

Der Einfluss von CD4+ T Zellen auf die akute Virushepatitis

Dissertation
Zur Erlangung der Würde des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie,
der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Tanja Trautmann
aus Stolberg (Rhld.)

Hamburg, Februar 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. J. HERKEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 05. April 2013

Hamburg, den 21. März 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Gutachter

1. PD Dr. Johannes Herkel

I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Prof. Dr. Thomas Dobner

Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie and der
Universität Hamburg

**Et es, wie et es.
Et kütt, wie et kütt.
Et hätt noch immer jot jejange.**

Rheinisches Grundgesetz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Die virale Hepatitis	- 1 -
1.2	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus (LCMV).....	- 3 -
1.3	Die humorale Immunantwort	- 5 -
1.4	Die zelluläre Immunantwort und die Schädigung der Leber	- 6 -
1.4.1	Zellen des angeborenen Immunsystems	- 6 -
1.4.2	Die adaptive Immunantwort	- 7 -
1.4.3	Zytotoxische CD8+ T Zellen (CTL)	- 8 -
1.4.4	Die Chronifizierung von Hepatitiden.....	- 11 -
1.4.5	Die Erschöpfung der CD8+ T Zell-Antwort	- 12 -
1.4.6	CD4+ T Zellen.....	- 13 -
1.5	Der Einfluss von CD4+ T Zellen auf die akute und chronische Virushepatitis (HBV/HCV)	- 15 -
1.6	Der Einfluss hepatozellulärer Aktivierung von CD4+ T Zellen in der viralen Hepatitis.....	- 17 -
1.7	Transgene und knockout Mauslinien zur Untersuchung des Einflusses der CD4+ T Zell-Hilfe auf die virale Hepatitis	- 19 -
1.8	Zielsetzung.....	- 20 -
2	Material und Methoden	- 21 -
2.1	Geräte	- 21 -
2.2	Materialien	- 22 -
2.3	Puffer und Lösungen	- 26 -
2.4	Primer für die Polymerase-Kettenreaktion.....	- 28 -
2.5	Versuchstiere und ihre Behandlung.....	- 29 -
2.6	Zellbiologische Methoden	- 31 -
2.6.1	Zellkulturmedien.....	- 31 -
2.6.2	Bestimmung der Zellzahl.....	- 31 -
2.6.3	L929 Zellen.....	- 31 -

2.6.4	Herstellung von Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV)	- 32 -
2.6.5	Bestimmung des LCMV Titers mittels Focus Forming Assay (FFA)	- 32 -
2.6.6	Isolation primärer Zellen.....	- 35 -
2.6.7	Restimulation von Zellen.....	- 36 -
2.6.8	Lebend/tot Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie	- 37 -
2.6.9	Färbung von Oberflächenmarkern	- 37 -
2.6.10	Färbung LCMV-spezifischer Zellen	- 38 -
2.6.11	Intrazelluläre Färbung.....	- 39 -
2.6.12	Durchflusszytometrie.....	- 39 -
2.7	Histologie	- 40 -
2.7.1	Präparation der Organe	- 40 -
2.7.2	Absteigende Alkoholreihe	- 40 -
2.7.3	Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung von Paraffinschnitten.....	- 41 -
2.7.4	MHC II Färbung im Paraffinschnitt.....	- 41 -
2.7.5	Aufsteigende Alkoholreihe	- 42 -
2.7.6	Färbung von LCMV Nukleoprotein im Kryoschnitt.....	- 42 -
2.8	Molekularbiologische Methoden	- 43 -
2.8.1	RNA-Isolation aus Lebergewebe	- 43 -
2.8.2	cDNA-Synthese	- 43 -
2.8.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 43 -
2.9	Statistische Auswertung	- 45 -
3	Ergebnisse	- 46 -
3.1	Charakterisierung des Lymphozytenkompartiments	
	von CIITA^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen	- 46 -
3.2	Kinetik der LCMV Infektion.....	- 50 -
3.2.1	Vergleich des Virustiters mittels Focus Forming Assay (FFA)	- 50 -
3.2.2	Analyse des LCMV Z-Protein mRNA-Spiegels in der Leber.....	- 51 -
3.2.3	Färbung des LCMV Nukleoproteins im Leberschnitt.....	- 52 -
3.3	LCMV Infektion nach CD4⁺ T Zell-Depletion	- 54 -
3.4	Serumtransaminasen nach LCMV Infektion.....	- 57 -

3.5	Histologische Untersuchung der Leber.....	- 60 -
3.6	Analyse von Milzzellen und mononukleären Leberzellen.....	- 61 -
3.6.1	Gesamtzellzahlen in Milz und Leber	- 61 -
3.6.2	Anzahl von NK-Zellen, NKT-Zellen, Makrophagen und B-Zellen	- 63 -
3.6.3	Analyse der Gesamt-CD8+ T Zellzahl.....	- 65 -
3.7	Funktionelle Analyse der CD8+ T Zellantwort.....	- 66 -
3.7.1	Analyse der virusspezifischen CD8+ T Zell-Antwort	- 66 -
3.7.2	Aktivierung der CD8+ T Zellen.....	- 68 -
3.7.3	Zytokinproduktion der CD8+ T Zellen.....	- 71 -
3.7.4	Degranulation der CD8+ T Zellen	- 74 -
3.7.5	Exhaustion der CD8+ T Zellen	- 78 -
3.8	MHC II Expression auf Hepatozyten von C57BL/6 Wildtyp Mäusen nach LCMV-WE Infektion	- 79 -
3.9	Einfluss von hepatozellulär aktivierten CD4+ T Zellen auf die Gedächtnis-CD8+ T Zell-Antwort.....	- 81 -
4	Diskussion.....	- 84 -
4.1	Der Einfluss fehlender CD4+ T Zell-Hilfe auf den Verlauf der LCMV Infektion und die Etablierung einer zytotoxischen CD8+ T Zell-Antwort.....	- 84 -
4.2	Die hepatozelluläre MHC II Expression in C57BL/6 Mäusen nach LCMV Infektion und in CIITA transgenen Mäusen	- 92 -
4.3	Ausblick	- 94 -
5	Zusammenfassung	- 96 -
6	Literatur	- 98 -
7	Abkürzungen.....	- 112 -
8	Kongressbeiträge	- 115 -
9	Danksagung.....	- 116 -

1 Einleitung

1.1 Die virale Hepatitis

Die virale Hepatitis ist eine durch eine virale Infektion verursachte Leberentzündung (griechisch hepar = Leber und -itis = Entzündung). Neben Begleithepatitiden, die im Zusammenhang mit einer systemischen Infektion mit z. B. Cytomegalie-Virus (CMV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV) auftreten, ist die Hauptursache für virale Leberentzündungen die Infektion mit den Hepatitis Viren A-E, einer heterogenen Gruppe hepatotropher Erreger. Vor allem Infektionen mit Hepatitis B- (HBV) oder C-Virus (HCV) können dabei einen chronischen Verlauf nehmen. Infektionen mit Hepatitis D- (HDV) und Hepatitis E-Virus (HEV) können ebenfalls chronifizieren. HDV chronifiziert jedoch nur bei einer Koinfektion mit HBV, und chronische Fälle von HEV wurden bisher nur in immunsupprimierten Personen beobachtet [1]. HBV ist mit ca. 2 Mrd. schon einmal infizierten Menschen [2] die häufigste Virusinfektion weltweit. Während bei ca. 90 % der infizierten Erwachsenen die Infektion spontan ausheilt, nehmen ca. 10 % einen chronischen Verlauf, wobei die Rate bei Kindern und immunsupprimierten Personen noch deutlich höher liegt. Ca. 240 Mio. Menschen sind weltweit chronisch mit HBV infiziert und jährlich sterben ca. 0,6 Mio. Menschen an den Folgen [3].

