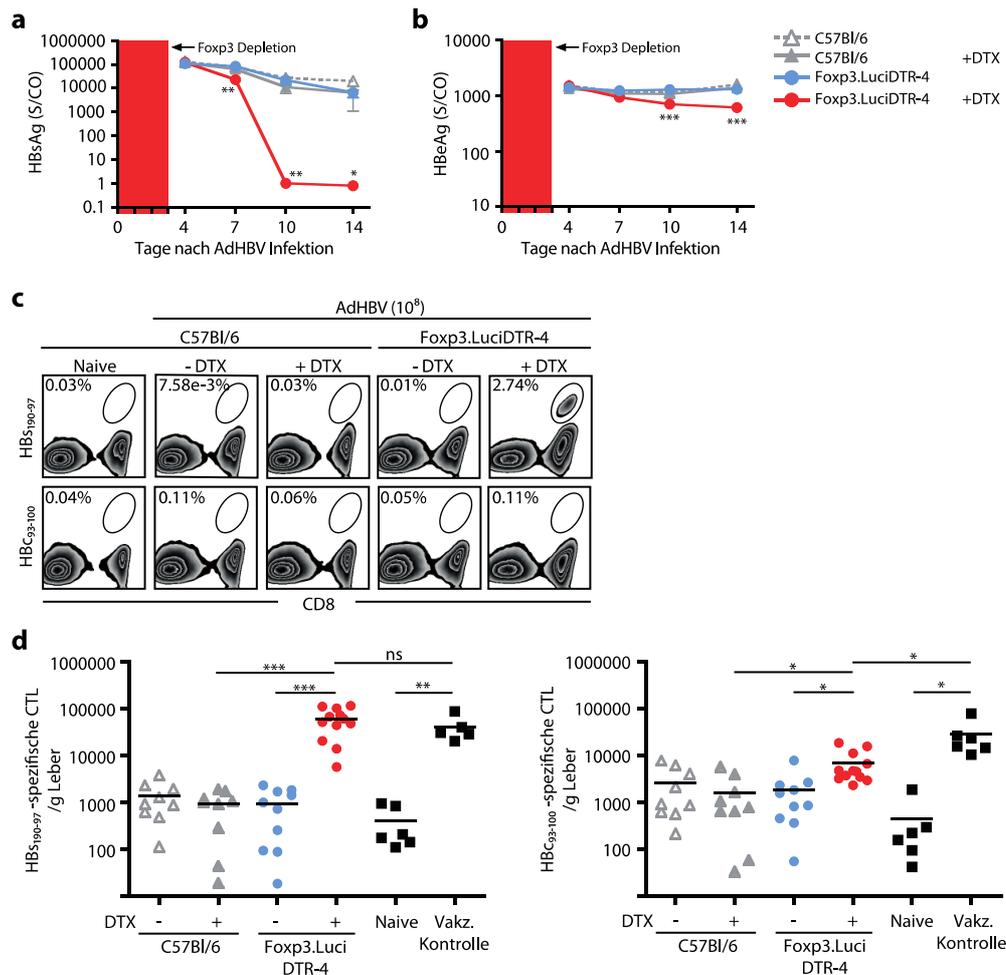


Abbildung 4-12 T_{REG}-Depletion induziert HBs-spezifische Immunität nach AdHBV-Infektion.

C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert, \pm DTX-Applikation. Der rote Balken entspricht der nachweisbaren Depletion Foxp3⁺ Zellen. Zeitkinetische Analyse der Serum **(a)** HBsAg-Werte und **(b)** HBeAg-Werte. **(c)** FACS-basierte Bestimmung HBV-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe HBs₁₉₀₋₉₇- oder HBeAg₉₃₋₁₀₀-spezifischer Dextramere an Tag 14 nach Infektion. **(d)** Quantitative Bestimmung der HBV-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Student's *t*-Test).

Da eine Expansion HBs-spezifischer CTL durch eine T_{REG}-Depletion induziert werden kann, stellte sich im Folgenden die Frage, ob diese ihre Effektorfunktionen ausüben und HBV-infizierte Hepatozyten eliminieren können. Dafür wurde Lebergewebe an Tag 14 nach AdHBV-Infektion immunhistochemisch untersucht. Einhergehend mit der Expansion HBs-spezifischer CTL nach AdHBV-Infektion und gleichzeitiger T_{REG}-Depletion, konnte sowohl eine signifikante Reduktion HBsAg⁺ als auch HBeAg⁺ Hepatozyten detektiert werden (**Abb. 4-13a,b**). Mit Hilfe des H&E-gefärbten Leberparenchyms wird eine zu Tag 10 nach AdHBV-Infektion (**Abb. 4-9b**) vergleichbare Integrität visualisiert, welche keinen fortschreitenden Leberschaden annehmen lässt.

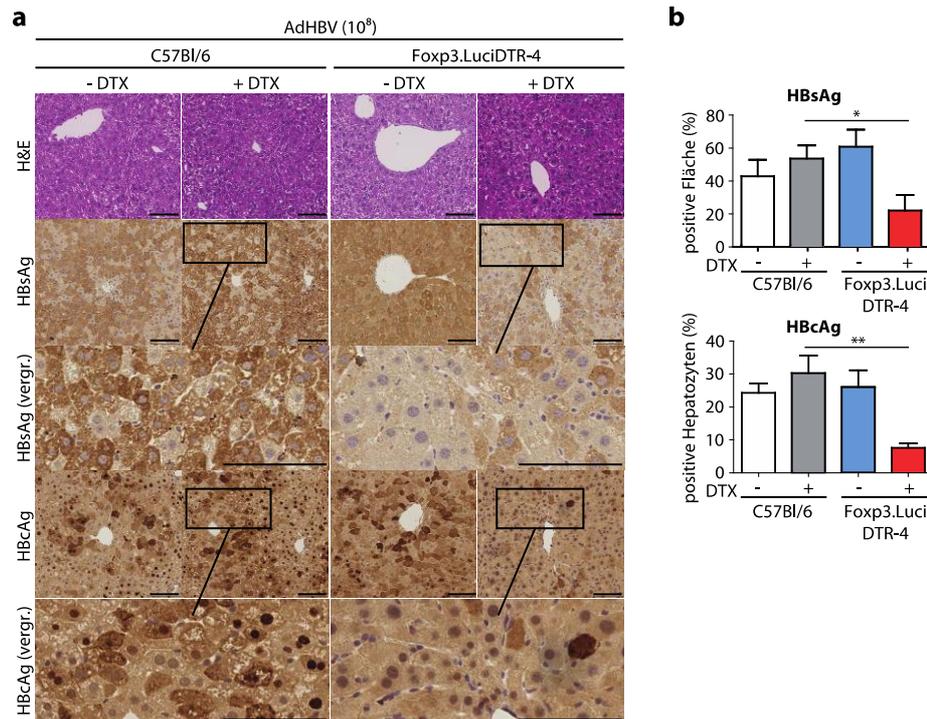


Abbildung 4-13 T_{REG}-Depletion führt zu einer Reduktion HBV⁺ Hepatozyten nach AdHBV-Infektion.

C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert, \pm DTX-Applikation und Lebergewebe an Tag 14 nach AdHBV-Infektion Paraffin-konserviert. **(a)** Immunhistologische Analyse mittels H&E-Färbung oder HBV-spezifischer Antigene. Die Maßbalken entsprechen 100 μ m. **(b)** Quantifizierung positiver Hepatozyten oder Fläche von (a). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's *t*-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in Abb. 4-13a,b wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Obwohl es zu einer deutlichen Reduktion HBV-spezifischer Hepatozyten nach zusätzlicher T_{REG}-Depletion kommt, kann eine gänzliche Eliminierung aller HBV-infizierter Hepatozyten nicht erreicht werden. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass eine alleinige T_{REG}-Depletion im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion in der Maus zum einen zwar eine Immunantwort gegen HBsAg induzieren kann, zum anderen jedoch nicht in der Lage ist eine vollständige und somit klärende HBc-spezifische Immunantwort zu induzieren.

4.3.3 HBs-spezifische Immunität nach T_{REG}-Depletion ist nicht ausreichend zur Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten

Da es nach T_{REG}-Depletion in AdHBV-infizierten Mäusen bis zu Tag 14 nach Infektion zu keiner vollständigen Eliminierung HBV-spezifischer Hepatozyten kommt, stellt sich die Frage ob der Endzeitpunkt der Analyse zu früh gewählt wurde. Für eine längere zeitkinetische Analyse wurden daher AdHBV-infizierte Mäuse über einen Zeitraum von 98 Tagen regelmäßig serologisch untersucht und Lebergewebe an Tag 98 zur immunhistochemischen

Analyse konserviert. In AdHBV-infizierten und T_{REG}-depletierten Mäusen kommt es sowohl zu einer Reduktion der HBsAg-Werte im Serum (**Abb. 4-14a**) als auch zu einer einhergehenden Produktion von neutralisierenden anti-HBs Antikörpern (**Abb. 4-14b**). Die HBeAg-Werte im Serum aller Gruppen zeigen eine stetige Reduktion über den gesamten Zeitraum von 98 Tagen, wobei die HBeAg-Werte in T_{REG}-depletierten Mäusen leicht stärker abfallen, jedoch in allen Versuchsgruppen nachweisbar bleiben (**Abb. 4-14c**). Die allgemeine Reduktion der HBeAg-Werte lässt sich auf die stetige Proliferation und Apoptose von Hepatozyten zurückführen, welche über den Zeitraum von 98 Tagen auch zu einer Reduktion HBV⁺ Hepatozyten führt (**Abb. 4-9b,c**). Die stärkere Reduktion der HBeAg-Werte in T_{REG}-depletierten Mäusen wird zusätzlich durch die gerichtete Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten durch die HBs-spezifischen CTL verursacht. Zusätzlich ist von Bedeutung, dass HBV-Virionen nach initialer AdHBV-Infektion aufgrund fehlender spezifischer Oberflächenrezeptoren nicht mehr in der Lage sind murine Hepatozyten zu infizieren und es folglich zu keiner weiteren *de novo* Infektion mit HBV in der Maus kommt. Damit einhergehend konnte mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse des Lebergewebes an Tag 98 nach AdHBV-Infektion eine Reduktion sowohl HBsAg⁺ als auch HBcAg⁺ Hepatozyten detektiert werden (**Abb. 4-14d,e**), welche sich jedoch kaum von den Werten HBV-infizierte Hepatozyten von Tag 14 nach Infektion unterscheiden. Dies zeigt, dass auch nach einer Infektionszeit von 98 Tagen keine weitere Eliminierung des Virus aus der Leber stattfinden konnte.

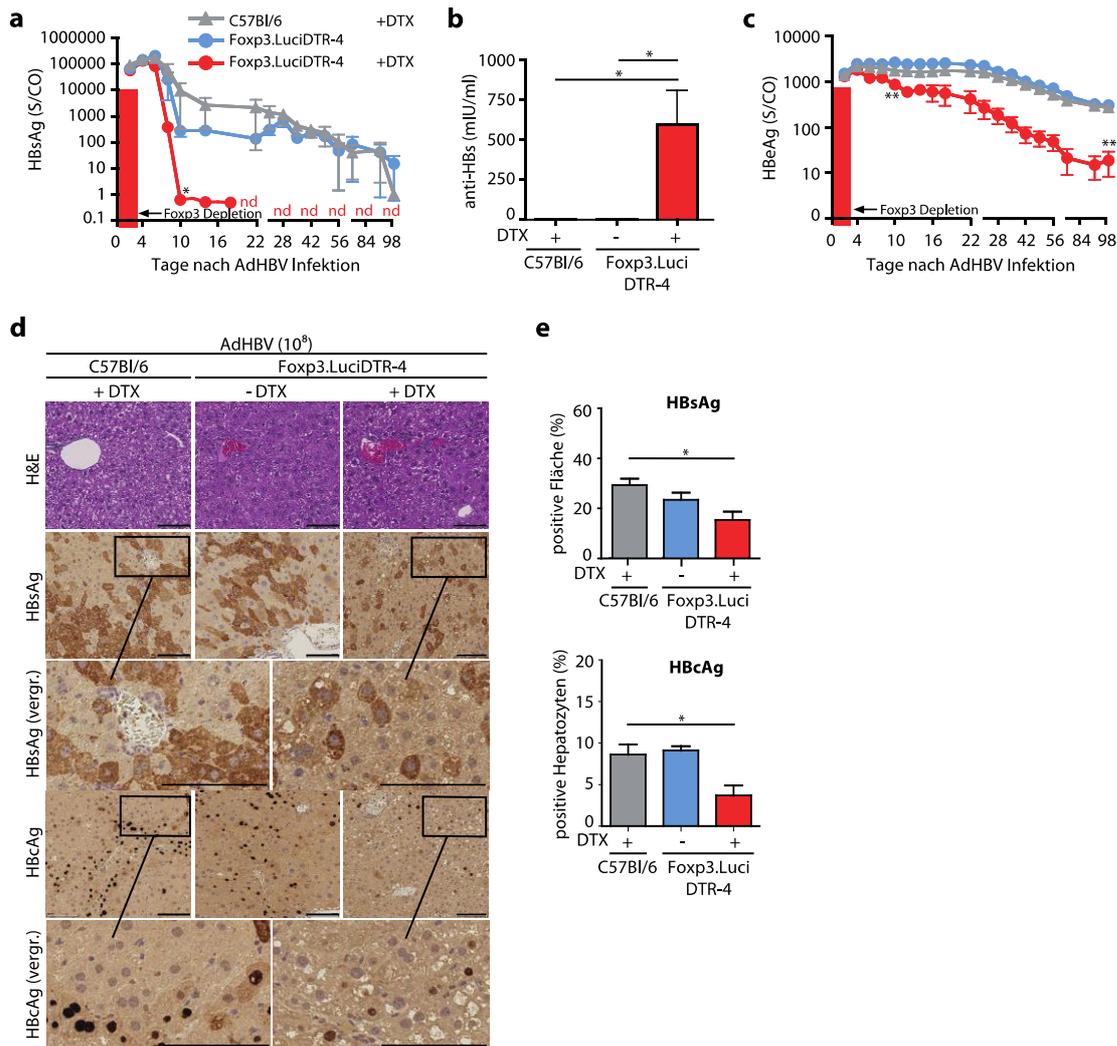


Abbildung 4-14 HBs-spezifische Immunität nach T_{REG}-Depletion führt nicht zur Klärung der AdHBV-Infektion. C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10⁸ iu AdHBV infiziert, ± DTX-Applikation. Virale Parameter wurden zeitkinetisch im Serum untersucht; Lebergewebe wurde an Tag 98 nach AdHBV-Infektion Paraffinkonserviert. **(a)** HBsAg-Werte zu angegebenen Zeitpunkten. **(b)** Produktion neutralisierender anti-HBs Antikörper an Tag 98 nach AdHBV-Infektion. **(c)** HBeAg-Werte zu angegebenen Zeitpunkten. **(d)** Immunhistochemische Analyse mittels H&E-Färbung und HBV-spezifischer Antigene. Die Maßbalken entsprechen 100µm. **(e)** Quantifizierung positiver Hepatozyten oder Fläche von (d). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. **P*< 0.05; ***P*< 0.01 (Student's *t*-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in Abb. 4-14d,e wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Als Nächstes wurde Lebergewebe zusätzlich auf Veränderungen in der Gewebeintegrität, den Verlauf des initialen Leberschadens sowie die Infiltration von Immunzellen untersucht. Der an Tag 10 durch erhöhte ALT-Aktivität und veränderter Gewebeintegrität (H&E-Färbung) nachgewiesene Leberschaden wurde bis zur Endpunktanalyse an Tag 98 vom Immunsystem auf Ausgangswerte normalisiert (**Abb. 4-15a,b**). Es konnte zudem weder eine erhöhte Anzahl

apoptotischer ClCasp3⁺, proliferierender Ki67⁺ Hepatozyten noch eine Infiltration MHC-II⁺ APC in der Leber T_{REG}-depletierter Mäuse nachgewiesen werden (**Abb. 4-15b,c**).

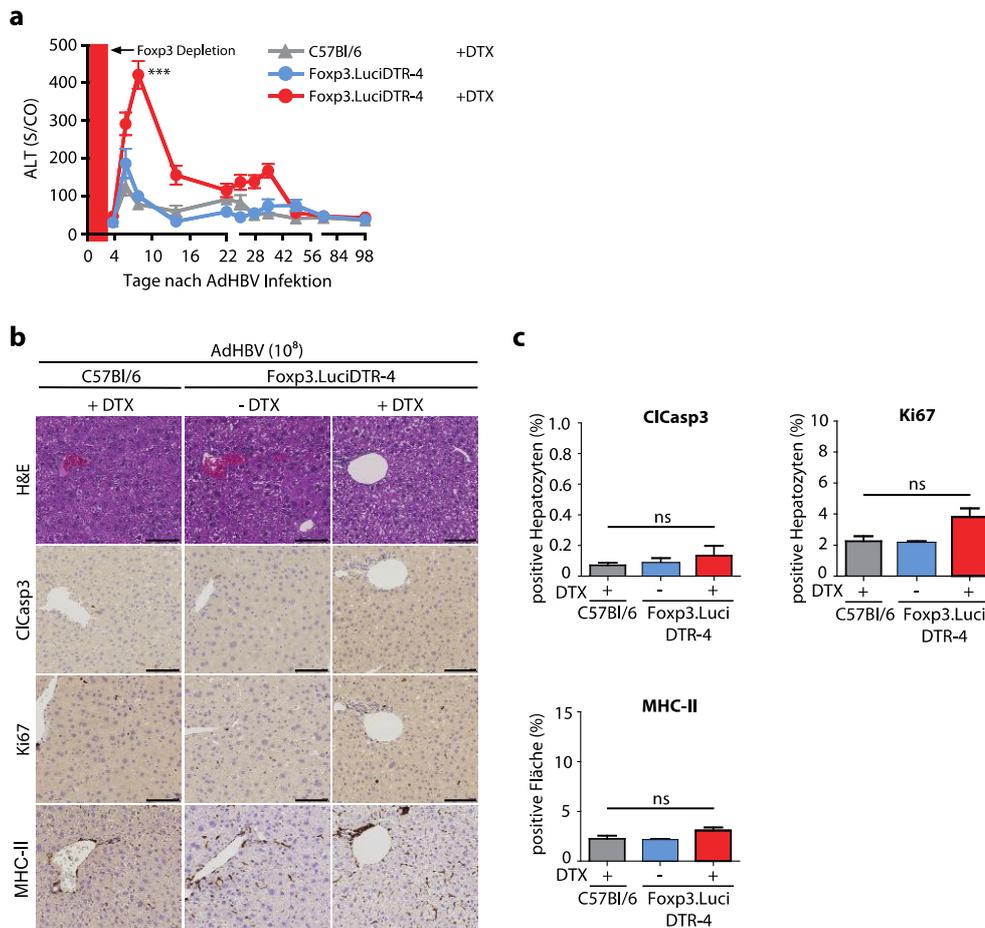


Abbildung 4-15 T_{REG}-Depletion induziert keine anhaltende Hepatitis nach AdHBV-Infektion.

C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10⁸ iu AdHBV infiziert, ± DTX-Applikation. **(a)** Zeitkinetische Messung der Serum ALT-Aktivität. **(b)** H&E- und immunhistochemische Färbung von ClCasp3, Ki67 und MHC-II auf Paraffin-konserviertem Lebergewebe. Die Maßbalken entsprechen 100µm. **(c)** Quantifizierung positiver Hepatozyten oder Fläche von (c). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=5 Tieren pro Gruppe. ****P*< 0.001 (Student's *t*-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in Abb. 4-15b,c wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Obwohl eine T_{REG}-Depletion in AdHBV-infizierten Mäusen zu der Expansion HBs-spezifischer CTL führt, so kommt es bis Tag 98 nach Infektion zu keiner weiteren klärenden Immunreaktion mit fehlender effektiven Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Depletion von Foxp3⁺ T_{REG} Zellen zu einer Expansion HBs-spezifischer CTL führt, welche auch zu einem späteren Zeitpunkt nicht in der Lage sind eine effektive antivirale HBV-Immunität zu induzieren und zu einer Klärung der Infektion zu verhelfen.

4.3.4 Späte T_{REG}-Depletion induziert HBs-spezifische Immunität ohne eine Adenovirus-vermittelte Immunreaktion

Da wir uns einen adenoviralen Vektor als Transportmechanismus des HBV-Genoms in murine Hepatozyten zu Nutze gezogen haben, stellt sich nun die Frage welchen Einfluss die Infektion mit einem Adenovirus auf den Verlauf einer HBV-Infektion mit einhergehender T_{REG}-Depletion hat. Adenoviren akkumulieren innerhalb der ersten 30 Minuten nach Infektion in den Lebersinosoiden infizierter Mäuse (Shayakhmetov et al. 2004) und führen zu einer raschen antiviralen Immunantwort im Wirt. Um mögliche Adenovirus-assoziierte und somit zusätzlich proinflammatorische Auswirkungen näher zu untersuchen, wurden Mäuse erst an Tag 14 nach AdHBV-Infektion T_{REG}-depletiert (**Abb. 4-16**) und für weitere 14 Tage serologisch und immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich handelt es sich um eine Replikations-defiziente Version des Adenovirus, bei der die Proteintranslation des E1- und E3-Gens durch gezielte Mutationen disruptiert wurden. Dadurch bedingt kommt es weder zu einer Vermehrung noch einer Re-Infektion muriner Zellen mit dem Adenovirus.

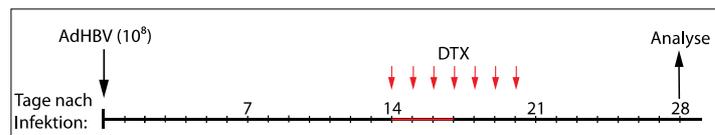


Abbildung 4-16 Applikationsschema der späten DTX-vermittelten T_{REG}-Depletion.

C57BL/6 und Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert. Ab Tag 14 nach Infektion wurde täglich über 7 Tage DTX (15ng/g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Der rote Balken entspricht der Depletion Foxp3⁺ Zellen.

Wie in **Abb. 4-17a** zu erkennen ist, kommt es an Tag 4 nach AdHBV-Infektion zu einem geringen und nur transient anhaltenden Anstieg der ALT-Aktivität in beiden Mausgruppen. Nach der T_{REG}-Depletion ab Tag 14 nach Infektion kommt es nur in T_{REG}-depletierten Mäusen zu einem leichten Anstieg der ALT-Aktivität an Tag 18 und 28. Mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse des Leberparenchyms an Tag 28 konnte einhergehend sowohl einen Anstieg apoptotischer ClCasp3⁺ Hepatozyten als auch eine kompensatorische Proliferation der Hepatozyten (Ki67⁺) nachgewiesen werden (**Abb. 4-17b,c**). Zusätzlich ist eine signifikant erhöhte Infiltration von MHC-II⁺ APC und CD3⁺ Immunzellen nach T_{REG}-Depletion zu erkennen (**Abb. 4-17d,e**).

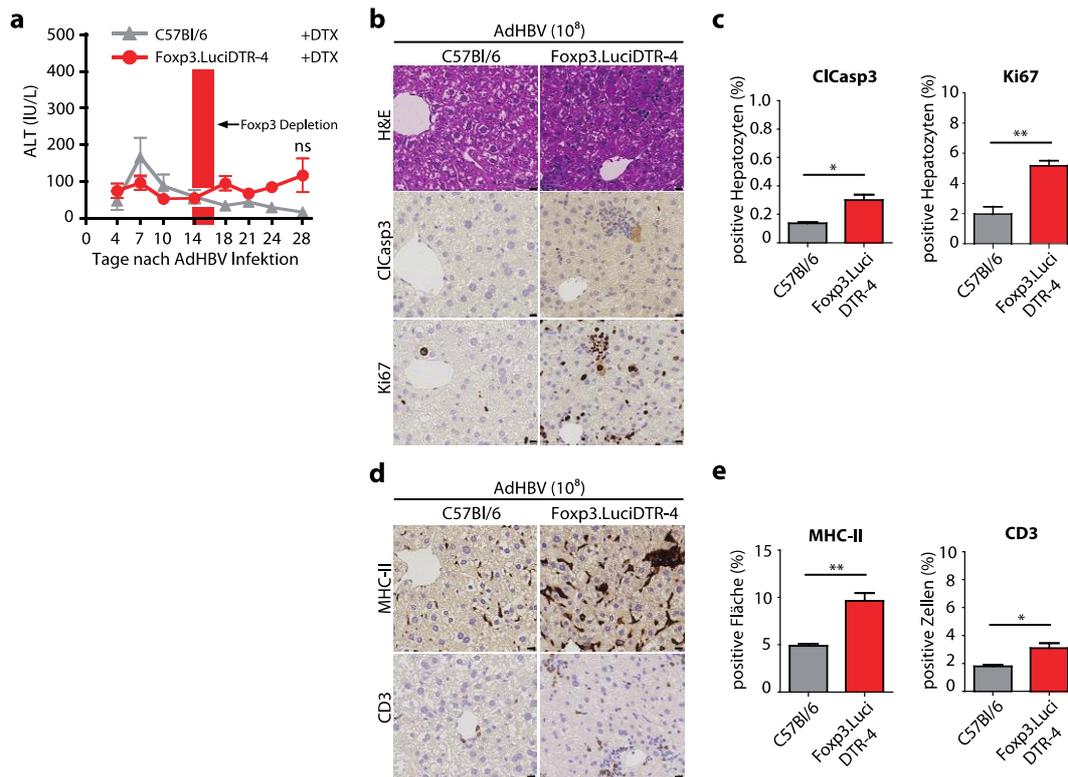


Abbildung 4-17 Späte T_{REG}-Depletion führt zu einer reduzierten viralen Hepatitis nach AdHBV-Infektion. C57BL/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10⁸ iu AdHBV infiziert, + DTX ab Tag 14. **(a)** Zeitkinetischer Verlauf der Serum ALT-Werte. **(b,d)** Immunhistochemische Analyse von ClCasp3⁺, Ki67⁺, MHC-II⁺ und CD3⁺ Zellen auf Paraffin-konserviertem Lebergewebe. Die Maßbalken entsprechen 10µm. **(c,e)** Quantifizierung positiver Hepatozyten, Zellen oder Fläche von (b,d). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=3-5 Tieren pro Gruppe. *P< 0.05; **P< 0.01 (Student's *t*-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in Abb. 4-17b-e wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Vergleicht man die ALT-Aktivität und die Rate apoptotischer Zellen von Tag 28 nach AdHBV-Infektion und später T_{REG}-Depletion mit dem induzierten Leberschaden an Tag 14 nach AdHBV-Infektion und früher T_{REG}-Depletion (**Abb. 4-9**), so kann an Tag 28 eine deutlich schwächere Immunreaktion in der Leber nachgewiesen werden. Als Nächstes sollten sowohl die viralen Serumparmeter als auch die adaptive HBV-spezifische CTL-Antwort näher untersucht werden. Wie auch nach früher T_{REG}-Depletion gezeigt wurde, konnte auch nach später T_{REG}-Depletion eine Neutralisierung der HBsAg-Werte im Serum innerhalb von 10 Tagen (Tag 24 nach AdHBV) gemessen werden (**Abb. 4-18a**), wobei wildtypische C57BL/6 Mäuse über den gesamten Verlauf positive HBsAg-Werte zeigen. Einhergehend mit der Reduktion der HBsAg-Werte, konnte an Tag 28 nach AdHBV-Infektion die Produktion neutralisierender anti-HBs Antikörper nur in T_{REG}-depletierten Mäusen gemessen werden (**Abb. 4-18b**). HBeAg-Werte blieben in beiden Versuchsgruppen in vergleichbaren Mengen über den gesamten Zeitraum nachweisbar (**Abb. 4-18c**). Für die Analyse der

HBV-spezifischen CTL-Antwort wurden LAL an Tag 28 isoliert und mit Hilfe FACS-basierter Analyse quantifiziert. Auch im Kontext einer späten T_{REG}-Depletion zeigten AdHBV-infizierte Mäuse eine geringe jedoch signifikante Expansion HBs-spezifischer CTL (**Abb. 4-18d,e**). Eine HBc-spezifische CTL-Antwort konnte weder in wildtypischen noch T_{REG}-depletierten Mäusen induziert werden.

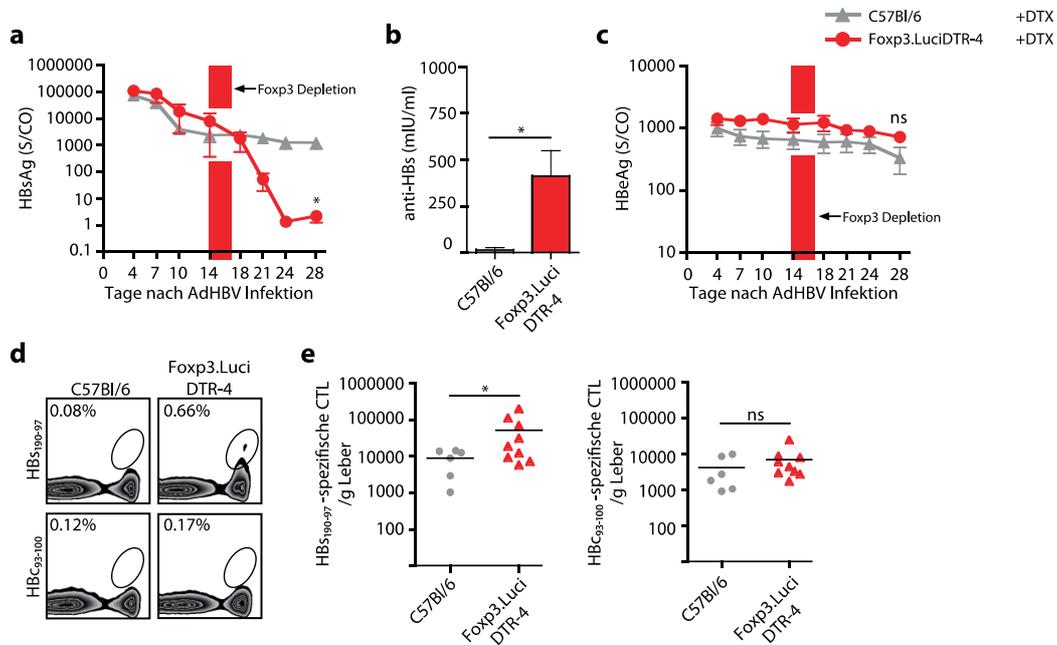


Abbildung 4-18 Späte T_{REG}-Depletion vermittelt eine HBs-spezifische Immunität nach AdHBV-Infektion. C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10⁸ iu AdHBV infiziert, +DTX ab Tag 14. **(a)** Zeitkinetischer Verlauf der Serum HBsAg-Werte. **(b)** Messung von anti-HBs Antikörpern im Serum an Tag 28 nach Infektion. **(c)** Zeitkinetischer Verlauf der HBeAg-Werte im Serum **(d)** FACS-basierte Analyse HBV-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe HBs₁₉₀₋₉₇ oder HBC₉₃₋₁₀₀-spezifischer Dextranere. **(e)** Quantitative Bestimmung der HBV-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=3-5 Tieren pro Gruppe. *P< 0.05 (Student's t-Test).

Da es zu einer etwas schwächeren Expansion HBs-spezifischer CTL nach später T_{REG}-Depletion kommt, stellt sich demnach die Frage ob eine so geringe Anzahl an CTL in der Lage ist, HBV-spezifische Hepatozyten gezielt zu eliminieren. Dafür wurde Lebergewebe an Tag 28 nach AdHBV-Infektion mittels immunohistochemischer Färbung auf HBsAg⁺ und HBcAg⁺ Hepatozyten untersucht. In der Tat konnten die HBV-spezifischen CTL zu einer signifikanten Reduktion HBV-spezifischer Hepatozyten in T_{REG}-depletierten gegenüber C57Bl/6 Mäusen führen (**Abb. 4-19a,b**).

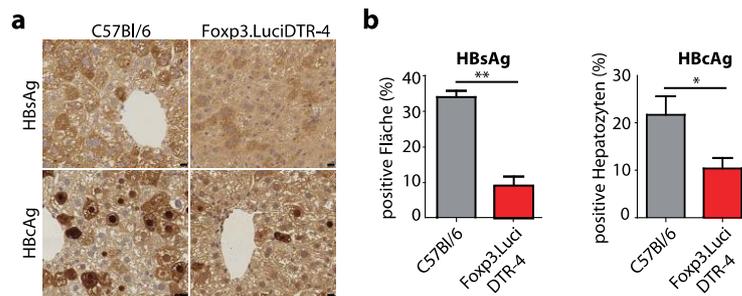


Abbildung 4-19 Späte T_{REG}-Depletion reduziert HBV-infizierte Hepatozyten nach AdHBV-Infektion.

C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert und mit DTX injiziert. **(a)** Immunhistochemische Analyse HBV-spezifischer Marker auf Paraffin-konserviertem Lebergewebe. Die Maßbalken entsprechen $10\mu\text{m}$. **(b)** Quantifizierung positiver Hepatozyten oder Fläche von (a). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit $n=3-5$ Tieren pro Gruppe. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ (Student's *t*-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in **Abb. 4-19a,b** wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine Ablation von T_{REG} Zellen unabhängig des Zeitpunktes nach AdHBV-Infektion sowohl zu einer Expansion HBs-spezifischer CTL mit einhergehender Reduktion HBV-infizierte Hepatozyten als auch einer Neutralisierung der HBsAg-Werte aus dem Serum führt. Dennoch kann weiterhin keine Expansion klärender HBc-spezifischer CTL induziert werden, so dass eine systemische Eliminierung der HBV-Infektion ausbleibt.

4.4 B Zellen vermitteln die Etablierung einer HBs-spezifischen Immunität

Die Produktion neutralisierender anti-HBs Antikörper in T_{REG}-depletierten Mäusen führte zu einer näheren Betrachtung der Relevanz von B Zellen im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion. Zur spezifischen *in vivo* Depletion von B Zellen in Mäusen wurde ein murinisierte monoklonaler anti-CD20 Antikörper (im humanen Gebrauch: Rituximab; als RTX abgekürzt) intraperitoneal appliziert. Dies erlaubte, das zuvor untersuchte AdHBV-Mausmodell mit gleichzeitiger T_{REG}-Depletion weiterhin anzuwenden. Um eine effektive B Zell-Depletion über den gesamten Zeitraum der Analyse zu gewährleisten, wurde RTX an Tag 10 und Tag 20 nach AdHBV-Infektion injiziert (Applikationsschema nach persönlicher Kommunikation mit Prof. Dr. Mathias Heikenwälder, TU München; **Abb. 4-24**). Zur Bestimmung der Effizienz der B Zell-Depletion während einer AdHBV-Infektion wurden Blutzellen 4 Tage nach erster RTX-Applikation, also an Tag 14 nach AdHBV-Infektion, aufgereinigt und verbleibende CD19⁺ bzw. B220⁺/CD45⁺ B Zellen quantifiziert. Mittels FACS-basierter Analyse konnte eine signifikante Reduktion sowohl CD19⁺ als auch

B220⁺/CD45R⁺ B Zellen in allen Kontrollgruppen gegenüber naiven unbehandelten C57BL/6 Mäusen detektiert werden (**Abb. 4-20**).

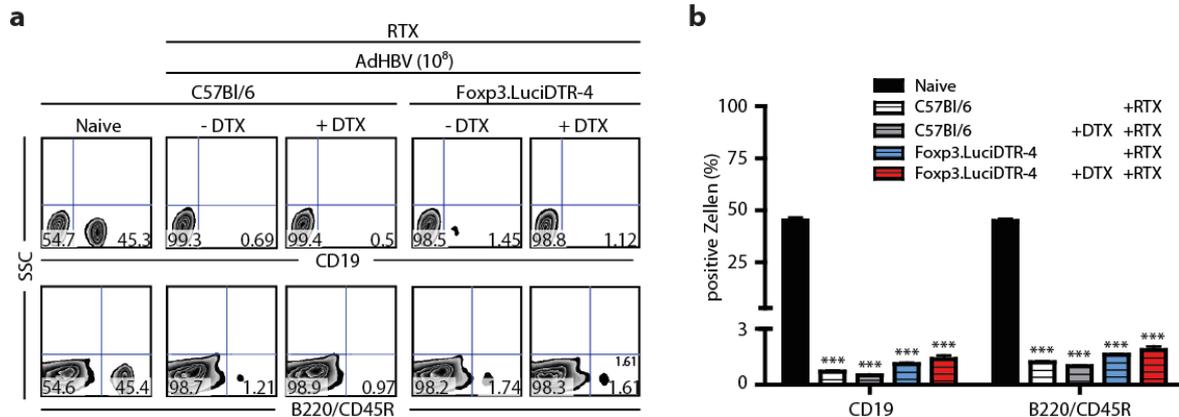


Abbildung 4-20 RTX-Applikation führt zu einer *in vivo* Depletion von B Zellen.

C57BL/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10⁸ iu AdHBV infiziert und an Tag 10 nach Infektion mit RTX (250µg) injiziert. **(a)** FACS-basierte Analyse CD19⁺ oder B220⁺/CD45R⁺ B Zellen an Tag 14 nach Infektion. **(b)** Quantitative Bestimmung vorhandener B Zellen von gesamter Anzahl lebender Zellen im Blut. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=4 Tieren pro Gruppe. ***P< 0.001 (Student's *t*-Test).

Da mittels RTX-Applikation eine effiziente *in vivo* B Zell-Depletion erzielt werden kann, wurden im Folgenden Mäuse mit AdHBV-infiziert und mit RTX wie auch DTX appliziert. In allen Versuchsgruppen führte eine B Zell-Depletion zu keinem Anstieg der ALT-Aktivität (**Abb. 4-21a**), so dass abgeleitet werden kann, dass eine B Zell-Depletion keinen weiteren Leberschaden induziert. Der zeitkinetische Verlauf viraler Serumparameter konnte in T_{REG}- und zusätzlich B Zell-depletierten Mäusen keine Neutralisierung des HBsAg im Serum zeigen (**Abb. 4-21b**), wie auch in allen anderen B Zell-depletierten Versuchsgruppen. Weiterhin wurde eine stabile Expression des HBeAg über 28 Tage in allen Versuchsgruppen gemessen (**Abb. 4-21c**).

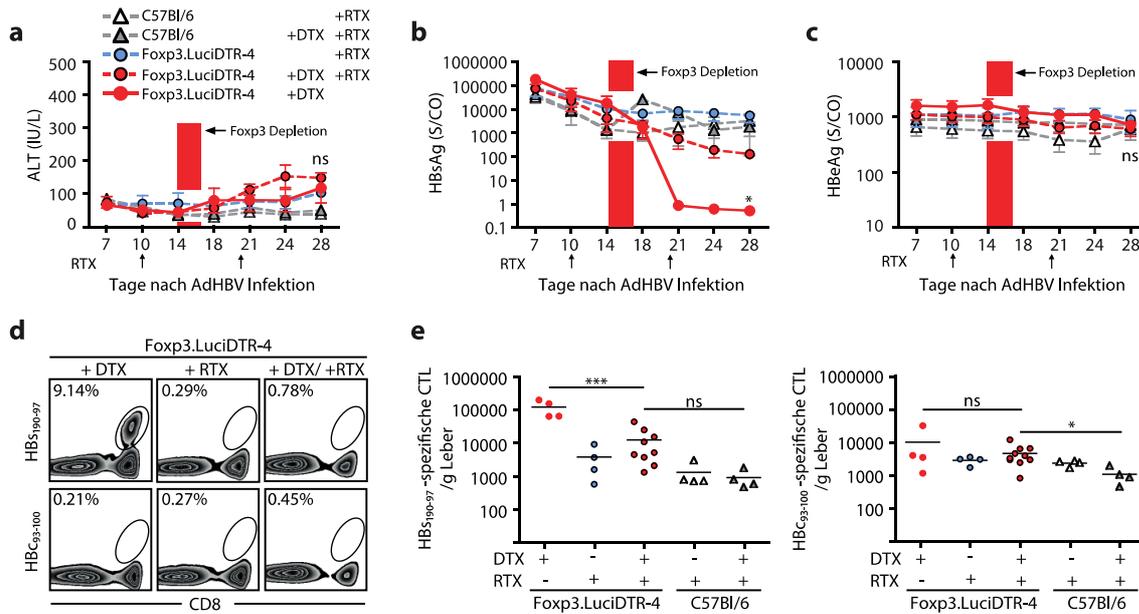


Abbildung 4-21 B Zell-Depletion verhindert HBs-spezifische Immunität.