Ca. 3 % der weltweiten Bevölkerung sind mit HCV infiziert [4] und jedes Jahr infizieren sich weltweit ca. 3 – 4 Mio. Menschen neu [5]. Hierbei nimmt, mit ca. 80 % der Fälle, ein deutlich größerer Anteil einen chronischen Verlauf [6]. Weltweit sind ca. 150 Mio. Menschen chronisch mit HCV infiziert [5].

Weder HBV noch HCV haben eine direkte zytopathische Wirkung, d. h. die Pathogenese der Hepatitis beruht auf immunologisch vermittelten Effekten in der Leber und spielt eine große Rolle für den Verlauf der Infektion [7]. Die Schädigung der Leber während der Infektion kann anhand eines Anstiegs von Lebertransaminasen wie der

Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum näherungsweise bestimmt werden. Normalerweise befinden sich diese Enzyme innerhalb der Leberzellen. Bei einer Schädigung werden sie freigesetzt und die Konzentration im Serum steigt an. In einer akuten Hepatitis kann die immun-vermittelte Leberschädigung durch angemessene Reparaturmechanismen kompensiert und die Leberfunktion aufrechterhalten werden [8]. In der chronischen Infektion wird das Virus nicht vollständig eliminiert. Durch die dauerhafte Aktivierung des Immunsystems kommt es zu einer anhaltenden Entzündung und zur kontinuierlichen Zerstörung der Leberzellen [7]. Während der dadurch bedingten ständigen Proliferation und Regeneration der Zellen kommt es zu aberranter Reparatur und so zu Leberfibrose [9]. Diese kann nach Jahren zu einer Zirrhose und schließlich zu Leberkrebs führen [7, 8]. Leberkrebs ist bei Männern die fünft häufigste und bei Frauen die siebt häufigste Form von Krebs [10]. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um ein hepatozelluläres Karzinom (HCC - hepatocellular carcinoma) [10] mit einer 5-Jahres Überlebensrate von nur 11 % [6]. So sind 80 % der HCC mit einer Hepatitis B oder C Infektion assoziiert [10] und bilden die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation [11].

Die genauen Faktoren, die zur Chronifizierung einer Hepatitis führen, sind noch nicht hinreichend bekannt. Um neue Ansätze für die Eliminierung der Infektion zu finden und eine Chronifizierung zu verhindern, ist es essentiell zu verstehen, welche Mechanismen und Bedingungen zur Chronifizierung führen.

1.2 Lymphozytäres Choriomeningitis Virus (LCMV)

HBV und HCV Infektionen sind auf Mensch und Schimpanse limitiert. Kleine Tiermodelle und Zellkultursysteme, die für HBV und HCV suszeptibel sind, stehen daher nicht zur Verfügung [7]. Die molekularen Mechanismen, welche den Verlauf einer klinischen Hepatitis im Menschen bestimmen, sind jedoch ähnlich zu denen in der Maus [12].

Ein sehr gutes und intensiv beforschtes Modell zur Studie der Immunologie von Virusinfektionen ist die Infektion von Mäusen mit Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) [13-15], wobei die Maus auch der natürliche Wirt des Virus ist [16]. LCMV ist, genau wie HBV und HCV, nicht-zytopathisch, d. h. die Pathogenese der Hepatitis, die im Laufe der Infektion auftritt, wird nur durch die Immunreaktion und nicht durch das Virus selbst vermittelt [17, 18]. Die Klärung der Infektion ist vor allem von der zytotoxischen CD8+ T Zell- (CTL)-Antwort abhängig [19, 20], durch die Virus-befallene Zellen eliminiert werden, um so die Infektion einzudämmen. Die Stärke der Schädigung bestimmen Virusstamm, Infektionsdosis und -route und der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC- Major Histocompatibility Complex) Haplotyp des Wirtes [18, 21, 22].

LCMV gehört zum Stamm der Arenaviridae. Arenaviren haben ein negatives, einzelsträngiges RNA Genom. Dieses kodiert für ein Nukleoprotein (NP), ein Glykoprotein (GP), die RNA-Polymerase und das kleine RING Finger Z-Protein (RING - really interesting new gene), welches für Reifung und Knospung der Virionen verantwortlich ist [22]. GP ist das einzige Oberflächenantigen des Virus und vermittelt Rezeptorbindung und Membranfusion. GP und NP sind die primären Ziele der antiviralen zytotoxischen T Zell-Antwort (s. Abb. 1). Der LCMV Infektionsverlauf ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie der Infektionsdosis, dem Virusstamm und seiner

jeweiligen Replikationsfähigkeit [23]. Am bekanntesten sind die Stämme Armstrong und WE, die eine akute Infektion verursachen und die von ihnen abgeleiteten Stämme Clone 13 (von Armstrong) und Docile (von WE), die vornehmlich zu einer chronischen Infektion führen. Der Stamm LCMV-WE löst eine akute virale Hepatitis aus, wobei eine niedrige Infektionsdosis (200 Focus Forming Units (FFU)) mit LCMV-WE noch nicht zur Infektion der Leber in C57BL/6 Wildtyp Mäusen führt. Eine hohe Infektionsdosis (10^6 FFU) dagegen führt durch eine verlängerte Virämie (im Vergleich zum Armstrong-Stamm) nach initialer Infektion von Kupffer-Zellen, den residenten Makrophagen der Leber, auch zu einer Infektion von Hepatozyten [21, 22]. Die Infektion mit einer hohen Dosis LCMV-WE verläuft akut, wobei das Virus innerhalb von zwei Wochen eliminiert und die Leberentzündung beendet wird [12, 22].

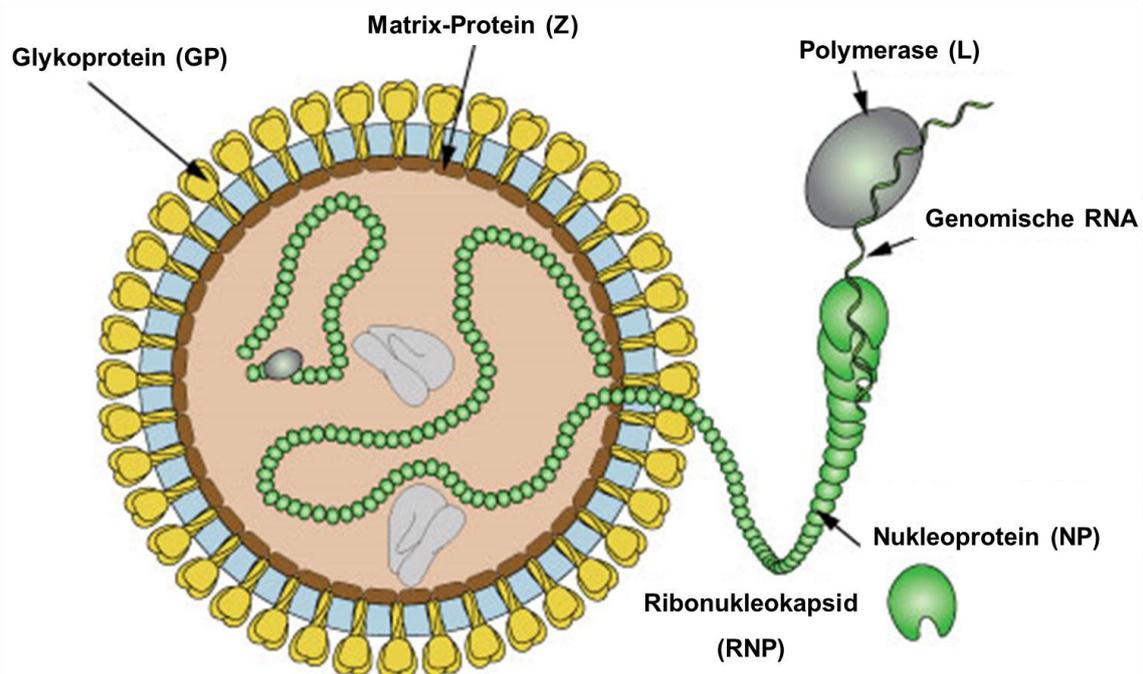


Abb. 1: Aufbau des Lympozytären Choriomeningitis Virus bestehend aus Glykoprotein (GP), Nukleoprotein (NP), Polymerase (L) und dem Matrix-Protein (Z).