C57Bl/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert und an Tag 10 und 20 RTX-appliziert, \pm DTX-Applikation ab Tag 14. Der rote Balken entspricht der Depletion Foxp3⁺ Zellen. Zeitkinetischer Verlauf der Serum (a) ALT-, (b) HBsAg- und (c) HBeAg-Werte. (d) FACS-basierte Analyse HBV-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe HBs₁₉₀₋₉₇- oder HBC₉₃₋₁₀₀-spezifischer Dextramere an Tag 28 nach Infektion. (e) Quantitative Bestimmung der HBV-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=4 Tieren pro Gruppe. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (Student's *t*-Test).

Als Nächstes wurden immunhistochemische Analysen des Lebergewebes an Tag 28 nach später T_{REG}-Depletion und einhergehender B Zell-Depletion durchgeführt. Unterstützt durch die fehlende Expansion HBs-spezifischer CTL in T_{REG}-depletierten Mäusen nach zusätzlicher B Zell-Depletion, konnte damit einhergehend weder eine Reduktion HBsAg⁺ noch HBeAg⁺ Hepatozyten gemessen werden (Abb. 4-22a,b). Die Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten in T_{REG}-depletierten Mäusen schien somit durch die zusätzliche Depletion der B Zellen inhibiert zu werden. Dies spiegelt sich auch in der Quantifizierung apoptotischer ClCasp3⁺ Hepatozyten wider, da eine zusätzliche B Zell-Depletion zu einer Reduktion der Apoptoserate führt (Abb. 4-22c,d). Damit einhergehend kann eine reduzierte hepatische Proliferationsrate (Ki67⁺) verzeichnet werden. Bezüglich der Infiltration des Lebergewebes von MHC-II⁺ APC und CD3⁺ Lymphozyten konnte nach zusätzlicher B Zell-Depletion eine geringe jedoch nicht signifikante Reduktion beider Immunzellpopulationen verzeichnet werden.

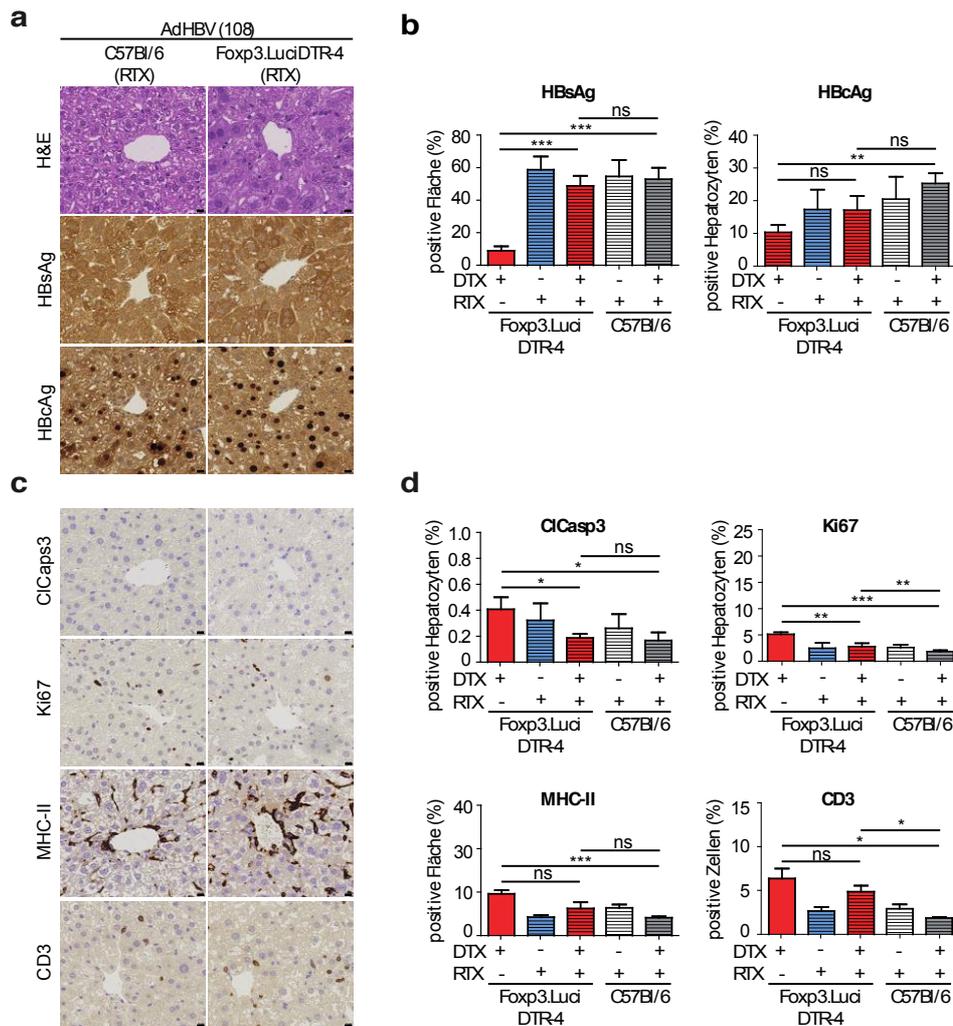


Abbildung 4-22 B Zell-Depletion reduziert virale Hepatitis nach T_{REG}-Depletion und AdHBV-Infektion. C57BL/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10⁸ iu AdHBV infiziert und an Tag 10 und 20 RTX-appliziert, ± DTX-Applikation ab Tag 14. Immunhistochemische Färbung **(a)** HBV-spezifischer und **(c)** ClCasp⁺, Ki67⁺, MHC-II⁺ oder CD3⁺ Zellen auf Paraffin-konserviertem Lebergewebe. Die Maßbalken entsprechen 10µm. **(b,d)** Quantifizierung positiver Hepatozyten, Zellen oder Fläche von (a,c). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=4 Tieren pro Gruppe. *P< 0.05; **P< 0.01 (Student's t-Test). Die Aufbereitung des Lebergewebes und Durchführung der immunhistochemischen Analyse in **Abb. 4-22a-d** wurde unter der Leitung von Dr. Marc Ringelhan in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Heikenwälder an der TU München durchgeführt.

Zusammenfassend kann mit Hilfe der spezifischen *in vivo* B Zell-Depletion eine immunstimulierende Rolle von B Zellen im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion festgestellt werden. Bei der spezifischen Ablation dieser Zellpopulation wird eine Neutralisierung der HBsAg-Werte und die Expansion HBs-spezifischer CTL nach T_{REG}-Depletion unterbunden. Somit lässt sich eine Rolle der B Zellen in der Vermittlung einer HBs-spezifischen Immunität vermuten. Jedoch konnte nicht geklärt werden, ob B Zellen direkt für die Kreuzpräsentation von HBsAg an CD8⁺ T Zellen verantwortlich sind oder es zu

einer verbesserten Kreuzpräsentation von HBsAg durch DC kommt. Für letzteres könnte die Komplexierung von HBsAg mit anti-HBs Antikörper von Bedeutung sein.

4.5 AdHBV-Infektion inhibiert die weitere Expansion HBV-spezifischer CTL

Als Nächstes sollte die Auswirkung einer persistent manifestierten HBV-Infektion auf die Etablierung einer robusten CTL-Antwort gegen eine zusätzliche bakterielle oder virale Infektion untersucht werden. Um dies näher zu charakterisieren wurden AdHBV-infizierte Mäuse an Tag 14 mit einem OVA-transgenen Stamm des intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes* (*Lm*-OVA) oder dem *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* (LCMV) superinfiziert. Um zusätzlich die Relevanz der T_{REG}-Zellen zu untersuchen wurden neben AdHBV-infizierten C57BL/6 auch AdHBV-infizierte und T_{REG}-depletierte Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse integriert. Als Kontrollgruppe einer regulär verlaufenden *Lm*-OVA oder LCMV-Infektion dienen naive C57BL/6 Mäuse ohne vorherige AdHBV-Infektion. Die Analyse der CTL-Antwort erfolgte nach weiteren 7 Tagen nach *Lm*-Ova (Tag 21 nach AdHBV) bzw. 8 Tagen nach LCMV-Infektion (Tag 22 nach AdHBV). Dafür wurden LAL isoliert und mit Hilfe OVA- bzw. gp33-spezifischer Dextramere markiert und mittels FACS-basierter Analyse untersucht. Es konnte sowohl eine robuste *Lm*-OVA- (**Abb. 4-23a,b**) als auch LCMV-spezifische CTL-Antwort (**Abb. 4-23c,d**) nach Superinfektion in AdHBV-infizierten Mäusen in Leber und Milz induziert werden, welche quantitativ mit der CTL-Antwort der Kontrollgruppen vergleichbar ist.

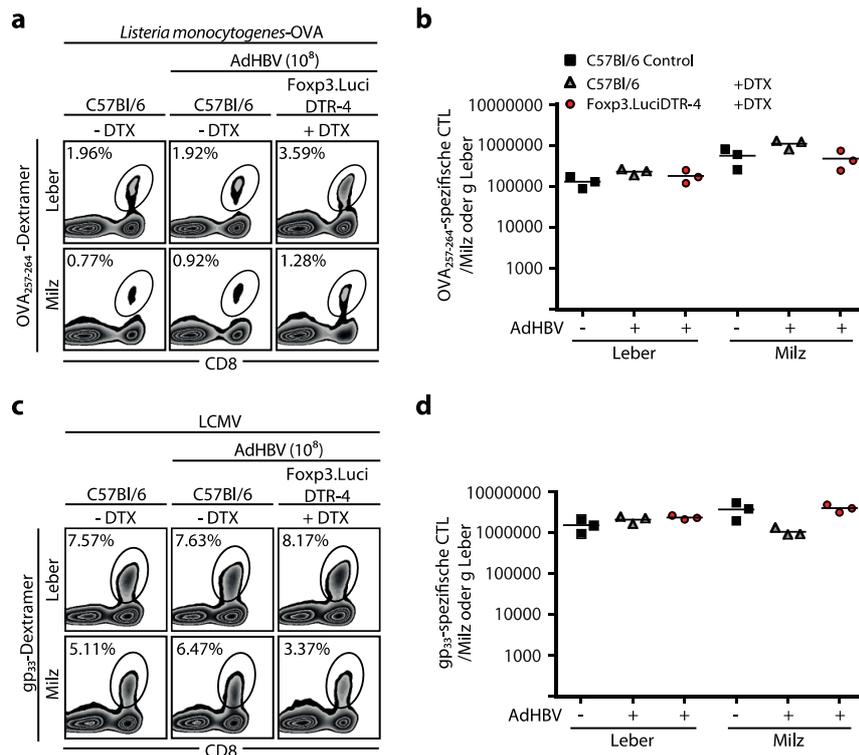


Abbildung 4-23 *Lm*-OVA- oder LCMV-Superinfektion induziert Expansion spezifischer CTL nach AdHBV-Infektion. C57BL/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert, \pm DTX-Applikation ab Tag 14. An Tag 14 wurde mit *Lm*-OVA (2×10^4 pfu) oder LCMV (2×10^4 iu) superinfiziert. Als Kontrollgruppe wurden naive C57BL/6 Mäuse mit *Lm*-OVA oder LCMV infiziert. **(a)** FACS-basierte Analyse OVA-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer Dextramere an Tag 7 nach *Lm*-OVA-Infektion (Tag 21 nach AdHBV). **(b)** Quantitative Bestimmung der OVA-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe. **(c)** FACS-basierte Analyse gp33-spezifischer H-2D^b-restringierter CD8⁺ T Zellen mit Hilfe gp₃₃₋₄₁-spezifischer Dextramere an Tag 8 nach LCMV-Infektion (Tag 22 nach AdHBV). **(d)** Quantitative Bestimmung der gp33-spezifischen CTL-Antwort pro Gramm Lebergewebe. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=3 Tieren pro Gruppe.

Eine Superinfektion nach AdHBV-Infektion mit *Lm*-OVA oder LCMV konnte somit zeigen, dass die Expansion einer Pathogen-spezifischen CTL-Antwort durchaus in diesen Mäusen induzierbar ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass nicht das *priming* HBV-spezifischer T Zellen inhibiert wird, sondern die Inhibierung der CTL-Proliferation das Ziel der HBV-vermittelten Immuntoleranz ist. Dadurch dass es zu einer robusten Immunantwort gegen *Lm*-OVA oder LCMV nach AdHBV-Infektion kommt, zeigt sich weiterhin, dass der zugrunde liegende Regulationsmechanismus zur Inhibierung einer HBV-Immunität spezifisch für HBV ist und nicht die adaptive Immunantwort gegen *Lm*-OVA oder LCMV reguliert.

4.6 Mechanismen zur Expansion einer HBc-spezifischen CTL-Antwort

Mit der Klärung einer HBV-Infektion geht immer eine robuste HBc-spezifische Immunität mit einher. Da bisher weder T_{REG} Zellen noch B Zellen für die HBc-spezifische Toleranzinduktion verantwortlich scheinen, stellte sich nun die Frage ob es externe Stimuli gibt, welche eine Immunität gegen HBV induzieren können.

4.6.1 DNA-Vakzinierung und induzierter Zelltod können keine HBc-spezifische Toleranz brechen

Da die bisher gezeigten Experimente zu der Annahme führen, dass eine Inhibierung der Expansion der HBV-spezifischen CTL wahrscheinlich ist, wurde in folgenden Experimenten versucht mit Hilfe verschiedener inflammatorischer Stimuli eine zusätzliche Entzündungsreaktion zu induzieren. Diese sollte zu der Expansion klärender HBc-spezifischer CTL führen.

Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurden zunächst Liganden der Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) 3 (poly I:C), TLR4 (LPS) oder TLR9 (CpG) auf den Verlauf einer AdHBV-Infektion in T_{REG}-depletierten als auch wildtypischen Mäusen untersucht. Dafür wurden Mäuse mit den genannten Liganden an Tag 1 und Tag 3 nach T_{REG}-Depletion (Tag 15 und 17 nach AdHBV) mittels intravenöser Applikation behandelt (**Abb. 4-24**).

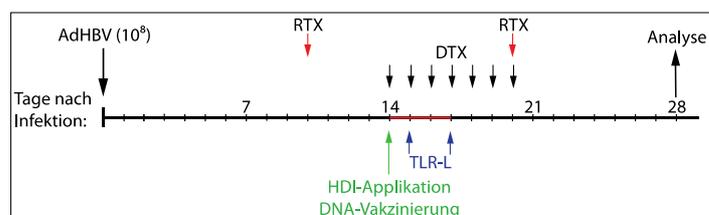


Abbildung 4-24 Applikationsschema externer Stimuli.

C57BL/6 und Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden an Tag 0 mit 10^8 iu AdHBV infiziert. Zur T_{REG}-Depletion oder Kontrollapplikation wurde den Mäusen ab Tag 14 nach AdHBV-Infektion täglich intraperitoneal DTX (15ng/g Körpergewicht) injiziert. Der rote Balken entspricht der effektiven Depletion der T_{REG} Zellen in der Maus.

Im Vergleich zu AdHBV-infizierten Mäusen ohne zusätzlichen TLR-Stimulus können keine signifikanten Unterschiede in der HBs-spezifischen Immunantwort erreicht werden (**Abb. 4-25a**). Überraschenderweise fällt die HBs-spezifische CTL-Antwort nach TLR-Stimulus leicht jedoch nicht signifikant geringer aus. Eine klärende HBc-spezifische CTL-Antwort kann weder in C57BL/6 noch in T_{REG}-depletierten Mäusen durch TLR-Stimulation induziert werden (**Abb.**

4-25a). In T_{REG} -depletierten Mäusen mit zusätzlicher TLR9- oder TLR3-Stimulation zeigt sich sogar eine signifikante Reduktion Hbc-spezifischer CTL.

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob eine zusätzliche Vakzinierung von sowohl HBs- als auch Hbc-DNA einen Einfluss auf die Expansion HBV-spezifischer CTL nach AdHBV-Infektion hat. Wie schon in **Abb. 4-12d** gezeigt wurde, induziert eine HBs- oder Hbc-Vakzinierung mittels *in vivo* Elektroporation die Expansion HBs- bzw. Hbc-spezifischer $CD8^+$ T Zellen in naiven C57BL/6 Mäusen. Im Folgenden wurden AdHBV-infizierte Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse ab Tag 14 T_{REG} -depletiert und zeitgleich mit HBs- und Hbc-DNA vakziniert (**Abb. 4-24**). Im Vergleich zu der T_{REG} -depletierten und AdHBV-infizierten jedoch nicht vakzinierten Kontrollgruppe kann weder eine erhöhte Rate HBs-spezifischer noch eine Expansion Hbc-spezifischer CTL nachgewiesen werden (**Abb. 4-25b**). Dies demonstriert, dass in AdHBV-infizierten Mäusen eine Expansion HBV-spezifischer CTL nicht durch eine DNA-Vakzinierung HBV-spezifischer Antigene induziert werden kann.

Da eine akute HBV-Infektion mittels hydrodynamischer Injektion sowohl zu einer robusten Expansion HBs- als auch Hbc-spezifischer CTL führt (**Abb. 4-3a**), wurde als Nächstes die Rolle des HDI-induzierten Zelltods und daraus resultierenden Leberschadens (**Abb. 4-1a**) als weiterer Immunstimulus zur Induktion einer Hbc-spezifischen CTL-Antwort abschließend untersucht. Dafür wurden AdHBV-infizierte Mäuse ab Tag 14 T_{REG} -depletiert und zusätzlich hydrodynamisch injiziert (**Abb. 4-24**). Als Kontrollgruppen wurde neben der HBV-HDI, jene DNA hydrodynamisch injiziert, welche ein für HBV nicht relevantes Protein kodiert (Ovalbumin; OVA-HDI) oder nur PBS (PBS-HDI). Bei der Applikation von PBS-HDI sollte neben dem induzierten Leberschaden eine mögliche Beteiligung von DNA als zusätzlicher Immunstimulus untersucht werden.

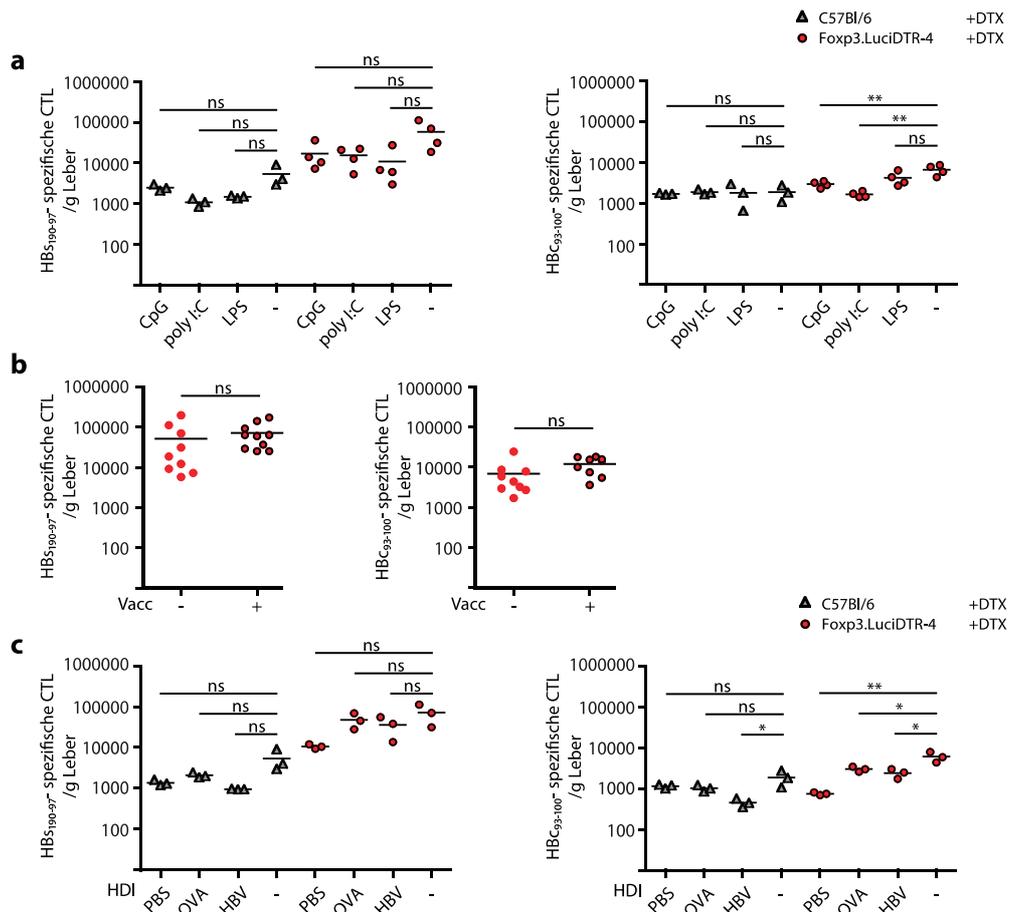


Abbildung 4-25 Immunmodulierende Stimuli können HBc-spezifische Toleranz nicht brechen.

C57BL/6 oder Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse wurden mit 10^8 iu AdHBV infiziert, \pm DTX-Applikation ab Tag 14. Quantifizierung positiver Zellen pro Gramm Lebergewebe nach FACS-basierter Analyse HBV-spezifischer H-2K^b-restringierter CD8⁺ T Zellen an Tag 28 nach Infektion. **(a)** Mäuse wurden an Tag 15 und 17 nach AdHBV-Infektion mit TLR-Liganden stimuliert: 10 μ g poly I:C (TLR3), 1 μ g LPS (TLR4) und 10 μ g CpG (TLR9). **(b)** Mäuse wurden an Tag 14 nach AdHBV mit HBs- und HBc-DNA vakziniert. **(c)** HDI-Applikation des pENTRY-HBV1.3 (HBV) oder pCI-OVA Plasmides (OVA) oder nur PBS (PBS), an Tag 14 nach AdHBV. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit n=3 Tieren pro Gruppe. * P < 0.05; *** P < 0.001 (Student's t -Test).

Bei allen HDI-applizierten Gruppen konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne zusätzliche hydrodynamische Injektion weder eine weitere Expansion HBs-spezifischer noch eine Induktion HBc-spezifischer CTL nachgewiesen werden (**Abb. 4-25c**). Wie man im vorherigen Vergleich zur TLR-Stimulation (**Abb. 4-25a**) erkennen kann, kommt es auch nach HDI-Applikation zu einer leichten quantitativen Reduktion der HBc-spezifischen CTL.

Insgesamt liefern diese Daten die Erkenntnis, dass eine zusätzliche Immunstimulation durch TLR-Aktivierung (**Abb. 4-25a**), DNA-Vakzinierung (**Abb. 4-25b**) oder induzierten Zelltod (**Abb. 4-25c**) keine weitere Expansion HBc-spezifischer CTL im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion in Mäusen induzieren kann. Dadurch gelingt es weiterhin nicht die HBc-spezifische Toleranz zu brechen und die Infektion zu klären.

5 Diskussion

Eine Neuinfektion mit HBV im adulten Menschen manifestiert sich in etwa 10% und nach vertikaler Infektion (perinatal, Mutter auf Kind) in bis zu 90% der Fälle als eine chronische HBV-Infektion, welche mit einer unzureichenden antiviralen HBV-spezifischen T Zell-Antwort einhergeht. Die Mechanismen der Immuntoleranz durch welche HBV persistieren kann sind noch unzureichend geklärt und stellen eine zentrale Frage in der immunologischen Forschung dar. Chronische HBV-infizierte Patienten generieren nur eine geringe Anzahl oligoklonaler HBV-spezifischer T Zellen, welche nicht in der Lage sind zu einer ausreichenden Immunantwort gegen das Virus zu führen und folglich keine selbst-regulierte Klärung der Infektion induzieren. Jedoch kommt es in diesen Patienten zu einer undulierenden Immunantwort gegen HBV-infizierte Hepatozyten mit einhergehendem Zelluntergang und dem klinischen Bild der chronischen Hepatitis B Infektion.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine abhängige Interaktion von mindestens zwei verschiedenen Zellpopulationen demonstriert werden, welche zu der Etablierung einer partiellen Immuntoleranz im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion in der Maus führt: Regulatorische T Zellen (T_{REG} Zellen) supprimieren die humorale Immunantwort HBV-spezifischer B Zellen und unterdrücken somit speziell eine HBs-spezifische Immunität, welche nach Depletion von T_{REG} Zellen induziert werden konnte.

5.1 Niedrig-dosierte AdHBV-Infektion führt zur Toleranzinduktion HBV-spezifischer Antigene

Wie bereits beschrieben, kann neben HBV-transgenen Mäusen auch mit Hilfe der hydrodynamischen Injektion (Liu et al. 1995; Yang et al. 2002) oder auch mittels eines adenoviralen Gentransfers (Dong et al. 2010; von Freyend et al. 2011; Sprinzl et al. 2001) das HBV-Genom über die Speziesbarriere hinweg vom Menschen in die Maus ermöglicht werden. Im Gegensatz zu den beiden letzteren Modellen, etablieren HBV-transgene Mäuse von Geburt an immer eine zentrale Immuntoleranz, so dass sich eine Analyse einer im adulten Stadium zugezogenen Erst-Infektion mit HBV nicht untersuchen lässt. Dennoch kommt es in allen HBV-Mausmodellen zu einer fehlenden Re-Infektion von murinen Hepatozyten durch infektiöse HBV-Virione aufgrund fehlender Oberflächenstrukturen. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine niedrig-dosierte

AdHBV-Infektion in wildtypischen C57BL/6 Mäusen zu der Etablierung einer persistenten HBV-Infektion führt, welche eine Toleranz gegenüber sowohl HBs- als auch HBc-spezifischer Antigene aufweist. Diese Toleranz wird durch die Abwesenheit einer robusten effektiven und antiviralen CTL-Antwort gemessen. AdHBV-infizierte Mäuse sind in der Lage sowohl HBeAg, welches zusammen mit dem Nachweis von HBV-DNA als repräsentativer Marker für die aktive Replikation von HBV gilt (Govindarajan et al. 1988), als auch HBsAg konstant über einen langen Zeitraum von etwa 3 Monaten ins Serum zu sekretieren. Somit repräsentiert dieses ein Modellsystem der HBeAg-positiven chronischen Hepatitis B Infektion im Menschen. Im Wirt kommt es zu einer kontinuierlichen homöostatischen Apoptose und Proliferation von Hepatozyten so dass demzufolge nach sowohl infizierte als auch nicht infizierte Zellen regelmäßig abgebaut werden. Dies lässt die leichte jedoch graduelle Reduktion der viralen Serumparameter bei fehlender Re-Infektion von Hepatozyten in diesem Modell erklären. Zusätzlich kommt es in der Maus zu keiner *de novo* Infektion mit infektiösen HBV-Virionen, so dass die abfallenden Antigenwerte über die Zeit nicht durch eine vermehrte Antigenproduktion neu infizierter Hepatozyten kompensiert werden können. Das Fehlen einer *de novo* Infektion muriner Hepatozyten mit HBV lässt sich damit erklären, dass der transmembrane Transporter NTCP in Mäusen nicht exprimiert wird, welcher essentiell für die Bindung und Aufnahme der HBV Kern-Partikel ist (Yan et al. 2012). Für die Manifestierung einer persistenten AdHBV-Infektion ist die applizierte Virusdosis von großer Bedeutung. In der Arbeitsgruppe von Frau Professorin Ulrike Protzer an der TU München konnte mehrfach beschrieben werden, dass eine hohe Virusdosis von 1×10^9 iu AdHBV zu einer akuten selbst-regulierenden HBV-Infektion in immunkompetenten Mäusen führt (von Freyend et al. 2011; Stross et al. 2012). Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass es im Gegensatz zu einer persistenten AdHBV-Infektion aufgrund der 10-fach höheren applizierten Virusdosis (10^9 iu) zu einer signifikant erhöhten Anzahl infizierter Hepatozyten kommt. Diese würden eine quantitativ erhöhte Expression präsentierter HBV-spezifischer Peptide über MHC-I-Moleküle induzieren, welches die Wahrscheinlichkeit steigert, dass $CD8^+$ Lymphozyten ihr geeignetes Peptid finden, erkennen und zu Effektor-T Zellen differenzieren. Dadurch käme es folglich zu einer Expansion HBV-spezifischer CTL und zu der Generierung einer robusten Immunantwort zur weiteren Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten aus dem Wirt.

In Bezug auf eine HBV-Infektion mittels HDI bestimmt die Art der Applikation die Stärke der Immunantwort, welches durch das applizierte Volumen, die DNA-Menge und Zeit der HDI-Applikation variiert wird (Liu et al. 1995). Interessanterweise konnten Millich und Kollegen zeigen, dass der MHC-Haplotyp der Mäuse die wirtseigene Immunantwort gegen HBV-spezifische Antigene auf sowohl der humoralen als auch adaptiven zellulären Immunantwort beeinflussen. Es wurden der Haplotyp H-2K^d von BALB/c und der Haplotyp H-2K^b von C57BL/6 Mäusen untersucht, welche entweder mit einem Lentiviralen Transfer-Vektor pCS-HBV1.3 (Chuai et al. 2014) oder dem Adeno-assoziiertem Virus (AAV)- Vektor pAAV/HBV1.2 (Huang et al. 2006) mittels HDI infiziert wurden. In beiden Arbeitsgruppen konnte eine akute HBV-Infektion in BALB/c Mäusen induziert werden, welche sowohl einen initialen Anstieg der HBV-spezifischen Serumparameter als auch einer Klärung dieser innerhalb einer Woche nach Infektion verzeichneten mit einhergehender Produktion von anti-HBs Antikörpern. In C57BL/6 Mäusen hingegen resultierten die HDI-Infektionen beider Vektoren in einer persistenten HBV-Infektion mit einer Toleranzinduktion HBV-spezifischer Antigene. Eine Erklärung für die persistente Infektion mittels AAV-Vektoren liegt möglicherweise in der AAV-vermittelten Expression des Apolipoprotein E Locus, welches der wirtseigenen hepatischen Regulation unterliegt und sowohl eine dauerhafte als auch hohe Expression des inserierten Transgens (hier: das HBV-Genom) in der Leber induziert (Miao et al. 2001). Andererseits können im DNA-Vektor bisher unbekannt nicht-translatierte regulatorische Sequenzen einen entscheidenden Einfluss auf die dauerhafte Expression und Erhaltung der applizierten (HBV-) DNA haben (Huang et al. 2006), welches jedoch weiterer Untersuchungen bedarf. Fehlen diese möglichen nicht-translatierten regulatorischen Sequenzen, so kann eine langfristige und hohe Expression des Vektors unter Umständen nicht gewährleistet werden. Darüber hinaus mögen einige DNA-Vektoren sogar negativ-regulatorische Sequenzen aufweisen, welche die Expression des HBV-Transgens inhibierend beeinflussen könnten.

In dieser vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des pENTRY-HBV1.3 Vektors im Gegensatz zu den vorherigen genannten HBV-HDI Infektionen eine akute HBV-Infektion in C57BL/6 Mäusen induziert werden (Huang & Gäbel et al. 2012). Diese Infektion zeigt eine anfängliche Induktion sowohl der HBsAg- als auch HBeAg-Werte im Serum, welche jedoch nach 2 bzw. 3 Wochen nach Infektion unter der Nachweisgrenze lagen. Es konnte zudem eine Serokonversion mit der Produktion von neutralisierenden anti-HBs Antikörpern

nachgewiesen werden, welche in der Lage sind Immunkomplexe mit HBsAg-Molekülen zu bilden und somit eine Neutralisierung des HBsAg aus dem Serum induzieren. Durch die Bildung von Immunkomplexen wird sowohl eine DC-Reifung als auch eine verbesserte Kreuzpräsentation mit einhergehender Generation einer CTL-Antwort induziert (Regnault et al. 1999) und zeigt eine Ausheilung der HBV-Infektion mit nachbestehender Immunität an. Sehr selten kommt es hierbei zu einer okkulten chronischen HBV-Infektion, welche durch Mutationen der Oberflächenproteine von HBV induziert wird. Weiterhin konnte schon früh beschrieben werden, dass die Produktion von anti-HBs Antikörpern eine höhere Wahrscheinlichkeit eines selbst-regulierenden akuten Infektionsverlaufes im Patienten repräsentiert (Madaliński and Bragieli 1979). Eine neuere Studie zeigt zudem, dass die Bildung von HBsAg:anti-HBs Immunkomplexen in chronischen HBeAg-positiven HBV-Patienten nach antiviraler Interferon- und Adefovir-Therapie in positiver Korrelation mit dem wahrscheinlichen Abfall der HBeAg-Werte in Zusammenhang stehen (de Niet et al. 2014). Neben den Serumparametern konnte in HBV-HDI infizierten Mäusen auch die funktionale Eliminierung von HBeAg⁺ Hepatozyten durch die Expansion von HBs- und HBc-spezifischen CTL gezeigt werden. Dies beruht auf den antiviralen Effektorfunktionen der HBV-spezifischen CTL, welche die Perforin/Granzym-vermittelte Eliminierung von infizierten Hepatozyten ausführen (Thimme et al. 2003). Weiterhin besitzen HBV-spezifische CTL im Kontext einer akuten HBV-HDI Infektion sowohl die Kapazität proinflammatorische Zytokine, wie Interferone mit direkter antiviraler Funktion (Vincent et al. 2011) zu produzieren als auch eine zytotoxische Effektorfunktion mit gerichteter Eliminierung HBs- und HBc-spezifischer Immunzellen *in vivo* (*in vivo* Zytotoxizitätstest). HBV repliziert ausschließlich in Hepatozyten, welche folglich in der Lage sind HBV-spezifische Peptide über MHC-I-Moleküle zu präsentieren. Diese werden von CD8⁺ T Zellen erkannt und eliminieren HBV-infizierte Hepatozyten.

Für die effektive Ausübung dieser antiviralen Effektorfunktionen benötigt es einer Aktivierung Peptid-spezifischer CD8⁺ T Zellen und folglich einer Expansion dieser Zellen. Für die Präsentation aus der Peripherie exogen aufgenommener viraler aber auch körpereigener Antigene an CD8⁺ T Zellen, bedienen sich die APC am Mechanismus der Kreuzpräsentation (Bevan 1976; Sigal et al. 1999). In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expansion von HBV-spezifischen CTL in akut HBV-HDI infizierten Mäusen essentiell vom Mechanismus der Kreuzpräsentation Batf3⁺ DC abhängig ist.

Daraus lässt sich schließen, dass Batf3⁺ DC in der Lage sind, virale Antigene aus der Peripherie mittels Endo- oder Makropinocytose aufzunehmen und die prozessierten Peptide über MHC-I-Moleküle an CD8⁺ T Zellen zu präsentieren, welche folglich zu Effektorzellen (CTL) differenzieren.

Zusammenfassend kann einerseits die Etablierung einer HBV-Infektion mittels hydrodynamischer Transfektion mit folgender Aktivierung einer HBV-spezifischen Immunität im Mausmodell erreicht werden, welche in einem akuten und selbst-regulierten Infektionsverlauf mündet und geklärt wird. Andererseits kann eine persistente Infektion mittels niedrig-dosierter AdHBV-Infektion von 1×10^8 iu etabliert werden bei der klärende Immunantworten vollständig unterdrückt werden. Es kommt folglich zu einer Immuntoleranz HBV-spezifischer Antigene und stellt somit ein Modellsystem der chronischen HBV-Infektion im Menschen dar.

5.2 T_{REG} Zellen vermitteln eine HBs-spezifische Toleranzinduktion

Regulatorische T Zellen üben je nach anatomischer Lage im Organismus eine spezifische Funktion aus. In lymphoiden Geweben, wie Lymphknoten oder Milz, verhindern T_{REG} Zellen die Generierung Antigen-spezifischer Immunantworten und spielen so auch eine wichtige Rolle bei der Inhibition von Autoimmunität. Dies passiert z.B. durch die direkte Inhibition der T Zellen während ihrer Differenzierung oder durch die Zerstörung von B Zellen nach deren Antigen-Präsentation. T_{REG} Zellen verweilen jedoch nicht nur in lymphoiden Geweben, sondern wandern auch in peripheres Gewebe aus. Dort akkumulieren T_{REG} Zellen vor allem an Entzündungsherden, wo sie ihre regulatorischen Kapazitäten ausüben. Diese produzieren immunregulierende Zytokine, wie IL-10 und TGFβ, und konsumieren große Mengen an IL-2, so dass eine T Zell-gerichtete Immunreaktion stark inhibiert wird.

Die Relevanz von T_{REG} Zellen wurde schon im Kontext einer akuten HBV-Infektion untersucht (Stross et al. 2012). Dort konnte gezeigt werden, dass T_{REG} Zellen das Einwandern von Makrophagen und DC in die Leber zeitlich verzögern und somit eine protektive Eigenschaft zur Inhibition eines überschießenden Leberschadens ausüben. Bei einer Depletion von T_{REG} Zellen im Kontext einer akuten HBV-Infektion konnten verbesserte antivirale Effektorfunktionen von T Zellen beobachtet werden, welche jedoch einen stark erhöhten Leberschaden induzierten.

Zur Klärung der Frage, welche Rolle T_{REG} Zellen im Kontext einer persistenten HBV-Infektion übernehmen, wurde das persistente AdHBV-Infektionsmodell (1×10^8 iu) in transgenen Foxp3.LuciDTR-4 Mäusen verwendet, welche einen genetischen Hintergrund von C57BL/6 Mäusen (H-2K^b) besitzen. In Foxp3.LuciDTR-4 Mäusen kann eine spezifische jedoch nur transiente T_{REG}-Depletion über einen Zeitraum von 3 Tagen mittels täglicher DTX-Applikation erzielt werden. Der Grund einer zeitlich begrenzten T_{REG}-Depletion liegt darin, dass die nicht transgene Foxp3⁺ T_{REG}-Population eine starke kompensatorische Proliferation durchläuft und somit die vorherige T_{REG}-Depletion rasch wieder ausgleicht. Diese kompensatorische Proliferation konnte auch in anderen transgenen Mausmodellen einer Foxp3-Depletion beobachtet werden (Nyström et al. 2014). Weiterhin ist zu beachten, dass eine erneute T_{REG}-Depletion mittels DTX-Applikation in schon zuvor DTX-applizierten Mäusen nicht möglich ist, da sich neutralisierende anti-DTX Antikörper bilden (Persönliche Kommunikation mit Herrn Professor Natalio Garbi, IEI Bonn). T_{REG} Zellen werden beschrieben, Autoimmun- und überschießende Entzündungsreaktionen supprimieren zu können (Littman and Rudensky 2010). Kommt es jedoch zu einer stark reduzierten Anzahl Foxp3⁺ T_{REG} Zellen durch z.B. Genmutationen im Foxp3-Gen in der Maus und im Menschen, so induziert dies diverse Autoimmunreaktionen. In Foxp3.LuciDTR-4 Mäusen kann jedoch zu keinem Zeitpunkt nach dieser transienten DTX-vermittelten T_{REG}-Depletion eine signifikante geschädigte Gewebeintegrität anderer Organe (Niere, Lunge) aber auch keine anhaltende Schädigung des Leberparenchyms nachgewiesen werden. Somit ermöglicht der Gebrauch transgener Foxp3.LuciDTR-4 Mäuse die Untersuchung einer möglichen Rolle von T_{REG} Zellen in einer persistenten HBV-Infektion ohne den Kontext einer signifikanten Entzündungsreaktion oder der Entstehung einer Autoimmun-Hepatitis.