Modifiziert nach ViralZone, Arenaviridae Molecular Biology [24].

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/501.html#tab6

1.3 Die humorale Immunantwort

Als humorale Immunantwort wird die Antikörperproduktion von B-Zellen bezeichnet. CD4+ T Zell-Hilfe ist hier unabdingbar für die klonale Expansion und Reifung von B-Zellen, sowie für die Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen [25, 26]. So ist auch die Antikörper-Antwort nach einer LCMV Infektion CD4+ T Zell-abhängig und CD4-/- Mäuse etablieren keine neutralisierenden Antikörper [23]. Allerdings sind diese lediglich wichtig für die Langzeitkontrolle von LCMV [27-30]. So können neutralisierende Antikörper auch in Wildtyp Mäusen erst an Tag 50 bis 80 und nur in geringen Mengen, lange nach Klärung der Infektion, detektiert werden, [27, 31, 32] (s. Abb. 2). In der frühen Phase der Infektion genügt die T Zell-vermittelte Immunität allein für die Kontrolle des Virus, und B-Zellen sind nicht an der Bildung von primären (und Gedächtnis-) T Zell-Antworten beteiligt [33]. HCV z. B. kann auch ohne humorale Immunantwort in hypogammaglobulinaemischen Patienten geklärt werden [34]. B-Zellen bzw. neutralisierende Antikörper sind also nicht notwendig für die Eliminierung von LCMV und anderen nicht-zytopathischen Viren wie HBV und HCV.

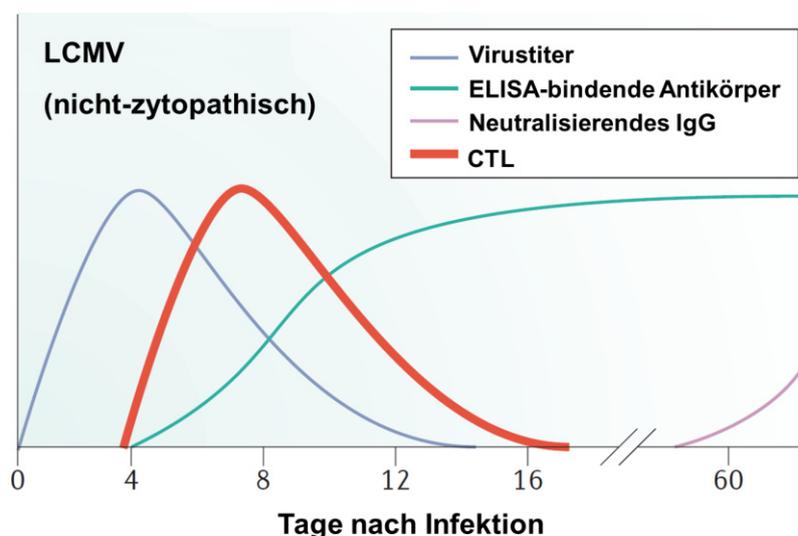


Abb. 2: Die antivirale Antikörper-Antwort nach einer akuten LCMV Infektion.

Bei der Infektion erwachsener Mäuse kontrolliert die zytotoxische CD8+ T Zell-Antwort das Virus. Neutralisierende Antikörper tragen normalerweise nicht zur akuten Phase der Infektion bei, sondern entwickeln sich erst um Tag 50 - 80 nach Infektion. Modifiziert nach Hangartner, 2006 [31].

1.4 Die zelluläre Immunantwort und die Schädigung der Leber

1.4.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind für ihre Entwicklung abhängig vom Knochenmark [35]. Neben ihrem Vorkommen in Blut und Milz [35], gibt es sie vor allem in der Leber [4, 36]. Klassische NK-Zellen sind Lymphozyten ohne TCR [35], dabei haben CTL und NK-Zellen gemeinsame Effektormechanismen. Sie töten Zellen über Granula- und Fas-vermittelte Signalwege [37] sowie über die Sekretion von IFN γ [36] und können so einen direkten zytotoxischen Effekt auf infizierte Hepatozyten ausüben [36]. NK-Zellen werden allerdings über unveränderliche Rezeptoren aktiviert. Sie dämpfen virale Infektionen ein, während CTL das Virus eliminieren können [38].

Natürliche Killer T Zellen (NKT-Zellen)

Auch Natürliche Killer T Zellen (NKT) vermitteln u. a. Resistenz und können ebenfalls zur Eliminierung von Infektionen beitragen [39]. NKT-Zellen sind in der Leber weit verbreitet und müssen bei einer Infektion nicht dorthin rekrutiert werden, wodurch sie bei einer viralen Hepatitis eine besondere Rolle spielen könnten [40]. Sie exprimieren sowohl einen invarianten α/β TCR als auch einen NK-Zell-Rezeptor [39, 41] und bilden einen großen Teil der T Zellen in der Leber [35, 42]. Während ihrer Entwicklung im Thymus zweigen NKT-Zellen von der Entwicklung der T Zell-Vorläufer ab und generieren einen TCR. Dieser interagiert mit CD1d [39], welches Ähnlichkeiten zu MHC I aufweist [39]. Darüber hinaus besitzen sie Pattern-Recognition Receptors (PRR), die konservierte Regionen von Pathogenen erkennen, wodurch die Zelle aktiviert werden kann.

Makrophagen

Auch Makrophagen, wie die Kupffer-Zellen in der Leber, können eine Rolle in der Infektion spielen: Sie sezernieren Chemokine und inflammatorische Zytokine wie IL-12 und IL-18, die die Produktion von IFN γ induzieren können [40]. Außerdem können sie Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α sezernieren, die selbst direkte und indirekte antivirale Effekte haben können [40].

1.4.2 Die adaptive Immunantwort

Praktisch alle Leberschädigungen in der viralen Hepatitis werden durch das zelluläre adaptive Immunsystem vermittelt [7], wobei auch nicht-Antigen-spezifische Zellen wie Neutrophile Granulozyten [43], mononukleäre Zellen [44] und Thrombozyten [7] in die Leber rekrutiert werden und den Schaden verstärken können, ohne dabei zur Viruskontrolle beizutragen [45, 46].

Die Effektorzellen der zellulären adaptiven Immunantwort sind CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T Zellen, wobei vor allem CD8 $^+$ T Zellen die Leberschädigung bewirken [12]. Sie töten Virus-befallene Zellen und unterbinden so die weitere Ausbreitung der Infektion. Die Vorläufer von T Zellen werden im Knochenmark gebildet und migrieren zum Thymus zur Reifung. Durch Rekombination genetischer Elemente bilden einzelne T Zellen einen klon-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR - T cell receptor), der die Antigen-spezifität der Zellen bestimmt. Dieser erkennt Antigene in Form von Peptiden, die an Moleküle des (MHC) gebunden sind [47] und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. CD8 $^+$ T Zellen erkennen Antigene im Zusammenhang mit MHC I-Molekülen und CD4 $^+$ T Zellen im Kontext von MHC II-Molekülen. Für die Aktivierung von naiven T Zellen und deren anschließende Differenzierung in Effektor-T Zellen ist ein primäres Signal über den TCR und weitere Signale über den CD4- bzw. CD8-Korezeptor und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 erforderlich [48].