Wie die Daten der vorliegenden Arbeit demonstrieren, kann den T_{REG} Zellen eine essentielle Rolle in der Inhibierung einer HBs-spezifischen Immunität gegen HBV zugeordnet werden. Nach einer T_{REG}-Depletion wird die Toleranz gegen HBs-spezifische Antigene gebrochen und führt zu der Induktion eines Leberschadens. Dieser Verlauf ist vergleichbar mit der akuten AdHBV-Infektion mittels höherer Virusdosis von 10^9 iu (Stross et al. 2012), ohne jedoch die Infektion komplett zu bereinigen. In Abwesenheit von T_{REG} Zellen werden HBs-spezifische CTL generiert, welche in der Lage sind eine signifikante Anzahl infizierter Hepatozyten gezielt durch die Induktion von Apoptose zu eliminieren mit nachfolgender Regeneration des Lebergewebes. Vergleichbar mit der gesteigerten Infiltration von Makrophagen und DC im

akuten AdHBV-Mausmodell (Stross et al. 2012) konnte auch hier zum einen eine erhöhte Infiltration von CD3⁺ Lymphozyten und zum anderen vermehrt MHC-II⁺ APC zur Aufnahme und Kreuzpräsentation HBV-spezifischer Antigene nachgewiesen werden.

Durch die Rekonstitution des T_{REG}-Pools wird der kurzfristig entstandene Leberschaden und viral-induzierte Entzündungsreaktion terminiert und es kann weder eine anhaltende Immunantwort gegen HBV noch eine klärende Immunreaktion aufgrund der T_{REG}-Depletion verzeichnet werden. Nach der ersten zwei-wöchigen, immunologisch aktiven Phase nach T_{REG}-Depletion in der persistenten Phase einer AdHBV-Infektion konnte keine weitere HBV-spezifische Immunität verzeichnet werden. Da es im Infektionsverlauf zu keiner Expansion einer klärenden HBc-spezifischen Immunantwort kommt, führt dies zu einer Persistenz von HBV in einer erneuten Phase der Immuntoleranz.

Kürzlich wurde die Formation von intrahepatischen Aggregaten myeloider Zellen, den iMATEs, und der damit einhergehenden Expansion von Antigen-spezifischen CTL in akuten viralen Infektionen beschrieben (Huang et al. 2013). Die Formation von iMATE-Strukturen benötigt eine TNF-Rezeptor vermittelte Signalinduktion, wobei die darin angesiedelten myeloiden Zellen konstitutiv in der Lage sind TNF zu sekretieren, welches wiederum in einem lokalen positiven Verstärkungskreislauf (*feed-forward loop*) genutzt wird. Obwohl die Formation von iMATE-Strukturen nur in akuten viralen Infektionen beschrieben ist, stellte sich die Frage ob eine partielle HBs-spezifische Immunität nach T_{REG}-Depletion die Formation solcher myeloider Zellaggregate induzieren kann. Ein weiteres Indiz liegt in der signifikant erhöhten Genexpression von TNF in der Leber infizierter und T_{REG}-depletierter Mäuse. Überraschenderweise konnten jedoch keine myeloiden Zellaggregate oder die für iMATE-charakteristische Expression von Ox40L im Lebergewebe nachgewiesen werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine niedrig-dosierte AdHBV-Infektion mit einhergehender HBs-spezifischer Immunität nach T_{REG}-Depletion keine intrahepatischen myeloiden Zellaggregate entstehen lässt und die Expansion der HBs-spezifischen CTL iMATE-unabhängig, also womöglich extrahepatisch induziert wird.

Ein weiterer Mechanismus der Induktion einer partiellen Immunität gegen HBsAg könnte nicht nur von einer alleinigen T_{REG}-Depletion herrühren sondern auch durch eine zusätzlich akkumulierende Immunreaktion gegen das Adenovirus als Vektor induziert werden. Zum Ausschluss einer adenoviralen Entzündungsreaktion als Effektor, wurde die T_{REG}-Depletion

erst ab Tag 14 nach AdHBV-Infektion durchgeführt. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass der zusätzliche Stimulus einer adenoviralen Infektion weder verantwortlich für die Neutralisierung des Serum HBsAg durch anti-HBs Antikörper noch für die Expansion HBs-spezifischer CTL ist. Dies hat somit keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion einer partiellen HBs-spezifischen Immunität. Obwohl ein verstärkter Leberschaden mit erhöhter ALT-Aktivität nach früher T_{REG}-Depletion nachgewiesen werden kann, ist dieser weder essentiell für die hepatische Infiltration HBV-spezifischer Lymphozyten und APC noch als spezifische Immunreaktion gegen HBV-infizierte Hepatozyten. Um einen dennoch möglichen Einfluss des Adenovirus-vermittelten Stimulus auf die Analysen einer HBV-Infektion zu unterbinden, wurden alle weiteren Experimente im Kontext einer später T_{REG}-Depletion ab Tag 14 nach AdHBV-Infektion durchgeführt.

Insgesamt sprechen diese Daten für eine wichtige Rolle von T_{REG} Zellen in der Inhibierung einer antiviralen Immunantwort im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass T_{REG} Zellen speziell die Inhibierung der HBs-spezifischen Immunität kontrollieren und somit eine Persistenz von HBV begünstigen.

Darüber hinaus besteht ein Zusammenspiel anderer Zellpopulationen oder Faktoren, welche für die Inhibierung einer zur Klärung der HBV-Infektion benötigten HBc-spezifischen CTL-Antwort verantwortlich sind. Mit Beschreibung dieser Daten ist eine essentielle Rolle von T_{REG} Zellen in der HBs-spezifischen Immunität demonstriert worden und daraus die zentrale Frage anderer Mechanismen der Immuntoleranz für zukünftige Forschung hervorgegangen.

Somit gibt es eine distinkte und zugleich separate Ebene der Inhibition einer adaptiven Immunantwort gegen HBV-spezifische Antigene: einerseits eine HBs-spezifische und andererseits eine HBc-spezifische Immunität, wobei eine Etablierung beider spezifischer Immunantworten für eine klinische Ausheilung essentiell benötigt werden.

5.3 T_{REG} Zellen unterdrücken B Zellen in der Induktion einer HBs-spezifischen Immunität

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kommt es nach AdHBV-Infektion nur mit gleichzeitiger T_{REG}-Depletion zu der Produktion von anti-HBs Antikörpern und einer daraus folgenden Neutralisierung des freien HBsAg im Serum infizierter Mäuse. Interessanterweise verhindert eine zusätzliche B Zell-Depletion nicht nur die Bildung ausreichender Mengen von

Antikörpern, sondern auch die HBs-spezifische CTL-Antwort in zusätzlich T_{REG}-depletierten Mäusen.

Diese Daten veranlassten weitere Untersuchungen bezüglich einer möglichen Interaktion von B Zellen mit T_{REG} Zellen im Kontext einer persistenten AdHBV-Infektion, da vor allem eine starke inhibitorische Funktion von T_{REG} Zellen auf B Zellen beschrieben ist (Gotot et al. 2012).

B Zellen sind ein wichtiger Teil der humoralen Immunantwort, welche von großer Bedeutung für eine effektive Bekämpfung von Pathogenen ist. B Zellen können nach Erkennung des geeigneten Antigens durch den spezifischen B Zell-Rezeptor (BCR) in Plasmazellen differenzieren und sind danach für die Produktion und Sekretion des Antigen-spezifischen Antikörpers verantwortlich (LeBien and Tedder 2008). Des Weiteren können B Zellen die Funktion einer APC ausüben (Constant 1999; Yan et al. 2005) und mittels Kreuzpräsentation exogene (virale) Peptide an CD8⁺ T Zellen präsentieren und diese folglich aktivieren (Ke and Kapp 1996).

Die Fragestellung der möglichen Beteiligung einer spezifischen Zellpopulation lässt sich zunächst einfach und effizient durch eine Depletion der Zellpopulation beantworten. Mit Blick auf bereits etablierte Methoden in der Behandlung von Patienten, wird das Medikament Rituximab (RTX) systemisch in Patienten appliziert und führt zu einer Depletion von B Zellen. Rituximab ist ein Maus/Human chimärer monoklonaler anti-CD20 Antikörper (Reff et al. 1994) und wird im Patienten vorwiegend in der Krebstherapie von z.B. *Non-Hodgkin*-Lymphomen (Maloney et al. 1997; Redman et al. 2015) aber auch in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie der systemischen *Lupus erythematosus* (Sciascia et al. 2015) oder als Kombinationstherapie mit TNF α -Blocker bei der rheumatoiden Arthritis (Rossi et al. 2015) und anderen Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Sollte Rituximab jedoch in Patienten mit chronischer HBV-Infektion versehentlich angewendet werden, so kommt es häufig zu einer immunaktiven Phase der Hepatitis B Infektion mit stark ausgeprägtem Leberschaden und hoher Viruslast (Civan and Hann 2015).

Zur Analyse der Rolle von B Zellen in Zusammenhang mit einer T_{REG}-Depletion wurde AdHBV-infizierten Mäusen eine murinisierte Version des Rituximab appliziert, welches zu einer effektiven Depletion von B Zellen in der Maus führte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AdHBV-infizierte und T_{REG}-depletierte Mäuse nach Behandlung mit RTX, also ohne die Anwesenheit von B Zellen, nicht mehr in der Lage sind neutralisierende anti-HBs

Antikörper zu produzieren. Dadurch bedingt kann im Serum frei befindliches HBsAg nicht mehr komplexiert werden und HBsAg-Werte bleiben weiterhin positiv nachweisbar. Die allerdings leichte Reduktion der HBsAg-Werte nur in T_{REG}- und zusätzlich B Zell-depletierten Mäusen kann auf eine nicht vollständige systemische B Zell-Depletion mittels der RTX-Applikation zurückgeführt werden. Dadurch bedingt verbleibt ein geringer Anteil an B Zellen im Organismus und kann zu Antikörper-sekretierenden Plasmazellen differenzieren. Diese geringe anti-HBs Antikörpermenge kann nur zu einer leichten Reduktion der HBsAg-Werte und nicht zu einer vollständigen Neutralisierung aus dem Serum führen.

Eine zusätzliche B Zell-Depletion in T_{REG}-depletierten und AdHBV-infizierten Mäusen induziert sowohl die Bildung ausreichender Mengen neutralisierender anti-HBs Antikörper als auch die HBs-spezifische CTL-Antwort. Durch die fehlende Expansion HBs-spezifischer CTL wurde demzufolge weder ein Leberschaden induziert noch eine Infiltration von MHC-II⁺ APC und CD3⁺ Lymphozyten in die Leber beobachtet. Mögliche Erklärungen dafür könnten die folgenden sein:

i) B Zellen können exogene lösliche Antigene als auch immunstimulierende Komplexe aufnehmen und über MHC-II-Moleküle oder kreuzpräsentierend über MHC-I-Moleküle an CD4⁺ bzw. CD8⁺ T Zellen präsentieren (Robson, Donachie, and Mowat 2008), welche einen zusätzlichen TLR9-vermittelten inflammatorischen Stimulus benötigen (Heit et al. 2004). DC zeigen eine verbesserte Kreuzpräsentation und *cross-priming* von CTL wenn nicht das Antigen alleine sondern als Antigen:IgG Immunkomplex aufgenommen wird (León et al. 2014; Regnault et al. 1999), welche dann auch ohne weiteren TLR9-vermittelten Stimulus ausreichend aktiviert werden. Diese Daten lassen möglicherweise auf eine effektivere Kreuzpräsentation seitens der DC und B Zellen durch aufgenommene HBsAg:anti-HBs Immunkomplexe schließen. Durch die fehlende anti-HBs Antikörperproduktion kommt es zu einer verminderten Komplexierung des HBsAg, und somit zu einer unzureichenden Aufnahme der Immunkomplexe durch kreuzpräsentierende APC, welches erklären würde warum eine zusätzliche B Zell-Depletion in AdHBV-infizierten und T_{REG}-depletierten Mäusen zu einer fehlenden HBs-spezifischen CTL-Antwort führt.

ii) In undepletierten Mäusen sind T_{REG} Zellen *in vivo* in der Lage eine PD-1-vermittelte Apoptose in B Zellen einzuleiten und diese somit zu eliminieren (Gotot et al. 2012). Dies scheint auch im Kontext einer HBV-Infektion der Fall zu sein, da im akuten HBV-HDI Infektionsmodell Batf3⁺ DC die Rolle der Kreuzpräsentation und die einhergehende

Aktivierung von CTL übernehmen. Werden Batf3⁺ DC in diesem System spezifisch depletiert, so kommt es zu einem vollständigen Abbruch einer HBV-spezifischen CTL-Antwort bei der T_{REG} Zellen ihre suppressive Eigenschaft auf die Aktivierung von B Zellen weiterhin ausüben können. Werden jedoch T_{REG} Zellen depletiert, so wird die Suppression verhindert und es wird den B Zellen ermöglicht eine partielle HBs-spezifische CTL-Antwort zu induzieren.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse einen suppressiven Mechanismus ausgehend von T_{REG} Zellen auf die Entstehung einer B Zell-vermittelten und partiellen HBs-spezifischen Immunantwort gegen eine AdHBV-Infektion im persistenten Stadium. T_{REG} Zellen inhibieren B Zellen in ihrer Funktion neutralisierende anti-HBs Antikörper zu produzieren, welche zum einen HBsAg-Moleküle aus dem Serum neutralisieren können und zum anderen als gebundene HBs-Immunkomplexe zur besseren Antigenpräsentation nach Aufnahme durch APC und deren Aktivierung von CD8⁺ T Zellen dienen.

5.4 Die Expansion, nicht das *priming* HBV-spezifischer CTL wird durch virale Mechanismen inhibiert

Der Infektionsverlauf in chronisch HBV-infizierten Patienten geht mit einer fehlenden robusten polyklonalen HBV-spezifischen CTL-Antwort einher, so dass keine eliminierende und protektive Immunantwort induziert wird. Bisher konnte gezeigt werden, dass eine T_{REG}-Depletion in AdHBV-infizierten Mäusen die Expansion HBs-spezifischer CTL erlaubt, jedoch nicht von Hbc-spezifischen CTL. Zur Klärung einer Infektion ist nicht nur eine geringe Induktion sondern auch eine robuste Expansion pathogen-spezifischer CTL essentiell. Zunächst sollte geklärt werden, ob persistent AdHBV-infizierte wildtypische Mäuse in der Lage sind eine effektive und klärende CTL-Antwort gegen ein zweites Pathogen zu induzieren, obwohl eine starke Toleranz gegenüber HBV-spezifischer Antigene besteht und somit eine generelle Immunsuppression des Organismus auszuschließen.

Die Ergebnisse liefern eindeutige Hinweise darauf, dass HBV-tolerante Mäuse dennoch in der Lage sind eine robuste Expansion von spezifischen CTL gegen andere Pathogene zu induzieren. Sowohl eine Superinfektion mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* (*Lm*) als auch mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) konnte eine robuste Expansion von Pathogen-spezifischen CTL induziert werden. Diese hatte weder Einfluss auf die Etablierung der HBs-spezifischen CTL-Antwort in T_{REG}-depletierten

AdHBV-infizierten Mäusen noch hatte eine persistente AdHBV-Infektion eine Auswirkung auf die Stärke der LCMV- oder *Lm*-spezifischen CTL-Antwort.

Dies lässt eindeutig die Schlussfolgerung zu, dass AdHBV-infizierte Mäuse in der Lage sind, eine robuste und protektive CTL-Antwort zu induzieren. Weiterhin ist festzustellen, dass der HBV-vermittelte Mechanismus der Inhibition einer effektiven Immunantwort nur spezifisch wirkt. Dies bedeutet, dass die Zellpopulationen, welche die Expansion HBV-spezifischer CTL kontrollieren, keinen inhibierenden Effekt auf die Etablierung einer *Lm*- oder LCMV-vermittelten CTL-Antwort ausüben, da naive C57BL/6 Mäuse eine vergleichbar effiziente Expansion LCMV- oder *Lm*-spezifischer CTL nach Infektion induzieren können.

In AdHBV-infizierten C57BL/6 Mäusen kann trotz einer starken Toleranz gegenüber HBV-spezifischen Antigenen eine gering erhöhte Anzahl sowohl HBc- als auch HBs-spezifischer CTL in der Leber im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen nachgewiesen werden. Daher lässt sich vermuten, dass es zu der Induktion einer geringen Anzahl HBV-spezifischer CTL sogar im persistenten HBV-Mausmodell kommt. Da gezeigt werden konnte, dass eine Expansion von CTL durchaus in diesen Mäusen möglich ist, wurde die Auswirkung einer erhöhten Anzahl künstlich induzierter HBs- und HBc-spezifischer CTL durch eine DNA-Vakzinierung untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine geringe Induktion sowohl HBs- als auch HBc-spezifischer CTL stattfindet, welche jedoch wie im Kontext HBV-infizierter Patienten nicht zu einer robusten CTL-Antwort expandieren können. Sogar im Kontext einer T_{REG}-Depletion kann weder eine Expansion HBc-spezifischer noch eine verstärkte Expansion HBs-spezifischer CTL nachgewiesen werden. Weiterhin zeigen diese Daten, dass selbst nach Depletion der für HBs-spezifische CTL inhibierenden Zellpopulation (T_{REG} Zellen) der Suppressionsmechanismus einer HBc-spezifischen CTL-Antwort intakt bleibt. Dies liefert Hinweise auf die Existenz von mindestens einer weiteren Zellpopulation neben der Population von T_{REG} Zellen, welche unabhängig voneinander die Generation von HBc- oder HBs-spezifischen CTL inhibieren und die damit einhergehende Toleranz gegenüber HBV-spezifischer Antigene steuern.

5.5 HBe-spezifische Toleranz wird durch robuste virale Mechanismen vermittelt

Da HBe-spezifische CTL eine essentielle Rolle in der Klärung einer HBV-Infektion übernehmen, so sollte im Folgenden versucht werden mit Hilfe zusätzlicher immunologisch relevanter proinflammatorischer Stimuli eine Expansion dieser zu induzieren.

Kupffer Zellen repräsentieren die Population der Leber-residenten Makrophagen, welche als professionelle APC in ihrer Umgebung befindliches pathogenes Material aufnehmen, prozessieren und an Lymphozyten präsentieren und stellen daher eine besonders wichtige Rolle in der Induktion einer antiviralen Immunantwort dar (Bilzer, Roggel, and Gerbes 2006). Interessanterweise repräsentieren Kupffer Zellen die hauptsächliche Zellpopulation der Leber, welche eine TLR-Stimulation erkennen und in Folge dessen mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine und einer Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK Zellen) darauf reagieren kann (Boltjes et al. 2014; Tu et al. 2008). In AdHBV-infizierten Mäusen konnte eine zusätzliche proinflammatorische Stimulation mit den Liganden von TLR3, TLR4 oder TLR9 jedoch keine Expansion HBe-spezifischer CTL induziert werden.