1.4.3 Zytotoxische CD8+ T Zellen (CTL)

Zytotoxische CD8+ T Zellen (CTL) sind die Schlüsselfaktoren in der adaptiven zellulären Immunantwort [48], und die Notwendigkeit einer effizienten CTL-Antwort für die Klärung einer akuten LCMV Infektion ist unumstritten [49-55]. Die Generierung von Effektor-CTL erfordert drei aufeinanderfolgende Signale: 1. TCR-Bindung, 2. Kostimulatorische Signale z. B. durch CD28-B7 Interaktion und 3. IL-2-vermittelte Signale. Naïve CD8+ T Zellen exprimieren kein IL-2 oder die entsprechenden Rezeptoren, die erst nach TCR- und CD28-vermittelter Stimulation induziert werden [48].

Zytotoxische CD8+ T Zellen vermitteln die Viruselimination auf unterschiedliche Art und Weise: Granula-abhängige (Perforin-Granzym-abhängige) Apoptose im direkten Zell-Zell-Kontakt [56] oder über die Ausschüttung antiviraler Zytokine und Chemokine [57], die ebenfalls zu Apoptose führen oder die virale Replikation inhibieren [7, 40, 48].

a) Die Perforin-Granzym-abhängige Zytotoxizität

CTL enthalten Granula, membrangebundene sekretorische Lysosomen, welche u. a. Perforin und Granzyme (= granule-enzymes) beinhalten [58], eine Familie von strukturell verwandten Serin-Proteasen [59]. Die Membran der Granula besteht aus einer Lipid-Doppelschicht mit lysosomal assoziierten Membran-Glykoproteinen (LAMP), u. a. CD107a (LAMP-1) [58]. CD107 ist normalerweise nicht auf der Zelloberfläche von T Zellen zu finden. Kurz nach TCR-Stimulation, bei der CTL und eine spezifisch erkannte Zielzelle eine immunologische Synapse bilden, degranulieren die so aktivierten CD8+ T Zellen. Hierbei werden die Granula zur Zellmembran an der immunologischen Synapse transportiert, die zwischen CTL und Zielzelle gebildet wurde [37]. Sobald die Granula die Plasmamembran der CTL erreichen, fusionieren die beiden Membranen [58]. CD107 gelangt so an die Oberfläche der Zelle und kann als Marker für die Degranulationsfähigkeit der Zelle genutzt werden (s. Abb. 3). Bei der Fusion schütten die

Granula ihren Inhalt in die immunologische Synapse aus, was letztlich zum Tod der Zielzelle führt [60]. Die ursprüngliche Annahme, dass Perforin ein Poren-formendes Protein sei, welches polymerisiert, um eine Pore in der Zielzellmembran zu bilden [37], durch die Granzyme dann in die Zelle gelangen, gilt inzwischen als überholt [61]. Vielmehr verursacht Perforin mikroskopisch kleine Löcher in der Zellmembran, wodurch Ca^{2+} in die Zelle einströmt und Reparaturmechanismen der Zelle ausgelöst werden, im Zuge derer Granzyme und andere Moleküle an der Zelloberfläche, internalisiert werden [61]. Granzym B kann indessen auch durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor in die Zelle gelangen. Die Degranulation ist die Voraussetzung für die Perforin/Granzym-vermittelte Zelltötung und ein essentieller Schritt in der lytischen Funktion von Antigen-spezifischen CD8^+ T Zellen [56].

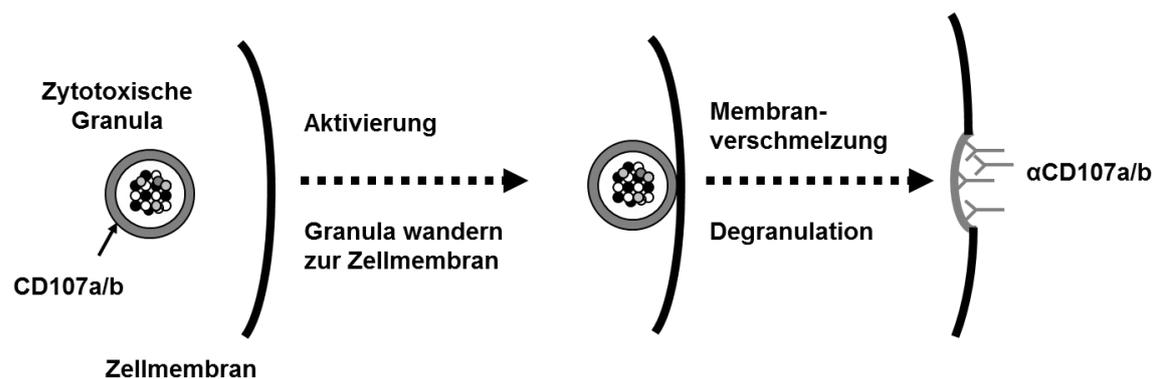


Abb. 3: Fusion von zytotoxischen Granula mit der Membran der zytotoxischen CD8^+ T Zelle (CTL), bei der CD107 auf die Oberfläche der T Zelle gelangt.

Modifiziert nach Betts, 2004 [62].

b) Die Zytokin-abhängige Zytotoxizität

Die Hemmung der Hepatitis-Virusreplikation ist nicht nur von der Abtötung der Virus-befallenen Zellen über Zell-Zell-Kontakte abhängig. Es gibt i. d. R. sehr viel mehr Virus-befallene Zellen als CTL, so dass nicht alle infizierten Zellen in direktem Zell-Zell-Kontakt getötet werden können [40]. Die effiziente Eliminierung des Virus über $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ spielt dabei eine große Rolle [40], wie es zuerst in HBV transgenen

Mäusen gezeigt wurde [57, 63]. $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ können über verschiedene Wege ihre antivirale Wirkung ausüben. Wenn $\text{TNF}\alpha$ an den TNF-Rezeptor bindet, wird dadurch die Caspase-Kaskade ausgelöst, die zur Apoptose der Zelle führt. In immunkompetenten Mäusen geschieht dies u. a. durch LSEC kreuzaktivierte CTL, wodurch TNF-vermittelt eine virale Hepatitis ausgelöst wird [64]. $\text{IFN}\gamma$ induziert die transkriptionelle Aktivierung der MHC I Antigen Präsentation und von Fas (CD95) in den Zielzellen, was zu vermehrter Präsentation von endogenen Peptiden durch MHC I führt oder zu vermehrter Fas-vermittelter Apoptose (s. Abb. 4).

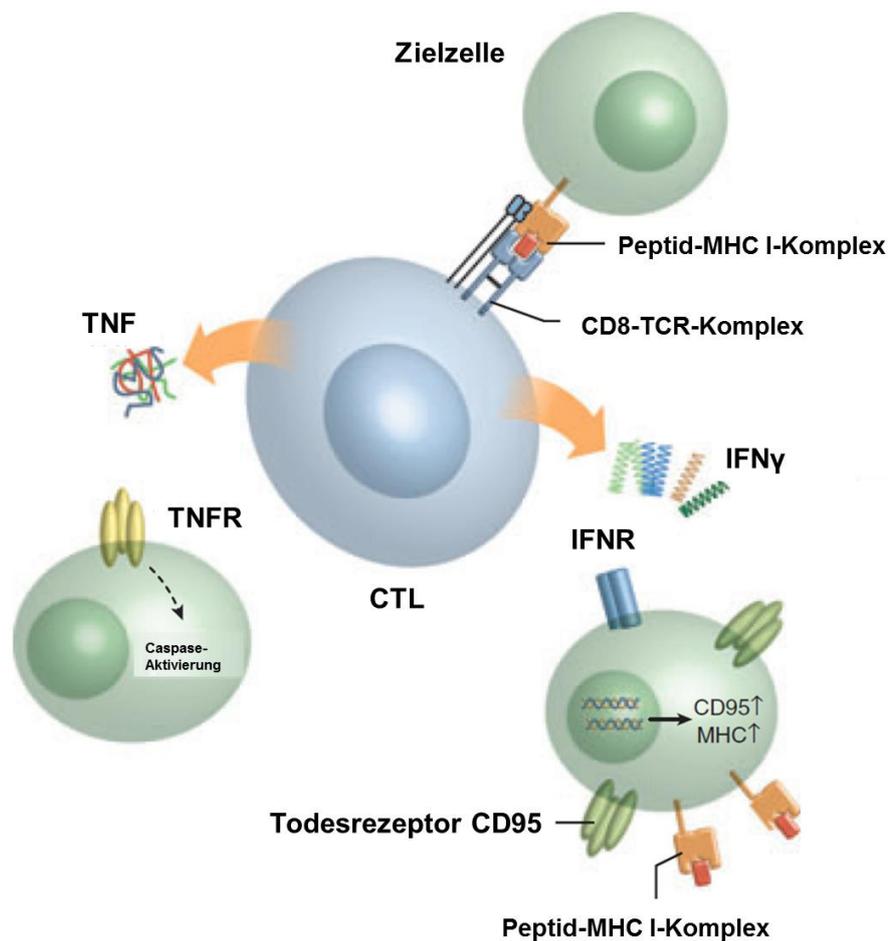


Abb. 4: Die indirekte antivirale Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$.
Modifiziert nach Andersen, 2006 [48].

IFN γ und TNF α tragen auch durch nicht-zytopathische Mechanismen zur Viruselimination und zur Klärung der Hepatitis bei [57, 65]. So können sie weitere inflammatorische Zellen wie Makrophagen, NK-Zellen und T Zellen zum infizierten Gewebe rekrutieren und aktivieren. Sie können T Zell-Antworten polarisieren, damit sie antivirale Effektorfunktionen entwickeln und für die effektive Kontrolle des Virus sorgen. Außerdem besitzen sie auch eine direkte antivirale Aktivität [40]. Die direkten antiviralen Effekte der Zytokine werden durch die Induktion zellulärer Signalwege vermittelt, die mit einem oder mehreren Stadien der Virusreplikation interferieren [40]. So wird das Virus aus der Zelle entfernt, ohne deren Integrität zu zerstören [40], virale RNA kann abgebaut oder die virale Proteinsynthese unterdrückt werden [40]. Dabei ist die Inhibierung subgenomischer und genomischer HCV RNA 100 bis 1000 mal effektiver als Zytotoxizität [66].

1.4.4 Die Chronifizierung von Hepatitiden

Nach aktuellem Forschungsstand sind die genauen Mechanismen, die zur Chronifizierung von Hepatitiden führen, noch nicht im Detail aufgeklärt. Faktoren, die einen Beitrag zur Chronifizierung leisten, sind z. B. Escapemutanten des Virus [67], die durch ihre Mutation der immunologischen Erkennung entgehen, und regulatorische Zellen [68], die zu einer Abschwächung der Entzündung führen.

Vor allem aber ist die chronische Hepatitis durch eine ineffiziente T Zell-Antwort charakterisiert. So zeigten Schimpansen, in denen die Infektion mit HCV in einer akuten Infektion eliminiert wurde, starke CTL-Antworten. Die Tiere, in denen die Infektion chronifizierte, hatten dagegen nur eine schwächere und verzögerte Immunantwort gegen das Virus [69, 70]. Außerdem spielt bei der Chronifizierung von Hepatitiden die Erschöpfung von CD8+ T Zellen, die sogenannte „Exhaustion“, eine große Rolle.

1.4.5 Die Erschöpfung der CD8+ T Zell-Antwort

Die T Zell-Erschöpfung oder „Exhaustion“ wurde das erste Mal in der LCMV Infektion beschrieben [71]. Werden CD8+ T Zellen dauerhaft durch Antigen stimuliert, wie es bei einer chronischen Infektion der Fall ist, kommt es zur „Exhaustion“. Dabei handelt es sich um den Funktionsverlust aktivierter, Antigen-spezifischer T Zellen und ihre anschließende Deletion [72, 73]. Sowohl in der Maus, als auch in der HBV und HCV Infektion des Menschen sind erschöpfte T Zellen in chronischen Infektionen bekannt. Wie in Mäusen korreliert auch im Menschen die Stärke der Exhaustion mit der Höhe der Viruslast und einer geringen CD4+ T Zell-Hilfe [74, 75].

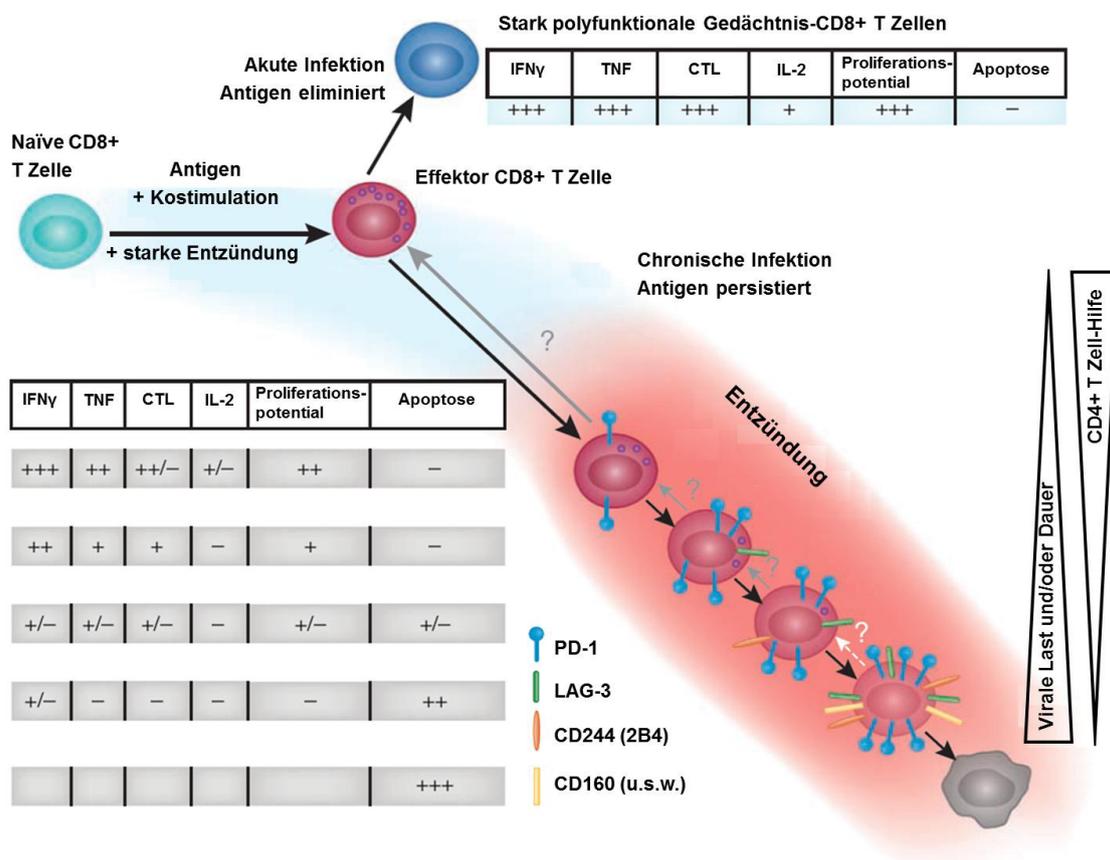


Abb. 5: Sukzessiver Funktionsverlust und Expression inhibitorischer Moleküle bei der Erschöpfung („Exhaustion“) von CD8+ T Zellen.