Wie zuvor gezeigt, induziert eine akute HBV-Infektion mittels hydrodynamischer Injektion eine robuste und klärende HBV-spezifische Immunantwort. Durch die physikalische Applikation der HDI geht ein transienter jedoch signifikanter Leberschaden einher, welcher als potenzieller Stimulus zur Etablierung einer CTL-Antwort mitverantwortlich sein könnte. Durch den entstehenden hydrostatischen Druck kommt es zu einem verstärkten nekrotischen und apoptotischen Zelltod des Leberparenchyms, welches zu einer lokalen Entzündungsreaktion (Green et al. 2009) durch sowohl freiwerdende Zelltrümmer als auch aufgenommener und schon zum Teil prozessierter Antigene führt. Die nukleären und zellulären Bestandteile apoptotischer Hepatozyten werden vom angeborenen Immunsystem als DAMPs erkannt, den *danger-associated molecular patterns*, und lösen eine proinflammatorische Immunreaktion aus (Zitvogel, Kepp, and Kroemer 2010). Dem Stimulus des induzierten Zelltods mittels zusätzlicher HDI-Applikation in der persistenten Phase einer AdHBV-Infektion konnte jedoch keine unterstützende Funktion zur Etablierung einer HBV-spezifischen Immunantwort nachgewiesen werden. Auch mit zusätzlich applizierter HBV-spezifischer oder auch nicht-relevanter DNA als weiterer Stimulus konnte keine virale CTL-Expansion beobachtet werden.

Dies lässt darauf schließen, dass der Mechanismus zur Inhibierung einer HBV-spezifischen Immunität so robust ist, dass zusätzliche proinflammatorische Stimuli diesen Mechanismus

nicht brechen können und eine Antigentoleranz weiterhin bestehen bleibt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass weder eine Induktion HBV-spezifischer CTL durch eine DNA-Vakzinierung, noch eine Stimulation mit TLR-Liganden oder eine Induktion von Zelltod zu einer Aktivierung derjenigen Zellpopulation kommt, welche durch HBV-vermittelte Mechanismen inhibiert zu sein scheint und die Expansion von HBc-spezifischen CTL unterdrückt.

5.6 Weitere potenzielle Mechanismen zur Durchbrechung der HBV-spezifischen Antigentoleranz

Naive B und T Zellen kommen mit ihrem spezifischen Antigen in sekundären lymphatischen Organen, wie dem Lymphknoten, oft als erstes in Kontakt. Im Lymphknoten herrscht eine hohe Konzentration diverser körpereigener aber auch pathogener Antigene, welche mit Hilfe von APC an die Lymphozyten präsentiert und folglich aktiviert werden.

Eine längere Retention von Lymphozyten spezifisch im Lymphknoten lässt sich durch die systemische Applikation von FTY720 induzieren (Ledgerwood et al. 2008; Mandala et al. 2002). Die Aufnahme von Lymphozyten in den Lymphknoten wird durch den Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptor vermittelt. FTY720 ist ein Agonist des S1P-Rezeptors und kann durch regelmäßige systemische Applikation zu einer anhaltenden Retention von Lymphozyten im Lymphknoten führen.

Dadurch wäre es möglich, eine kurzfristige Anreicherung von sowohl HBV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen als auch B Zellen im Lymphknoten zu erlauben, welche nach einiger Zeit wieder in die Peripherie auswandern dürften. Dies ist möglich, da FTY720 den Sphingosin-Rezeptor reversibel blockiert. Herauszustellen gilt es allerdings, ob diese angereicherte Population HBV-spezifischer Lymphozyten in der Leber weiterhin expandieren, ihre Effektorfunktionen ausüben und eine robuste klärende Immunantwort zur Eliminierung der HBV-Infektion ausführen können. Weiterhin ist denkbar, zusätzlich zu der FTY720-vermittelten Retention im Lymphknoten, iMATE-Strukturen in der Leber mittels TLR9-Stimulation zu induzieren, um ein besonders günstiges Mikromilieu in der Leber zur Expansion HBV-spezifischer CD8⁺ T Zellen zu generieren.

Wie in **Abb. 5-1** zusammengefasst dargestellt, kann während einer akuten und somit selbst-regulierenden HBV-Infektion eine klärende Immunantwort gegen sowohl HBs- als

auch Hbc-spezifische Peptide mit Hilfe kreuzpräsentierender APC erreicht werden. Hinsichtlich der persistenten Manifestierung einer HBV-Infektion konnte herausgestellt werden, dass T_{REG} Zellen einen Mechanismus besitzen, welche eine B Zell-abhängige Induktion einer HBs-spezifischen Immunität inhibieren. Zudem konnten keine der genannten immunologisch-relevanten Stimuli eine HBV-vermittelte Immuntoleranz gegenüber HbcAg durchbrechen.

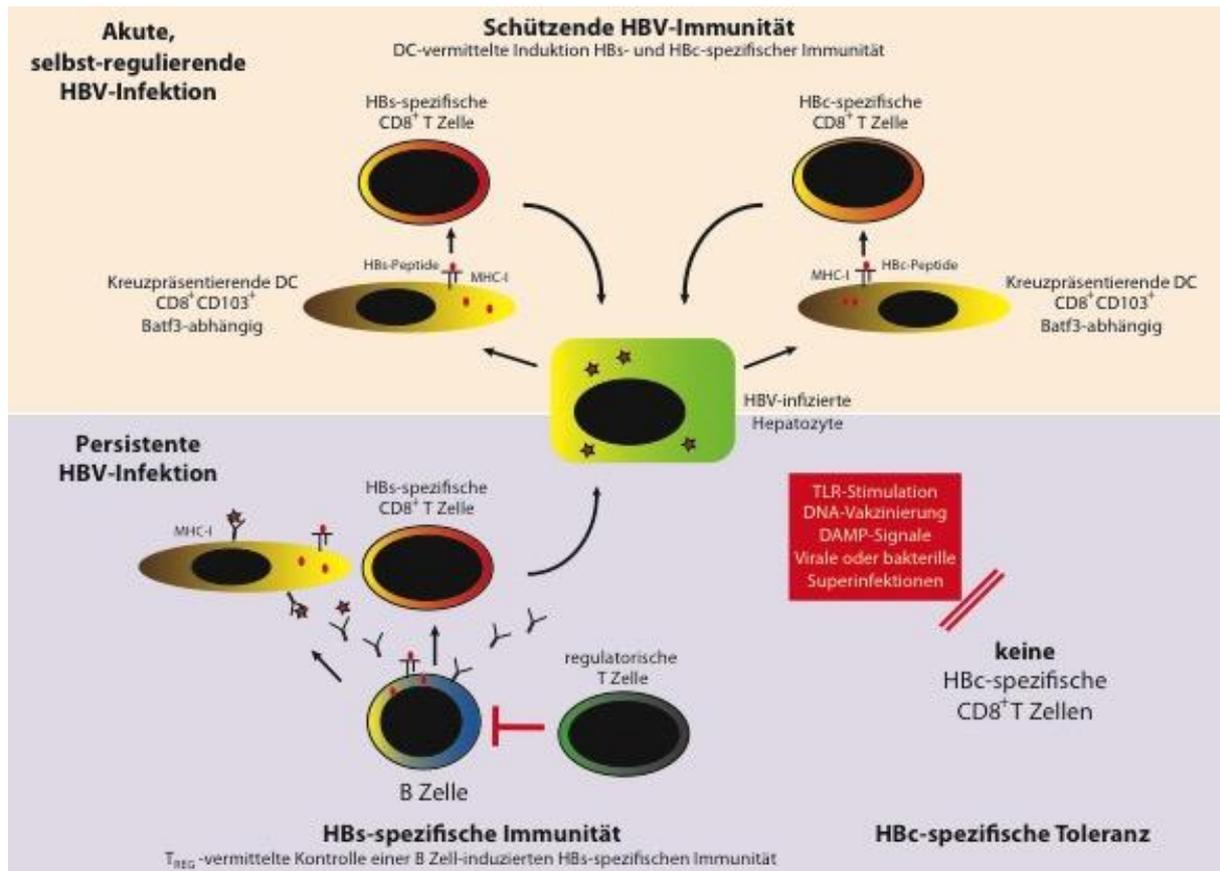


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der Ebenen einer akuten, selbst-regulierenden oder persistenten HBV-Infektion.

Zusammenfassend lassen die präsentierten Ergebnisse dieser Arbeit auf einen bisher nicht beschriebenen suppressiven Mechanismus seitens T_{REG} Zellen auf die Etablierung einer B Zell-vermittelten partiellen, HBs-spezifischen Immunantwort schließen. Diese Immunantwort auf dem Boden einer kurzfristigen T_{REG} -Depletion ist zwar in der Lage eine partielle Neutralisierung von Antigenen aus dem Serum und auch eine Reduktion HBV-infizierter Hepatozyten zu induzieren, welche jedoch nicht ausreichend ist für die Etablierung einer klärenden Immunität gegen die Infektion. Eine langfristige Depletion von

T_{REG} Zellen führt jedoch zu der Entwicklung von Autoimmunreaktionen (Boyer et al. 2004; Kim et al. 2009).

Herauszustellen gilt es jedoch weiterhin, den viralen Mechanismus der spezifischen Inhibierung einer robusten und klärenden Hbc-spezifischen Immunantwort zu identifizieren und somit diejenige Zellpopulation zu finden, welche spezifisch die Expansion dieser CD8⁺ T Zellen im Kontext einer HBV-Infektion unterdrückt. Dieser virale Mechanismus scheint zusätzlich für die Etablierung einer persistenten HBV-Infektion spezifisch zu sein, da die Induktion einer Immunantwort gegen andere Pathogene nach Superinfektion möglich ist. Dies spricht demnach für die Rolle von HBV als sogenanntes *stealth virus*, welches bedeutet, dass die Erkennung eines Pathogens und damit verbundene Immunantwort unterdrückt wird und nicht vom Wirt mit einer überschwänglichen und oft fatalen Immunreaktion bekämpft wird. Nur so wird einem "verdeckten" (*stealth*) Virus sowohl eine lebenslange "heimliche" Persistenz im Organismus als auch das Ziel einer effektiven und dauerhaften Verbreitung des Virus ermöglicht ohne dabei den Wirt zu töten.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse deuten auf eine Existenz von verschiedenen Ebenen der Immuntoleranz während einer chronischen HBV-Infektion, welche somit eine gezielte Etablierung neuer und effektiver Therapien in der Behandlung der chronischen Hepatitis B Infektion im Patienten ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdullah, Z. et al. 2007. "Serpin-6 Expression Protects Embryonic Stem Cells from Lysis by Antigen-Specific CTL." *The Journal of Immunology* 178(6):3390–99.
- Alferink, J. et al. 1998. "Control of Neonatal Tolerance to Tissue Antigens by Peripheral T Cell Trafficking." *Science (New York, N.Y.)* 282(5392):1338–41.
- Alter, H. J., and B. S. Blumberg. 1966. "Further Studies on a 'New' Human Isoprecipitin System (Australia Antigen)." *Blood* 27(3):297–309.
- Alter, Miriam J. 2003. "Epidemiology of Hepatitis B in Europe and Worldwide." *Journal of hepatology* 39 Suppl 1:S64–69.
- Anderson, Mark S. et al. 2002. "Projection of an Immunological Self Shadow within the Thymus by the Aire Protein." *Science (New York, N.Y.)* 298(5597):1395–1401.
- Arnold, Bernd. 2002. "Levels of Peripheral T Cell Tolerance." *Transplant immunology* 10(2-3):109–14.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. "Dendritic Cells and the Control of Immunity." *Nature* 392(6673):245–52.
- Barbier, Louise et al. 2012. "Two Lymph Nodes Draining the Mouse Liver Are the Preferential Site of DC Migration and T Cell Activation." *Journal of hepatology* 57(2):352–58.
- Barker, L. F. et al. "Viral Hepatitis, Type B, in Experimental Animals." *The American journal of the medical sciences* 270(1):189–95.
- Bartholomeusz, Angeline, Benjamin G. Tehan, and David K. Chalmers. 2004. "Comparisons of the HBV and HIV Polymerase, and Antiviral Resistance Mutations." *Antiviral therapy* 9(2):149–60.
- Beissert, Stefan, Agatha Schwarz, and Thomas Schwarz. 2006. "Regulatory T Cells." *The Journal of investigative dermatology* 126(1):15–24.
- Belkaid, Yasmine, Ciriaco A. Piccirillo, Susana Mendez, Ethan M. Shevach, and David L. Sacks. 2002. "CD4+CD25+ Regulatory T Cells Control Leishmania Major Persistence and Immunity." *Nature* 420(6915):502–7.
- Bensinger, S. J., A. Bandeira, M. S. Jordan, A. J. Caton, and T. M. Laufer. 2001. "Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Cortical Epithelium Mediates the Selection of CD4(+)/25(+) Immunoregulatory T Cells." *The Journal of experimental medicine* 194(4):427–38.
- Van Berkel, Miranda E. A. T., and Mariëtte A. Oosterwegel. 2006. "CD28 and ICOS: Similar or Separate Costimulators of T Cells?" *Immunology letters* 105(2):115–22.
- Berting, A., J. Hahnen, M. Kröger, and W. H. Gerlich. 1995. "Computer-Aided Studies on the Spatial Structure of the Small Hepatitis B Surface Protein." *Intervirology* 38(1-2):8–15.
- Bertoletti, A. et al. 1991. "HLA Class I-Restricted Human Cytotoxic T Cells Recognize Endogenously Synthesized Hepatitis B Virus Nucleocapsid Antigen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(23):10445–49.

- Bertolino, P., M. C. Trescol-Biémont, and C. Rabourdin-Combe. 1998. "Hepatocytes Induce Functional Activation of Naive CD8+ T Lymphocytes but Fail to Promote Survival." *European journal of immunology* 28(1):221–36.
- Betts, Michael R. et al. 2003. "Sensitive and Viable Identification of Antigen-Specific CD8+ T Cells by a Flow Cytometric Assay for Degranulation." *Journal of immunological methods* 281(1-2):65–78.
- Bevan, M. J. 1976. "Cross-Priming for a Secondary Cytotoxic Response to Minor H Antigens with H-2 Congenic Cells Which Do Not Cross-React in the Cytotoxic Assay." *The Journal of experimental medicine* 143(5):1283–88.
- Bilzer, Manfred, Frigga Roggel, and Alexander L. Gerbes. 2006. "Role of Kupffer Cells in Host Defense and Liver Disease." *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 26(10):1175–86.
- BLUMBERG, B. S. 1964. "POLYMORPHISMS OF THE SERUM PROTEINS AND THE DEVELOPMENT OF ISO-PRECPITINS IN TRANSFUSED PATIENTS." *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 40:377–86.
- Blumberg, Baruch S. 2010. "Primary and Secondary Prevention of Liver Cancer Caused by HBV." *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2:756–63.
- Boise, L. H. et al. 1995. "CD28 Costimulation Can Promote T Cell Survival by Enhancing the Expression of Bcl-XL." *Immunity* 3(1):87–98.
- Boltjes, Arjan, Dowty Movita, André Boonstra, and Andrea M. Woltman. 2014. "The Role of Kupffer Cells in Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections." *Journal of hepatology* 61(3):660–71.
- Böttcher, B., S. A. Wynne, and R. A. Crowther. 1997. "Determination of the Fold of the Core Protein of Hepatitis B Virus by Electron Cryomicroscopy." *Nature* 386(6620):88–91.
- Le Bouvier, G. L. et al. 1972. "Subtypes of Australia Antigen and Hepatitis-B Virus." *JAMA : the journal of the American Medical Association* 222(8):928–30.
- Boyer, Olivier et al. 2004. "CD4+CD25+ Regulatory T-Cell Deficiency in Patients with Hepatitis C-Mixed Cryoglobulinemia Vasculitis." *Blood* 103(9):3428–30.
- Braet, Filip, and Eddie Wisse. 2002. "Structural and Functional Aspects of Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestrae: A Review." *Comparative hepatology* 1(1):1.
- Breiner, K. M., H. Schaller, and P. A. Knolle. 2001. "Endothelial Cell-Mediated Uptake of a Hepatitis B Virus: A New Concept of Liver Targeting of Hepatotropic Microorganisms." *Hepatology (Baltimore, Md.)*.
- Brunkow, M. E. et al. 2001. "Disruption of a New Forkhead/winged-Helix Protein, Scurfin, Results in the Fatal Lymphoproliferative Disorder of the Scurfy Mouse." *Nature genetics* 27(1):68–73.
- Chang, C. M. et al. 1987. "Production of Hepatitis B Virus in Vitro by Transient Expression of Cloned HBV DNA in a Hepatoma Cell Line." *The EMBO journal* 6(3):675–80.
- Chisari, F. V et al. 1985. "A Transgenic Mouse Model of the Chronic Hepatitis B Surface Antigen Carrier State." *Science (New York, N.Y.)* 230(4730):1157–60.
- Chisari, F. V, and C. Ferrari. 1995. "Hepatitis B Virus Immunopathogenesis." *Annual review of immunology* 13:29–60.

- Chuai, Xia et al. 2014. "Lentiviral Backbone-Based Hepatitis B Virus Replicon-Mediated Transfer Favours the Establishment of Persistent Hepatitis B Virus Infection in Mice after Hydrodynamic Injection." *Antiviral Research* 101:68–74.
- Civan, Jesse, and Hie Won Hann. 2015. "Giving Rituximab in Patients with Occult or Resolved Hepatitis B Virus Infection: Are the Current Guidelines Good Enough?" *Expert opinion on drug safety* 14(6):865–75.
- Constant, S. L. 1999. "B Lymphocytes as Antigen-Presenting Cells for CD4+ T Cell Priming in Vivo." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 162(10):5695–5703.
- Crispe, I. N., and W. Z. Mehal. 1996. "Strange Brew: T Cells in the Liver." *Immunology today* 17(11):522–25.
- Crispe, Ian Nicholas. 2003. "Hepatic T Cells and Liver Tolerance." *Nature reviews. Immunology* 3(1):51–62.
- Crispe, Ian Nicholas. 2009. "The Liver as a Lymphoid Organ." *Annual review of immunology* 27:147–63.
- Dane, D. S., C. H. Cameron, and M. Briggs. 1970. "Virus-like Particles in Serum of Patients with Australia-Antigen-Associated Hepatitis." *Lancet* 1(7649):695–98.
- Dhamne, Chetan, Yeonseok Chung, Amin Majid Alousi, Laurence J. N. Cooper, and Dat Quoc Tran. 2013. "Peripheral and Thymic foxp3(+) Regulatory T Cells in Search of Origin, Distinction, and Function." *Frontiers in immunology* 4:253.
- Diehl, Linda et al. 2008. "Tolerogenic Maturation of Liver Sinusoidal Endothelial Cells Promotes B7-Homolog 1-Dependent CD8+ T Cell Tolerance." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 47(1):296–305.
- Dienes, Hans-Peter, and Uta Drebber. 2010. "Pathology of Immune-Mediated Liver Injury." *Digestive diseases* (Basel, Switzerland) 28(1):57–62.
- Dong, Xiao-Yan et al. 2010. "[Establishment of Hepatitis B Virus (HBV) Chronic Infection Mouse Model by in Vivo Transduction with a Recombinant Adeno-Associated Virus 8 Carrying 1. 3 Copies of HBV Genome (rAAN8-1. 3HBV)]." *Bing du xue bao = Chinese journal of virology* / [bian ji, Bing du xue bao bian ji wei yuan hui] 26(6):425–31.
- Elvevold, Kjetil et al. 2008. "Liver Sinusoidal Endothelial Cells Depend on Mannose Receptor-Mediated Recruitment of Lysosomal Enzymes for Normal Degradation Capacity." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 48(6):2007–15.
- Elvevold, Kjetil H., Geir I. Nedredal, Arthur Revhaug, and Bård Smedsrød. 2004. "Scavenger Properties of Cultivated Pig Liver Endothelial Cells." *Comparative hepatology* 3(1):4.
- Feau, Sonia, Ramon Arens, Susan Togher, and Stephen P. Schoenberger. 2011. "Autocrine IL-2 Is Required for Secondary Population Expansion of CD8(+) Memory T Cells." *Nature immunology* 12(9):908–13.
- Forrester, J. V. 2009. "Privilege Revisited: An Evaluation of the Eye's Defence Mechanisms." *Eye* (London, England) 23(4):756–66.
- Francis, D. P. et al. 1982. The Prevention of Hepatitis B with Vaccine. Report of the Centers for Disease Control Multi-Center Efficacy Trial among Homosexual Men.
- Von Freyend, M. John et al. 2011. "Sequential Control of Hepatitis B Virus in a Mouse Model of Acute, Self-Resolving Hepatitis B." *Journal of viral hepatitis* 18(3):216–26.
- Fung, James, Ching-Lung Lai, Wai-Kay Seto, and Man-Fung Yuen. 2011. "Nucleoside/nucleotide Analogues in the Treatment of Chronic Hepatitis B." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66(12):2715–25.