Modifiziert nach Wherry, 2011 [77].

Dieser Mechanismus dient normalerweise dazu, eine überschießende Immunreaktion zu dämpfen. Im Fall einer andauernden Antigen-spezifischen Stimulation der Zellen während

einer chronischen Infektion jedoch, beginnen die Zellen ebenfalls inhibitorische Moleküle zu exprimieren und verlieren so ihre Funktion. Dieser Zustand ist durch zwei Dinge charakterisiert: Es kommt zum sukzessiven Funktionsverlust und gleichzeitig zu einer Zunahme der Expression inhibitorischer Moleküle auf der Oberfläche (s. Abb. 5). Zunächst verlieren die Zellen die Fähigkeit, IL-2 zu produzieren, sowie ihre hohe proliferative Kapazität und ihre *ex vivo* Zytotoxizität. In einem intermediaten Stadium verlieren die Zellen dann die Fähigkeit, TNF α zu produzieren. Bei starker Erschöpfung verlieren die Zellen zuletzt auch die Fähigkeit, IFN γ zu produzieren und zu degranulieren [77]. Von den inhibitorischen Molekülen wird PD-1 (Programmed Death-Receptor 1) als erstes auf virusspezifischen CD8+ T Zellen in einer chronischen Infektion exprimiert [78, 79]. Interagiert der Rezeptor PD-1 mit seinem Liganden PD-L1 auf der Oberfläche von LSEC, Kupffer-Zellen, Itozellen oder Hepatozyten, inhibiert dies die Effektorfunktionen der Zelle und induziert Apoptose [80]. Die Blockade von PD-1/PD-L1 Interaktionen führt zur Wiederherstellung der Funktionalität von CD8+ T Zellen, die so eine Chronifizierung der Infektion verhindern können [78, 81].

1.4.6 CD4+ T Zellen

Während die Bedeutung von CD8+ T Zellen in viralen Infektionen sehr gut aufgeklärt ist und z. B. gezeigt wurde, dass die Depletion von CD8+ T Zellen in der akuten LCMV Infektion dazu führt, dass die Infektion nicht eliminiert werden kann [53], ist der Einfluss von CD4+ T Zellen nicht einwandfrei aufgeklärt [82-84]. Ob die Etablierung der CTL-Antwort in der viralen Hepatitis CD4+ T Zell-Hilfe benötigt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [82].

CD4+ T Zellen können antivirale Zytokine sezernieren und für die Funktion von B-Zellen und CTL Hilfe leisten. CD4+ T Zellen differenzieren je nach Gewebe und Zytokinmilieu in verschiedene Effektorpopulationen [85]: Th1, Th2, Th17 und regulatorische T Zellen

(Treg), wobei hier nur auf Th1 und Th2 Zellen näher eingegangen werden soll. Th1 Zellen sezernieren IL-2, TNF α und IFN γ , die eine antivirale Wirkung besitzen und zu einer entzündlichen Immunantwort beitragen, die zur Eliminierung des Virus führt. Th2 Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und haben so einen weniger entzündlichen Phänotyp [86], der eher B-Zell-Hilfe begünstigt.

CD4⁺ T Zellen tragen zu ganz unterschiedlichen Anteilen und in komplexer Art und Weise zur antiviralen Effektorantwort bei. Sie können zur Rekrutierung lymphoider Zellpopulationen in sekundäre lymphoide Gewebe oder zum Ort der Infektion beitragen. Außerdem können sie direkte Effektorfunktionen ausüben oder Hilfe für die Expansion anderer Effektorzellen leisten, z. B. zur Expansion von CTL [84]. Für diese Expansion von Effektorzellen ist die Rolle der CD4⁺ T Zell-Hilfe je nach Infektion unterschiedlich [87]. Mehrfach gezeigt wurde, dass CD4⁺ T Zellen eine essentielle Rolle bei der Klärung von chronischen Infektionen spielen [73, 88-92]. Unter diesen Bedingungen sind CD8⁺ T Zellen auf eine anhaltende Expansion angewiesen, für die die Zytokinproduktion der CD4⁺ T Zellen essentiell ist [91, 93, 94]. So ist z. B. die IL-21 Produktion durch CD4⁺ T Zellen während einer chronischen Infektion essentiell für die Aufrechterhaltung funktionaler zytotoxischer CD8⁺ T Zellen, die dann in der Lage sind, die Infektion zu eliminieren [77, 93-95]. Die Interaktion zwischen erschöpften CD8⁺ T Zellen und CD4⁺ T Zellen während einer chronischen Infektion mit LCMV kann die CD8⁺ T Zell-Antwort sogar wiederherstellen [91]. Auch die dauerhafte Kontrolle einer LCMV Infektion ist von einer effektiven CD4⁺ T Zell-Hilfe abhängig [96, 97]. Gezeigt wurde dies durch eine wiederauftretende LCMV Virämie in CD4⁺ T Zell-defizienten Mäusen [97]. Ebenfalls unabdingbar sind CD4⁺ T Zellen für die Bildung und Aufrechterhaltung von effektiven virusspezifischen Gedächtnis-CD8⁺ T Zellen [98-101], auch in Infektionen, in denen die primäre CD8⁺ T Zell-Antwort unabhängig von

CD4+ T Zell-Hilfe ist [99, 101, 102]. So verbessert die parakrine IL-2 Produktion von CD4+ T Zellen während des initialen Primings von CD8+ T Zellen in der LCMV Infektion stark das Potential der Gedächtnis-T Zell-Antwort [103]. Ob für eine effektive CD8+ T Zell-Antwort CD4+ T Zell-Hilfe benötigt wird, hängt davon ab, welche Komponenten der angeborenen Immunantwort nach der Infektion aktiviert werden und in welchem Ausmaß [85]. CD4+ T Zellen scheinen keine große Rolle in Infektionen zu spielen, in denen es über dendritische Zellen zu einer starken Toll-Like-Rezeptor-(TLR)-Bindung und Sekretion von IFN-I kommt, die eine starke CD8+ T Zell-Antwort begünstigt [104]. (TLR gehören zur Gruppe der PRR und erkennen konservierte Strukturen von Pathogenen.) Hier kann das Virus ohne CD4+ T Zell-Hilfe geklärt werden [84]. Für die akute Infektion mit LCMV wird angenommen, dass sie der Prototyp für eine CD4+ T Zell-unabhängige Infektion sei [105] und dass CD4+ T Zellen bei der LCMV Infektion keine entscheidende Rolle für die Induktion einer antiviralen CTL-Antwort und die Klärung der Infektion spielen [87, 106-109], denn auch in CD4-/- Mäusen können CTL während der LCMV Infektion aktiviert werden [53, 106, 110, 111].

1.5 Der Einfluss von CD4+ T Zellen auf die akute und chronische Virushepatitis (HBV/HCV)

Hauptsächlich verantwortlich für die Eliminierung von humanen Hepatitiden, wie HBV und HCV, ist die adaptive Immunantwort [112-115]. Gegenwärtig gibt es in der Literatur unterschiedliche Aussagen darüber, ob für die erfolgreiche Klärung einer viralen Hepatitis die Hilfe von CD4+ T Zellen notwendig ist. Viele Untersuchungen weisen darauf hin, dass für die Klärung der Infektion sowohl eine CD8+ T Zell-Antwort als auch eine CD4+ T Zell-Antwort nötig ist, während andere Studien diesen Zusammenhang nicht sehen. So ist bei Patienten, die die Infektion in einer akuten Hepatitis erfolgreich klären, die CD4+ und CD8+ T Zell-Antwort stark, polyklonal und multispezifisch [116-121].

Chronisch infizierte Patienten dagegen zeigen eine nur vorübergehende oder verzögerte T Zell-Antwort mit nur enger Spezifität [83, 122]. Die Eliminierung des Virus in der akuten Infektion ist letztlich von der Effizienz der zytotoxischen CD8+ T Zell-Antwort abhängig [8, 123]. So sind z. B. HCV-spezifische T Zellen essentiell für die Klärung des Virus [69, 124], und die Abnahme der Virustiters korreliert genau mit dem Auftauchen von HCV-spezifischen T Zellen [66]. CD4+ T Zellen scheinen bei der Klärung von HBV und HCV Infektion jedoch auch eine große Rolle zu spielen [83]. So wurde bei Patienten, die eine akute HCV Infektion spontan ausheilten, neben starken CD8+ T Zell-Antworten auch eine starke Proliferation von virusspezifischen CD4+ T Zellen mit begleitender IL-2 und IFN γ Produktion detektiert [125]. Patienten, in denen die Infektion chronifizierte, hatten keine oder eine nur schwache CD4+ T Zell-Antwort [126]. Außerdem war das Wiederauftreten einer HCV-Infektion nach mehreren Monaten der Viruskontrolle und einer anfänglich starken CD4+ T Zell-Antwort mit dem Verlust der CD4+ T Zell-Antwort assoziiert [96, 127]. Darüber hinaus konnte die Reinfektion mit HCV bei Schimpansen, die eine vorangegangene Infektion geklärt hatten, in Abwesenheit von CD4+ T Zellen nicht effizient kontrolliert werden [127, 128].

CD4+ T Zellen sind also wichtig für Bildung und Aufrechterhaltung von protektiven CD8+ T Zellen. Bisher wurde allerdings noch nicht eindeutig gezeigt, dass es sich hierbei um einen direkten kausalen Zusammenhang handelt. So führte die Depletion von CD4+ T Zellen in der frühen Phase der HBV-Infektion im Schimpansen nicht zu einem veränderten Verlauf der Infektion [129]. Außerdem wurde in einer aktuellen Studie von Schulze zur Wiesch et al. gezeigt, dass die frühe Anwesenheit einer breiten CD4+ T Zell-Antwort in der HCV-Infektion nicht bestimmt, ob die Infektion akut verläuft oder chronifiziert [130]. Die Rolle der CD4+ T Zellen in der akuten Hepatitis ist demnach noch nicht im Detail verstanden und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.6 Der Einfluss hepatozellulärer Aktivierung von CD4+ T Zellen in der viralen Hepatitis

Verschiedene Populationen nicht-hämatopoetischer Leberzellen wie sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC - Liver Sinusoidal Endothelial Cells) und Itozellen üben eine Funktion als Antigen-präsentierende Zellen (APC - antigen presenting cell) aus. Hepatozyten sind die Parenchymzellen der Leber. Sie bilden den größten Teil der Leber [131] und haben hauptsächlich metabolische Funktionen [132]. Jedoch auch Hepatozyten haben eine Funktion als APC [132]. In der gesunden Leber exprimieren Hepatozyten konstitutiv MHC I, jedoch keine MHC II Moleküle [133]. Unter den inflammatorischen Bedingungen einer Hepatitis jedoch, im Menschen wie in der Maus, kommt es zur MHC II-Überexpression auf Hepatozyten [131, 134, 135]. Über MHC II auf Hepatozyten kann Antigen präsentiert und CD4+ T Zellen aktiviert werden [136]. Dies erfordert die direkte Interaktion von Hepatozyten und Lymphozyten in den Sinusoiden der Leber, welche durch das fenestrierte Endothel der LSEC ermöglicht wird [137].

Da die Leber nicht nur mit arteriellem Blut sondern insbesondere auch mit portalvenösem Blut versorgt wird, ist sie Antigenen und mikrobiellen Produkten der intestinalen Bakterien ausgesetzt. Diese ständige Exposition der Leberzellen gegenüber potentiell immunologisch aktiven Substanzen hat zu einem besonderen immunologischen Milieu in der Leber geführt [4], welches tolerogene Immunantworten begünstigt: So präsentieren nicht-hämatopoetische Leberzellen, also auch Hepatozyten, Antigene in der Leber im Zusammenhang von immunsupprimierenden Zytokinen und inhibitorischen Oberflächen-Liganden. Dazu gehören möglicherweise niedrige Spiegel kostimulatorischer Moleküle und eine hohe Expression von PD-L1 [138].

Zudem differenzieren hepatozellulär aktivierte CD4+ T Zellen eher zu Th2-Zellen, einem weniger inflammatorischen Phänotyp der CD4+ T Zellen, der keine antiviralen

Immunantworten unterstützt [136]. Außerdem verlieren LCMV-spezifische CD4⁺ T Zellen in Mäusen, die MHC II konstitutiv auf ihren Hepatozyten exprimieren, die Fähigkeit, IFN γ zu produzieren, und begünstigen so eine verlängerte LCMV Viruspersistenz [133]. Ob es auch im Kontext einer LCMV-induzierten viralen Hepatitis zu einer MHC II Expression auf Hepatozyten kommt, wie es für humane Leberentzündungen beschrieben ist, ist nicht bekannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft.

Ebenfalls noch nicht näher untersucht wurde der Einfluss von hepatozellulär über MHC II aktivierten CD4⁺ T Zellen auf die Generierung von Gedächtnis-CD8⁺ T Zellen. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls näher untersucht werden. Hierzu sollten Mäuse mit einer hepatozellulären Überexpression von MHC II mit LCMV-WE infiziert und die Gedächtnis-CD8⁺ T Zell-Antwort analysiert werden.

1.7 Transgene und knockout Mauslinien zur Untersuchung des Einflusses der CD4+ T Zell-Hilfe auf die virale Hepatitis

CIITA^{-/-} Mäuse

C57BL/6 Wildtyp Mäuse besitzen drei verschiedene MHC II Ketten: H2Aa, H2Ab1 und H2Eb1. Für ihre Expression benötigen sie den Klasse II Transaktivator (CIITA), der in CIITA^{-/-} Mäusen deletiert wurde [139]. Diese Mäuse besitzen keine nachweisbaren MHC II Moleküle und demzufolge kaum CD4⁺ T Zellen.

CIITA^{tg} Mäuse

In CIITA^{tg} Mäusen (CIITA^{tT} und CIITA^{TT}) wurde der CIITA hinter den humanen CRP Promotor kloniert [140], so dass es zu einer konstitutiven Überexpression von MHC II Molekülen auf Hepatozyten kam. In diesen Mäusen sollte der Einfluss von hepatozellulärer MHC II Expression auf Hepatozyten untersucht werden.

Als Kontrollgruppe in den Experimenten mit LCMV Infektion wurden jeweils C57BL/6 Wildtyp Mäuse verwendet.

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von CD4+ T Zellen auf den Verlauf der viralen Hepatitis am LCMV Infektionsmodell zu untersuchen. Hierbei gab es zwei unterschiedliche Ansätze:

1. Die LCMV Infektion von Mäusen mit CD4+ T Zell-Mangel.

Hierbei sollte geklärt werden, ob CD4+ T Zellen auch in der akuten viralen Hepatitis eine Rolle bei der Eliminierung der Infektion spielen. Sowohl die Kinetik der Infektion, anhand von Virustiter und Leberschädigung, als auch die zytotoxische CD8+ T Zell-Antwort sollten in diesem Zusammenhang untersucht werden.

2. Die Bedeutung von hepatozellulär durch MHC II aktivierten CD4+ T Zellen für die Generierung von Gedächtnis-CD8+ T Zellen.