- Ganem, D. "Persistent Infection of Humans with Hepatitis B Virus: Mechanisms and Consequences." *Reviews of infectious diseases* 4(5):1026–47.
- Geerts, A. 2001. "History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells." *Seminars in liver disease* 21(3):311–35.
- Gerlich, Wolfram H. et al. 2010. "Occult Hepatitis B Virus Infection: Detection and Significance." *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 28(1):116–25.
- Gilbert, R. J. C. et al. 2005. "Hepatitis B Small Surface Antigen Particles Are Octahedral." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(41):14783–88.
- Gitnick, G. L. 1972. "Australia Antigen and the Revolution in Hepatology." *California medicine* 116(4):28–34.
- Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. 1999. "Selecting and Maintaining a Diverse T-Cell Repertoire." *Nature* 402(6759):255–62.
- Good, M. F. 1995. "Development of Immunity to Malaria May Not Be an Entirely Active Process." *Parasite immunology* 17(2):55–59.
- Gotot, Janine et al. 2012. "Regulatory T Cells Use Programmed Death 1 Ligands to Directly Suppress Autoreactive B Cells in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(26):10468–73.
- Govindarajan, S., T. L. Fong, B. Valinluck, V. Edwards, and A. G. Redeker. 1988. "Markers of Viral Replication in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection." *American journal of clinical pathology* 89(2):233–37.
- Green, Douglas R., Thomas Ferguson, Laurence Zitvogel, and Guido Kroemer. 2009. "Immunogenic and Tolerogenic Cell Death." *Nature reviews. Immunology* 9(5):353–63.
- Gregory, S. H., L. K. Barczynski, and E. J. Wing. 1992. "Effector Function of Hepatocytes and Kupffer Cells in the Resolution of Systemic Bacterial Infections." *Journal of leukocyte biology* 51(4):421–24.
- Gripon, Philippe et al. 2002. "Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(24):15655–60.
- Guermonprez, Pierre, Jenny Valladeau, Laurence Zitvogel, Clotilde Théry, and Sebastian Amigorena. 2002. "Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells." *Annual review of immunology* 20:621–67.
- Guidotti, L. G., B. Matzke, H. Schaller, and F. V. Chisari. 1995. "High-Level Hepatitis B Virus Replication in Transgenic Mice." *Journal of virology* 69(10):6158–69.
- Hamilton-Williams, Emma E. et al. 2005. "Cutting Edge: TLR Ligands Are Not Sufficient to Break Cross-Tolerance to Self-Antigens." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174(3):1159–63.
- Haybaeck, Johannes et al. 2009. "A Lymphotoxin-Driven Pathway to Hepatocellular Carcinoma." *Cancer cell* 16(4):295–308.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. "Cross-Presentation in Viral Immunity and Self-Tolerance." *Nature reviews. Immunology* 1(2):126–34.
- Heermann, K. H. et al. 1984. "Large Surface Proteins of Hepatitis B Virus Containing the Pre-S Sequence." *Journal of virology* 52(2):396–402.

- Heit, Antje et al. 2004. "CpG-DNA Aided Cross-Priming by Cross-Presenting B Cells." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 172(3):1501–7.
- Hildner, Kai et al. 2008. "Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8alpha+ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity." *Science (New York, N.Y.)* 322(5904):1097–1100.
- Hisaeda, Hajime et al. 2004. "Escape of Malaria Parasites from Host Immunity Requires CD4+ CD25+ Regulatory T Cells." *Nature medicine* 10(1):29–30.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz. 1999. "Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity." *Science (New York, N.Y.)* 284(5418):1313–18.
- Hoofnagle, J. H., and A. M. di Bisceglie. 1997. "The Treatment of Chronic Viral Hepatitis." *The New England journal of medicine* 336(5):347–56.
- Horn, T., C. A. Chang, and M. S. Urdea. 1997. "Chemical Synthesis and Characterization of Branched Oligodeoxyribonucleotides (bdNA) for Use as Signal Amplifiers in Nucleic Acid Quantification Assays." *Nucleic acids research* 25(23):4842–49.
- Huang, Li-Rung et al. 2012. "Transfer of HBV Genomes Using Low Doses of Adenovirus Vectors Leads to Persistent Infection in Immune Competent Mice." *Gastroenterology* 142(7):1447–50.e3.
- Huang, Li-Rung et al. 2013. "Intrahepatic Myeloid-Cell Aggregates Enable Local Proliferation of CD8(+) T Cells and Successful Immunotherapy against Chronic Viral Liver Infection." *Nature immunology* 14(6):574–83.
- Huang, Li-Rung, Hui-Lin Wu, Pei-Jer Chen, and Ding-Shinn Chen. 2006. "An Immunocompetent Mouse Model for the Tolerance of Human Chronic Hepatitis B Virus Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47):17862–67.
- Huang, Z. M., and T. S. Yen. 1995. "Role of the Hepatitis B Virus Posttranscriptional Regulatory Element in Export of Intronless Transcripts." *Molecular and cellular biology* 15(7):3864–69.
- Huovila, A. P., A. M. Eder, and S. D. Fuller. 1992. "Hepatitis B Surface Antigen Assembles in a Post-ER, Pre-Golgi Compartment." *The Journal of cell biology* 118(6):1305–20.
- Iwasaki, Akiko, and Ruslan Medzhitov. 2004. "Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses." *Nature immunology* 5(10):987–95.
- Janeway, Charles A., and Ruslan Medzhitov. 2002. "Innate Immune Recognition." *Annual review of immunology* 20:197–216.
- Jenkins, M. K., and R. H. Schwartz. 1987. "Antigen Presentation by Chemically Modified Splenocytes Induces Antigen-Specific T Cell Unresponsiveness in Vitro and in Vivo." *The Journal of experimental medicine* 165(2):302–19.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink, and A. H. Enk. 2001. "Dendritic Cells as a Tool to Induce Anergic and Regulatory T Cells." *Trends in immunology* 22(7):394–400.
- Jonuleit, Helmut et al. 2002. "Infectious Tolerance: Human CD25(+) Regulatory T Cells Convey Suppressor Activity to Conventional CD4(+) T Helper Cells." *The Journal of experimental medicine* 196(2):255–60.
- Kaech, Susan M., Scott Hemby, Ellen Kersh, and Rafi Ahmed. "Molecular and Functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation." *Cell* 111(6):837–51.
- Kaech, Susan M., E. John Wherry, and Rafi Ahmed. "Effector and Memory T-Cell Differentiation: Implications for Vaccine Development." *Nature reviews. Immunology* 2(4):251–62.

- Kann, Michael, Andre Schmitz, and Birgit Rabe. 2007. "Intracellular Transport of Hepatitis B Virus." *World journal of gastroenterology : WJG* 13(1):39–47.
- Ke, Y., and J. A. Kapp. 1996. "Exogenous Antigens Gain Access to the Major Histocompatibility Complex Class I Processing Pathway in B Cells by Receptor-Mediated Uptake." *The Journal of experimental medicine* 184(3):1179–84.
- Kim, Jeong et al. 2009. "Cutting Edge: Depletion of Foxp3+ Cells Leads to Induction of Autoimmunity by Specific Ablation of Regulatory T Cells in Genetically Targeted Mice." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(12):7631–34.
- Knolle, P. A. et al. 1999. "Induction of Cytokine Production in Naive CD4(+) T Cells by Antigen-Presenting Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells but Failure to Induce Differentiation toward Th1 Cells." *Gastroenterology* 116(6):1428–40.
- Knolle, P. A., and G. Gerken. 2000. "Local Control of the Immune Response in the Liver." *Immunological reviews* 174:21–34.
- Knolle, P. A., and A. Limmer. 2001. "Neighborhood Politics: The Immunoregulatory Function of Organ-Resident Liver Endothelial Cells." *Trends in immunology* 22(8):432–37.
- Knolle, Percy A., and Andreas Limmer. 2003. "Control of Immune Responses by Scavenger Liver Endothelial Cells." *Swiss medical weekly* 133(37-38):501–6.
- Kuhns, M. C. 1990. "Monitoring Hepatitis B Virus Replication." *Journal of hepatology* 11 Suppl 1:S90–94.
- Kurts, C. et al. 1996. "Constitutive Class I-Restricted Exogenous Presentation of Self Antigens in Vivo." *The Journal of experimental medicine* 184(3):923–30.
- Kurts, C., J. F. Miller, R. M. Subramaniam, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 1998. "Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Cross-Presentation Is Biased towards High Dose Antigens and Those Released during Cellular Destruction." *The Journal of experimental medicine* 188(2):409–14.
- Lanford, R. E., D. Chavez, K. M. Brasky, R. B. Burns, and R. Rico-Hesse. 1998. "Isolation of a Hepadnavirus from the Woolly Monkey, a New World Primate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(10):5757–61.
- Lanzavecchia, A. 1996. "Mechanisms of Antigen Uptake for Presentation." *Current opinion in immunology* 8(3):348–54.
- Lau, A. H., and A. W. Thomson. 2003. "Dendritic Cells and Immune Regulation in the Liver." *Gut* 52(2):307–14.
- Lau, J. Y., and T. L. Wright. 1993. "Molecular Virology and Pathogenesis of Hepatitis B." *Lancet* 342(8883):1335–40.
- Lavanchy, D. 2004. "Hepatitis B Virus Epidemiology, Disease Burden, Treatment, and Current and Emerging Prevention and Control Measures." *Journal of viral hepatitis* 11:97–107.
- LeBien, Tucker W., and Thomas F. Tedder. 2008. "B Lymphocytes: How They Develop and Function." *Blood* 112(5):1570–80.
- Ledgerwood, Levi G. et al. 2008. "The Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Causes Tissue Retention by Inhibiting the Entry of Peripheral Tissue T Lymphocytes into Afferent Lymphatics." *Nature immunology* 9(1):42–53.

- Lee, Alvin T. C., and Caroline G. L. Lee. 2007. "Oncogenesis and Transforming Viruses: The Hepatitis B Virus and Hepatocellularcarcinoma--the Etiopathogenic Link." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12:234–45.
- León, Beatriz, André Ballesteros-Tato, Troy D. Randall, and Frances E. Lund. 2014. "Prolonged Antigen Presentation by Immune Complex-Binding Dendritic Cells Programs the Proliferative Capacity of Memory CD8 T Cells." *The Journal of experimental medicine* 211(8):1637–55.
- Lepault, F., and M. C. Gagnerault. 2000. "Characterization of Peripheral Regulatory CD4+ T Cells That Prevent Diabetes Onset in Nonobese Diabetic Mice." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164(1):240–47.
- Lim, Young-Suk et al. 2014. "Mortality, Liver Transplantation, and Hepatocellular Carcinoma Among Patients with Chronic Hepatitis B Treated with Entecavir vs Lamivudine." *Gastroenterology*.
- Limmer, A. et al. 2000. "Efficient Presentation of Exogenous Antigen by Liver Endothelial Cells to CD8+ T Cells Results in Antigen-Specific T-Cell Tolerance." *Nature medicine* 6(12):1348–54.
- Littman, Dan R., and Alexander Y. Rudensky. 2010. "Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation." *Cell* 140(6):845–58.
- Liu, G. Y. et al. 1995. "Low Avidity Recognition of Self-Antigen by T Cells Permits Escape from Central Tolerance." *Immunity* 3(4):407–15.
- Locarnini, Stephen. 2004. "Molecular Virology of Hepatitis B Virus." *Seminars in liver disease* 24 Suppl 1:3–10.
- Lohse, A. W. et al. 1996. "Antigen-Presenting Function and B7 Expression of Murine Sinusoidal Endothelial Cells and Kupffer Cells." *Gastroenterology* 110(4):1175–81.
- MacPhee, P. J., E. E. Schmidt, and A. C. Groom. 1992. "Evidence for Kupffer Cell Migration along Liver Sinusoids, from High-Resolution in Vivo Microscopy." *The American journal of physiology* 263(1 Pt 1):G17–23.
- MacPhee, P. J., E. E. Schmidt, and A. C. Groom. 1995. "Intermittence of Blood Flow in Liver Sinusoids, Studied by High-Resolution in Vivo Microscopy." *The American journal of physiology* 269(5 Pt 1):G692–98.
- Madaliński, K., and I. Bragieli. 1979. "HBsAg Immune Complexes in the Course of Infection with Hepatitis B Virus." *Clinical and experimental immunology* 36(3):371–78.
- Malek, Thomas R. 2008. "The Biology of Interleukin-2." *Annual review of immunology* 26:453–79.
- Maloney, D. G. et al. 1997. "IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients with Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma." *Blood* 90(6):2188–95.
- Maloy, K. J., and F. Powrie. 2001. "Regulatory T Cells in the Control of Immune Pathology." *Nature immunology* 2(9):816–22.
- Mandala, Suzanne et al. 2002. "Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists." *Science (New York, N.Y.)* 296(5566):346–49.
- Mangold, C. M., and R. E. Streeck. 1993. "Mutational Analysis of the Cysteine Residues in the Hepatitis B Virus Small Envelope Protein." *Journal of virology* 67(8):4588–97.
- Mason, W. S., G. Seal, and J. Summers. 1980. "Virus of Pekin Ducks with Structural and Biological Relatedness to Human Hepatitis B Virus." *Journal of virology* 36:829–36.

- McHugh, Rebecca S. et al. 2002. "CD4(+)CD25(+) Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor." *Immunity* 16(2):311–23.
- Miao, C. H., A. R. Thompson, K. Loeb, and X. Ye. 2001. "Long-Term and Therapeutic-Level Hepatic Gene Expression of Human Factor IX after Naked Plasmid Transfer in Vivo." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 3(6):947–57.
- Michailidis, Eleftherios et al. 2012. "Antiviral Therapies: Focus on Hepatitis B Reverse Transcriptase." *The international journal of biochemistry & cell biology* 44(7):1060–71.
- Milich, D., and A. McLachlan. 1986. "The Nucleocapsid of Hepatitis B Virus Is Both a T-Cell-Independent and a T-Cell-Dependent Antigen." *Science* 234(4782):1398–1401.
- Milich, D. R., and F. V Chisari. 1982. "Genetic Regulation of the Immune Response to Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). I. H-2 Restriction of the Murine Humoral Immune Response to the a and D Determinants of HBsAg." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 129(1):320–25.
- Milich, D. R., R. E. Louie, and F. V Chisari. 1985. "Genetic Regulation of the Immune Response to Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). V. T Cell Proliferative Response and Cellular Interactions." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 134(6):4194–4202.
- Neurath, A. R., S. B. Kent, N. Strick, P. Taylor, and C. E. Stevens. "Hepatitis B Virus Contains Pre-S Gene-Encoded Domains." *Nature* 315(6015):154–56.
- De Niet, Annikki et al. 2014. "Experimental HBsAg/anti-HBs Complex Assay for Prediction of HBeAg Loss in Chronic Hepatitis B Patients Treated with Pegylated Interferon and Adefovir." *Antiviral therapy* 19(3):259–67.
- Norder, H., A. M. Couroucé, and L. O. Magnius. 1992. "Molecular Basis of Hepatitis B Virus Serotype Variations within the Four Major Subtypes." *The Journal of general virology* 73.
- Nyström, Sofia N. et al. 2014. "Transient Treg-Cell Depletion in Adult Mice Results in Persistent Self-Reactive CD4(+) T-Cell Responses." *European journal of immunology* 44(12):3621–31.
- Okamoto, H. et al. 1988. "Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes." *The Journal of general virology* 69 (Pt 10):2575–83.
- Olivares-Villagómez, D., A. K. Wensky, Y. Wang, and J. J. Lafaille. 2000. "Repertoire Requirements of CD4+ T Cells That Prevent Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164(10):5499–5507.
- Von Oppen, Nanette et al. 2009. "Systemic Antigen Cross-Presented by Liver Sinusoidal Endothelial Cells Induces Liver-Specific CD8 T-Cell Retention and Tolerization." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49(5):1664–72.
- Ozoren, N. et al. 2006. "Distinct Roles of TLR2 and the Adaptor ASC in IL-1 /IL-18 Secretion in Response to *Listeria Monocytogenes*." *The Journal of Immunology* 176(7):4337–42.
- Pandiyan, Pushpa, Lixin Zheng, Satoru Ishihara, Jennifer Reed, and Michael J. Lenardo. 2007. "CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Induce Cytokine Deprivation-Mediated Apoptosis of Effector CD4+ T Cells." *Nature immunology* 8(12):1353–62.
- Patzer, E. J., G. R. Nakamura, C. C. Simonsen, A. D. Levinson, and R. Brands. 1986. "Intracellular Assembly and Packaging of Hepatitis B Surface Antigen Particles Occur in the Endoplasmic Reticulum." *Journal of virology* 58(3):884–92.

- Penna, A. et al. 1996. "Long-Lasting Memory T Cell Responses Following Self-Limited Acute Hepatitis B." *The Journal of clinical investigation* 98(5):1185–94.
- Perrillo, Robert. 2009. "Benefits and Risks of Interferon Therapy for Hepatitis B." Pp. S103–11 in *Hepatology* (Baltimore, Md.), vol. 49.
- Perz, Joseph F., Gregory L. Armstrong, Leigh A. Farrington, Yvan J. F. Hutin, and Beth P. Bell. 2006. "The Contributions of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infections to Cirrhosis and Primary Liver Cancer Worldwide." *Journal of Hepatology* 45:529–38.
- Probst, Hans Christian, Kathy McCoy, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Maries van den Broek. 2005. "Resting Dendritic Cells Induce Peripheral CD8+ T Cell Tolerance through PD-1 and CTLA-4." *Nature immunology* 6(3):280–86.
- Protzer, Ulrike, Mala K. Maini, and Percy A. Knolle. 2012. "Living in the Liver: Hepatic Infections." *Nature reviews. Immunology* 12(3):201–13.
- Pulendran, B., K. Palucka, and J. Banchereau. 2001. "Sensing Pathogens and Tuning Immune Responses." *Science (New York, N.Y.)* 293(5528):253–56.
- Racanelli, Vito, and Barbara Rehermann. 2006. "The Liver as an Immunological Organ." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 43(2 Suppl 1):S54–62.
- Read, S., V. Malmström, and F. Powrie. 2000. "Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25(+)CD4(+) Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation." *The Journal of experimental medicine* 192(2):295–302.
- Redman, J. M., E. M. Hill, D. AlDeghaither, and L. M. Weiner. 2015. "Mechanisms of Action of Therapeutic Antibodies for Cancer." *Molecular immunology*.
- Reff, M. E. et al. 1994. "Depletion of B Cells in Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20." *Blood* 83(2):435–45.
- Regnault, A. et al. 1999. "Fcγ Receptor-Mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization." *The Journal of experimental medicine* 189(2):371–80.
- Rehermann, B. et al. 1995. "The Cytotoxic T Lymphocyte Response to Multiple Hepatitis B Virus Polymerase Epitopes during and after Acute Viral Hepatitis." *The Journal of experimental medicine* 181(3):1047–58.
- Rehermann, B., C. Ferrari, C. Pasquinnelli, and F. V. Chisari. 1996. "The Hepatitis B Virus Persists for Decades after Patients' Recovery from Acute Viral Hepatitis despite Active Maintenance of a Cytotoxic T-Lymphocyte Response." *Nature medicine* 2(10):1104–8.
- Rehermann, B., and M. Nascimbeni. 2005. "Immunology of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection." *Nat Rev Immunol* 5:215–29.
- Reis e Sousa, C. 2001. "Dendritic Cells as Sensors of Infection." *Immunity* 14(5):495–98.
- Robinson, W. S., D. A. Clayton, and R. L. Greenman. 1974. "DNA of a Human Hepatitis B Virus Candidate." *Journal of virology* 14(2):384–91.
- Robson, Neil C., Anne M. Donachie, and Allan Mcl Mowat. 2008. "Simultaneous Presentation and Cross-Presentation of Immune-Stimulating Complex-Associated Cognate Antigen by Antigen-Specific B Cells." *European journal of immunology* 38(5):1238–46.

- Rossi, Daniela, Vittorio Modena, Savino Sciascia, and Dario Roccatello. 2015. "Rheumatoid Arthritis: Biological Therapy Other than Anti-TNF." *International immunopharmacology*.
- Rouse, Barry T., Pranita P. Sarangi, and Susmit Suvas. 2006. "Regulatory T Cells in Virus Infections." *Immunological reviews* 212:272–86.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. "Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 155(3):1151–64.
- Schaefer, Stephan. 2007. "Hepatitis B Virus Taxonomy and Hepatitis B Virus Genotypes." *World journal of gastroenterology : WJG* 13(1):14–21.
- Schwartz, Ronald H. 2003. "T Cell Anergy." *Annual review of immunology* 21:305–34.
- Sciascia, Savino et al. 2015. "Upcoming Biological Therapies in Systemic Lupus Erythematosus." *International immunopharmacology*.
- Sertl, K. et al. 1986. "Dendritic Cells with Antigen-Presenting Capability Reside in Airway Epithelium, Lung Parenchyma, and Visceral Pleura." *The Journal of experimental medicine* 163(2):436–51.
- Shayakhmetov, Dmitry M., Zong-Yi Li, Shaoheng Ni, and André Lieber. 2004. "Analysis of Adenovirus Sequestration in the Liver, Transduction of Hepatic Cells, and Innate Toxicity after Injection of Fiber-Modified Vectors." *Journal of virology* 78(10shay):5368–81.
- Shevach, Ethan M. 2009. "Mechanisms of foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression." *Immunity* 30(5):636–45.
- Shi, J., H. Fujieda, Y. Kokubo, and K. Wake. 1996. "Apoptosis of Neutrophils and Their Elimination by Kupffer Cells in Rat Liver." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 24(5):1256–63.
- Shimizu, Jun, Sayuri Yamazaki, Takeshi Takahashi, Yasumasa Ishida, and Shimon Sakaguchi. 2002. "Stimulation of CD25(+)CD4(+) Regulatory T Cells through GITR Breaks Immunological Self-Tolerance." *Nature immunology* 3(2):135–42.
- Sigal, L. J., S. Crotty, R. Andino, and K. L. Rock. 1999. "Cytotoxic T-Cell Immunity to Virus-Infected Non-Haematopoietic Cells Requires Presentation of Exogenous Antigen." *Nature* 398(6722):77–80.
- Spengler, U., M. Lechmann, B. Irrgang, F. L. Dumoulin, and T. Sauerbruch. 1996. "Immune Responses in Hepatitis C Virus Infection." *Journal of hepatology* 24(2 Suppl):20–25.
- Sprengel, R., E. F. Kaleta, and H. Will. 1988. "Isolation and Characterization of a Hepatitis B Virus Endemic in Herons." *Journal of virology* 62(10):3832–39.
- Sprinzi, M. F., H. Oberwinkler, H. Schaller, and U. Protzer. 2001. "Transfer of Hepatitis B Virus Genome by Adenovirus Vectors into Cultured Cells and Mice: Crossing the Species Barrier." *Journal of virology* 75(11):5108–18.
- Starr, Timothy K., Stephen C. Jameson, and Kristin A. Hogquist. 2003. "Positive and Negative Selection of T Cells." *Annual review of immunology* 21:139–76.
- Stross, Leonhard et al. 2012. "Foxp3+ Regulatory T Cells Protect the Liver from Immune Damage and Compromise Virus Control during Acute Experimental Hepatitis B Virus Infection in Mice." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 56(3):873–83.

- Suffner, Janine et al. 2010. "Dendritic Cells Support Homeostatic Expansion of Foxp3+ Regulatory T Cells in Foxp3.LuciDTR Mice." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 184(4):1810–20.
- Summers, J., J. M. Smolec, and R. Snyder. 1978. "A Virus Similar to Human Hepatitis B Virus Associated with Hepatitis and Hepatoma in Woodchucks." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(9):4533–37.
- Sureau, C., J. L. Romet-Lemonne, J. I. Mullins, and M. Essex. 1986. "Production of Hepatitis B Virus by a Differentiated Human Hepatoma Cell Line after Transfection with Cloned Circular HBV DNA." *Cell* 47(1):37–47.
- Takahashi, K. et al. 1983. "Immunochemical Structure of Hepatitis B E Antigen in the Serum." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 130(6):2903–7.
- Takahashi, K. et al. 1991. "Molecular Heterogeneity of E Antigen Polypeptides in Sera from Carriers of Hepatitis B Virus." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 147(9):3156–60.
- Thimme, Robert et al. 2003. "CD8(+) T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection." *Journal of virology* 77(1):68–76.
- Thompson, C. B. 1995. "New Insights into V(D)J Recombination and Its Role in the Evolution of the Immune System." *Immunity* 3(5):531–39.
- Thomson, Angus W., and Percy A. Knolle. 2010. "Antigen-Presenting Cell Function in the Tolerogenic Liver Environment." *Nature reviews. Immunology* 10(11):753–66.
- Trapani, Joseph A., and Mark J. Smyth. 2002. "Functional Significance of the Perforin/granzyme Cell Death Pathway." *Nature reviews. Immunology* 2(10):735–47.
- Trinchieri, Giorgio. 2003. "Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity." *Nature reviews. Immunology* 3(2):133–46.
- Tu, Z. et al. 2008. "TLR-Dependent Cross Talk between Human Kupffer Cells and NK Cells." *Journal of Experimental Medicine* 205(1):233–44.
- Vignali, Dario A. A., Lauren W. Collison, and Creg J. Workman. 2008. "How Regulatory T Cells Work." *Nature reviews. Immunology* 8(7):523–32.
- Vincent, Isabelle E. et al. 2011. "Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells." *PloS one* 6(10):e26315.
- Wakkach, Abdelilah et al. 2003. "Characterization of Dendritic Cells That Induce Tolerance and T Regulatory 1 Cell Differentiation in Vivo." *Immunity* 18(5):605–17.
- Whitmire, Jason K. 2011. "Induction and Function of Virus-Specific CD4+ T Cell Responses." *Virology* 411(2):216–28.
- Wildin, R. S. et al. 2001. "X-Linked Neonatal Diabetes Mellitus, Enteropathy and Endocrinopathy Syndrome Is the Human Equivalent of Mouse Scurfy." *Nature genetics* 27(1):18–20.
- Wisse, E. 1970. "An Electron Microscopic Study of the Fenestrated Endothelial Lining of Rat Liver Sinusoids." *Journal of ultrastructure research* 31(1):125–50.
- Wisse, E., R. B. De Zanger, K. Charels, P. Van Der Smissen, and R. S. McCuskey. "The Liver Sieve: Considerations Concerning the Structure and Function of Endothelial Fenestrae, the Sinusoidal Wall and the Space of Disse." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 5(4):683–92.

- Wong, Phillip, and Eric G. Pamer. 2003. "CD8 T Cell Responses to Infectious Pathogens." *Annual review of immunology* 21:29–70.
- Wright, Teresa L. 2006. "Introduction to Chronic Hepatitis B Infection." *The American journal of gastroenterology* 101 Suppl :S1–6.
- Yan, Huan et al. 2012. "Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Is a Functional Receptor for Human Hepatitis B and D Virus." *eLife* 1:e00049.
- Yan, Jun, Martin J. Wolff, Julia Unternaehrer, Ira Mellman, and Mark J. Mamula. 2005. "Targeting Antigen to CD19 on B Cells Efficiently Activates T Cells." *International immunology* 17(7):869–77.
- Yang, Priscilla L., Alana Althage, Josan Chung, and Francis V Chisari. 2002. "Hydrodynamic Injection of Viral DNA: A Mouse Model of Acute Hepatitis B Virus Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21):13825–30.
- Yuen, Man-Fung, and Ching-Lung Lai. 2011. "Treatment of Chronic Hepatitis B: Evolution over Two Decades." *Journal of gastroenterology and hepatology* 26 Suppl 1:138–43.
- Zehn, Dietmar, and Michael J. Bevan. 2006. "T Cells with Low Avidity for a Tissue-Restricted Antigen Routinely Evade Central and Peripheral Tolerance and Cause Autoimmunity." *Immunity* 25(2):261–70.
- Zheng, Song Guo et al. 2006. "TGF-Beta Requires CTLA-4 Early after T Cell Activation to Induce FoxP3 and Generate Adaptive CD4+CD25+ Regulatory Cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176(6):3321–29.
- Zitvogel, Laurence, Oliver Kepp, and Guido Kroemer. 2010. "Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity." *Cell* 140(6):798–804.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Globale Verteilung chronischer HBV-Träger in der Gesamtbevölkerung...	4
Abb. 1-2	Aufbau und Übersicht der Virus (Dane)- und subviralen Partikel von HBV.....	6
Abb. 1-3	Genomorganisation von HBV.....	8
Abb. 1-4	Infektion und Replikation von HBV.....	9
Abb. 1-5	Verlauf einer (a) akuten und (b) chronischen HBV-Infektion.....	12
Abb. 1-6	Hauptmechanismen der direkten Suppression von T Zellen durch regulatorische T Zellen.....	23
Abb. 1-7	Schematische Darstellung des Aufbaus eines hepatischen Sinusoids.....	25
Abb. 3-1	Gating-Strategie zur Analyse Dextramer ⁺ CD8 ⁺ Zellen aus der Leber.....	52
Abb. 4-1	AdHBV-Infektion führt zur Toleranz von HBV-Antigenen ohne virale Hepatitis.....	56
Abb. 4-2	AdHBV-Infektion führt zu einer persistenten Etablierung HBV-infizierter Hepatozyten.....	57
Abb. 4-3	AdHBV-Infektion verhindert die Expansion HBV-spezifischer CTL.....	58
Abb. 4-4	AdHBV-Infektion supprimiert HBV-spezifische CTL-Effektorfunktionen....	60
Abb. 4-5	CD11c ⁺ DC vermitteln eine HBV-spezifische CTL-Antwort während akuter HBV-HDI Infektion.....	61
Abb. 4-6	Batf3 ⁺ DC kreuzpräsentieren HBV-Antigene zur Induktion einer CTL-Antwort.....	62
Abb. 4-7	DTX-vermittelte Depletion eGFP ⁺ DTR ⁺ Luciferase ⁺ T _{REG} Zellen in Foxp3.LuciDTR-4 Mäusen.....	64
Abb. 4-8	Applikationsschema der frühen DTX-vermittelten T _{REG} -Depletion.....	65
Abb. 4-9	T _{REG} -Depletion induziert virale Hepatitis nach AdHBV-Infektion.....	66
Abb. 4-10	T _{REG} -Depletion induziert verstärkte Immunzellantwort in der Leber nach AdHBV-Infektion.....	67
Abb. 4-11	T _{REG} -Depletion induziert keine iMATE-ähnlichen Strukturen nach AdHBV-Infektion.....	68
Abb. 4-12	T _{REG} -Depletion induziert HBs-spezifische Immunität nach AdHBV-Infektion.....	70

Abb. 4-13	T _{REG} -Depletion führt zu einer Reduktion HBV ⁺ Hepatozyten nach AdHBV-Infektion.....	71
Abb. 4-14	HBs-spezifische Immunität nach T _{REG} -Depletion führt nicht zur Klärung der AdHBV-Infektion.....	73
Abb. 4-15	T _{REG} -Depletion induziert keine anhaltende Hepatitis nach AdHBV-Infektion.....	74
Abb. 4-16	Applikationsschema der späten DTX-vermittelten T _{REG} -Depletion.....	75
Abb. 4-17	Späte T _{REG} -Depletion führt zu einer reduzierten viralen Hepatitis nach AdHBV-Infektion.....	76
Abb. 4-18	Späte T _{REG} -Depletion vermittelt eine HBs-spezifische Immunität nach AdHBV-Infektion.....	77
Abb. 4-19	Späte T _{REG} -Depletion reduziert HBV-infizierte Hepatozyten nach AdHBV-Infektion.....	78
Abb. 4-20	RTX-Applikation führt zu einer <i>in vivo</i> Depletion von B Zellen.....	79
Abb. 4-21	B Zell-Depletion verhindert HBs-spezifische Immunität.....	80
Abb. 4-22	B Zell-Depletion reduziert virale Hepatitis nach T _{REG} -Depletion und AdHBV-Infektion.....	81
Abb. 4-23	<i>Lm</i> -OVA- oder LCMV-Superinfektion induziert Expansion spezifischer CTL nach AdHBV-Infektion.....	83
Abb. 4-24	Applikationsschema externer Stimuli.....	84
Abb. 4-25	Immunmodulierende Stimuli können HBc-spezifische Toleranz nicht brechen.....	86
Abb. 5-1	Schematische Darstellung der Ebenen einer akuten, selbst-regulierenden oder persistenten HBV-Infektion.....	101

8 Abkürzungsverzeichnis

A

α	anti-
A20	Zink-Finger Protein A20
Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
Ad	Adenoviraler Vektor
Ak	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>), Allophycocyanin

B

BAFF	auch TNFSF13 genannt (<i>TNF superfamily, member 13</i>)
Batf3	<i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3</i>
BCR	B-Zell Rezeptor (<i>B-cell receptor</i>)
BHI	Hirn-Herz Boullion (<i>brain heart infusion</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CCL	Chemokin (CC-Motiv) Ligand
CD	zelluläres Oberflächenmolekül (<i>cluster of differentiation</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein N-succinimidyl Ester
cfu	<i>colony-forming unit</i>
ClCasp3	<i>cleaved caspase 3</i>
CPE	Zytopathischer Effekt (<i>cytopathic effect</i>)
CpG	TLR9-Ligand (<i>cytidine-guanosin sequence</i>)
CsCl	Cäsiumchlorid
CTL	zytotoxische CD8 ⁺ T Zelle (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>

D

DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dd	bi-destilliert (<i>double-distilled</i>)
DHBV	Enten Hepatitis B Virus (<i>duck hepatitis B virus</i>)
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTR	Diphtherie Toxin Rezeptor
DTX	Diphtherie Toxin

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	und andere (<i>et alius</i> , plural: <i>et alii</i>)

F

FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins (<i>constant fragment</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>), <i>forward scatter</i> bei der FACS-Analyse
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>

G

g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81 m/s ² ; <i>gravity</i>)
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GBSS	<i>Gey's Balanced Salt Solution</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)

H

h	Stunde (<i>hour</i>)
HBcAg	<i>hepatitis B core antigen</i>
HBeAg	<i>hepatitis B e antigen</i>
HBsAg	<i>hepatitis B surface antigen</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus

HCC	Hepatozelluläres Karzinom (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
HDI	Hydrodynamische Injektion
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
H&E	Hematoxylin & Eosin Färbung
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSC	Hepatische Sternzelle (<i>hepatic stellate cell</i>)
I	
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
iMATE	<i>intrahepatic myeloid-cell aggregates for T cell population expansion</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
i.p.	intraperitoneal
IU	internationale Einheit (<i>international unit</i>)
i.v.	intravenös
K	
k	Kilo
kb	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
Ki67	Antigen KI-67
L	
l	Liter
L	Ligand
LAL	Leber-assoziierte Lymphozyten (<i>liver-associated lymphocytes</i>)
LB	Luria-Bertani
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LIGHT	auch TNFSF14 genannt (<i>TNF superfamily, member 14</i>)
<i>L.m.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid, TLR4 Ligand
LSEC	sinusoidale Endothelzelle der Leber (<i>liver sinusoidal endothelial cell</i>)

Ly6G	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
M	
μ	Mikro
m	Meter bzw. milli
M	Molar
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min.	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
N	
n	nano
nd	nicht detektiert
NK	natürliche Killer Zellen (<i>natural killer cell</i>)
NKT	natürliche Killer T Zelle (<i>natural killer T cell</i>)
Nrp1	Neuropillin-1
ns	nicht signifikant
O	
OD ₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge von 600 nm
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
OVA	Ovalbumin
Ox40L	auch TNFSF4 genannt (<i>TNF superfamily, member 4</i>)
P	
<i>P</i>	<i>P</i> -Wert der Wahrscheinlichkeit (<i>probability value</i>)
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCp-Cy5.5	Peridinin-chlorophyll Protein, Cyanin5.5-gekoppelt
PFA	Paraformaldehyd

pfu	<i>plaque-forming units</i>
pgRNA	prä-genomische RNA
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
poly I:C	TLR3 Ligand (<i>polyriboinosinic-polyribocytidylic acid</i>)
PRR	Strukturerkennungs-Rezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
R	
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
RLU	relative Lichteinheit (<i>relative light unit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SIINFEKL	OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid
SSC	<i>sideward scatter</i> bei der FACS-Analyse
SVP	Sub-viraler Partikel (<i>subviral particle</i>)
T	
TBET	T-cell-specific T-box transcription factor
TCR	T Zell Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
Th	T Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{REG}	regulatorische T Zelle
TWEAK	auch TNFSF12 genannt (<i>TNF superfamily, member 12</i>)
U	
U	Unit
V	
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)

VCAM *vascular cell adhesion molecule*

W

w/v Gewichtsprozent (*weight per volume*)

wt Wildtyp

Z

z.B. zum Beispiel

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Percy Knolle für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion und der stetigen Unterstützung während dieser herzlich bedanken. Es hat mir ermöglicht, eine zielorientierte Arbeit zu leisten, welche mich nicht nur in beruflicher Hinsicht große Erfahrung hat sammeln lassen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Joachim Schultze als zweiter Begutachter meiner Promotion, sowie Frau Prof. Irmgard Förster und Herrn Prof. Anton Bovier für die weitere Begutachtung.

Ein großer Dank gilt meiner ehemaligen Kollegin und Supervisorin Dr. Li-Rung Huang für die Einführung in mein Dissertations-Thema und der unbezahlbaren Lehrerfahrung, ohne welches ich meine weitere Arbeit nicht so effektiv hätte bewältigen können. Und natürlich meiner Kollegin Ru-Lin Cheng mit welcher ich schon seit langer Zeit eine Arbeitsgruppe bilden darf.

Besonders dankbar bin ich der Arbeitsgruppe von Prof. Mathias Heikenwälder an der TU München, bei der es besonders durch die immer unterstützende Hilfe von Dr. Marc Ringelhan zu einer wirklich hervorragenden Publikation kommen durfte, nicht zuletzt durch die technische Unterstützung von Daniel und Ruth.

Mein spezieller Dank gilt all den lieben Kollegen aus dem IMMEI, welche immer eine herzliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre schafften und die zahlreichen Weihnachtsfeiern und Betriebsausflüge unvergesslich machen konnten.

Nicht zuletzt danke ich einigen besonderen Kollegen, welche schon seit einiger Zeit weitergezogen sind: Dr. Frank Schildberg für die fachliche Unterstützung und oft aufmunterndes Plaudern, Dr. Bastian Höchst für so manch lebensrettende technische Hilfe, Julita Mikulec für die lustigen gemeinsamen Dienstreisen und Kati Riethausen für die immer währende besondere Freundschaft. Nicht zu vergessen die Unterstützung unserer Core-Facility, unseren besten Spülfrauen und Tierpflegern des IMMEIs und natürlich dem Sekretariat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und deren Verständnis sowie aufmunternder Unterstützung im Erreichen meines großen Ziels. Danke dafür!