Hierbei sollten CIITA transgene Mäuse - mit einer Überexpression von MHC II auf Hepatozyten - mit LCMV-WE infiziert und der Einfluss der Aktivierung von CD4+ T Zellen durch Hepatozyten auf die Gedächtnis-CD8+ T Zell-Antwort untersucht werden.

Darüber hinaus sollte überprüft werden ob das entzündliche Milieu der Leber in der viralen Hepatitis nach LCMV-WE Infektion zu einer Induktion der hepatozellulären MHC II Expression führt, wie es in humanen Hepatitiden beobachtet wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysegerät zur Transaminasenmessung	Hitachi Modular-P800 Roche, Penzberg
CO ₂ Inkubator SANYO	Biomedica, München
Durchflusszytometer: LSR II	FACS Canto BD Biosciences, Heidelberg
FastPrep®-24 Instrument	MP Biomedicals, Eschwege
24x2 ml QuickPrep™ Adapter	MP Biomedicals, Eschwege
TeenPrep™ 12 x 15 ml Adapter	MP Biomedicals, Eschwege
Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg
Kryotom, Microm HM550	ThermoScientific, Walldorf
Lichtmikroskop, Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microimaging, Jena
Light Cycler 1.5	Roche, Mannheim
Mikrotom (HM 335 E)	Microm, Walldorf
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach
Perfusionspumpe	Ismatec, Wertheim
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparationsbesteck	VWR International GmbH, Darmstadt
Reine Werkbank (BDK)	Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Rückflusskühler	Lenz Laborglas, Wertheim
Schüttler, Thermomixer	Comfort Eppendorf AG, Hamburg
Vortex	Vortex, Reax 2000 Heidolph Instruments
Wasserbad	Wasserbad GFL, Großburgwedel
Zentrifuge 5180R	Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Materialien

Material	Hersteller
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhren, Flow Cytometry	Sarstedt, Nümbrecht
Xylazin (Rompun®) 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Spritzen, BD Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
Stabpipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Steriflip	Merck Millipore, Darmstadt
Superfrost-Objektträger	Karl Hecht, Sondheim
Tetramisole Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Tissue Tek®	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
TRIS Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau (0,4 %)	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin (2500 U/mg)	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck Millipore, Darmstadt
Williams E Medium [-] L-Glutamin	Gibco, Darmstadt
Xylol	Chemsolute®, Th. Geyer, Renningen
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten Flachboden, 24-, 96-well	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb, 100 µm Nylonsieb	BD Biosciences, Heidelberg

Substanz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München,
Aceton	Chemsolute®, Th. Geyer, Renningen
Agarose	Biozym, Oldendorf
Aqua ad injectabilia	Baxter, Unterschleißheim
BD Golgi-Plug (Brefeldin A)	BD Pharmingen, Heidelberg
BD Golgi-Stop (Monensin A)	BD Pharmingen, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich
Braunülen (Vasofix Safety)	Braun, Melsungen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Dako Pen	Dako, Hamburg

Substanz	Hersteller
Deckgläser 24 x 60	Fa. Marienfeld, Lauda Königshofen
Diaminobenzidin (DAB)	DAKO, Hamburg
DMEM 1x	Gibco, Darmstadt
DMEM powder	Gibco, Darmstadt
Eindeckmedium Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Fc Block, Anti-Mouse CD16/CD32	eBioscience, Frankfurt
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Hamburg
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Gelred Nucleic Acid Stain	Biotium, Hayward, USA
Gene Ruler DNA Ladder Mix	ThermoScientific, Walldorf
Glutamin	Gibco, Darmstadt
Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258	Invitrogen, Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München,
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kanülen, BD Microlance	BD Biosciences, Heidelberg
Keramikkugeln	MP Biomedicals, Eschwege
Ketamin	aniMedica GmbH, Senden
Kollagenase	Serva, Heidelberg
Methylzellulose Methocel®MC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Meyer´s Hämalau	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumnitrit	Carl Roth, Karlsruhe
Neufuchsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
NucleoSpin® TriPrep Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Pacific Orange Succimidyl Ester	Invitrogen, Karlsruhe
Panserin 401	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
Percoll	GE Healthcare, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Proteinase K, recombinant, PCR Grade	Roche, Mannheim

Antikörper und Dextramer für die Durchflusszytometrie	Isotyp	Hersteller
B220/CD45R-PE	Rat IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD3-Alexa Fluor 700	Rat IgG _{2b} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD3-FITC	Rat IgG _{2b} , κ	Biologend, Fell
CD3-Pacific Blue	Rat IgG _{2b} , κ	Biologend, Fell
CD4-PerCp	rat IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD4-FITC	rat IgG _{2b} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD8-APC	rat IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD8-PE	rat IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD8-V450	rat IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD44-FITC	rat IgG _{2b} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD69-Billiant Violet 405	Armenian hamster IgG	Biologend, Fell
CD107a-FITC	rat IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
F4/80-APC	rat IgG _{2a} , κ	Biologend, Fell
IA/IE-FITC	rat IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
IA[b]-PE	Ms IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
IFNγ-Alexa Fluor 700	ratIgG ₁ , κ	BD Bioscience, Heidelberg
NK1.1-PE	Ms IgG _{2a} , κ	BD Bioscience, Heidelberg
PD-1-Brilliant Violet 405	rat IgG _{2a} , κ	Biologend, Fell
TNFα-APC	ratIgG ₁	BD Bioscience, Heidelberg
Dextramer-APC (H-2Db; KAVYNFATC; gp; LCMV)		Immudex, Kopenhagen, DK

Antikörper und Seren für die Immunfärbung von Organschnitten	Hersteller
Anti-Mouse MHC class II (I-A/I-E)	ebioscience, Frankfurt
Goat-anti-rat HRP	Jackson Immuno, Dianova, Hamburg
Kaninchen Normalserum	Jackson Immuno, Dianova, Hamburg
Rabbit-anti-rat	DAKO, Hamburg
Ratte Normalserum	Jackson Immuno, Dianova, Hamburg
Ratte-Anti LCMV VL-4	eigene Herstellung

Antikörper zur Zelldepletion in vivo	Isotyp	Hersteller
Anti-CD4 GK1.1	Rat IgG _{2b}	BioXCell, West Lebanon, USA

Kits	Hersteller
Biotin Blocking System	Dako, Hamburg
Dream Taq PCR Master Mix	Invitrogen, Karlsruhe
EnVision™ Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako, Hamburg
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Light Cycler® FastStart DNA Master	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
NucleoSpin® TriPrep Kit	Macherey-Nagel, Düren

2.3 Puffer und Lösungen

1 x ACK

NH₄Cl 150 mM
KHCO₃ 10 mM
EDTA 100 mM

Blockierungspuffer für die MHC II Färbung im Paraffinschnitt

PBS
1 % BSA
5 % Kaninchen-Normalserum

Blockierungspuffer für die VL-4 Färbung im Kryoschnitt

PBS
1 % BSA
5 % Ratte Normalserum
Fc-Block (anti-CD16/CD32) 1:50
Maus IgG 1:50

BSA-Puffer

1xPBS
2% BSA

2 x DMEM

DMEM powder für 1 L mit 500 ml Aqua ad injectabilia lösen
pH-Wert auf 7,2 einstellen

Eosinlösung

1 g Eosin G +100 ml Aqua ad injectabilia (10x)
→ 20 ml Eosinlösung + 180 ml Aqua ad injectabilia + 150 µl 100%ige Essigsäure

4%-ige Formalinlösung (gepuffert, pH 7,4)

9,07 g KH₂PO₄ 66mM
11,86 g Na₂HPO₄ 66mM
+ 860 ml H₂O
+ 140 ml Formalin (37%)

1 M Levamisol

10 g Tetramisolhydrochlorid in 41,5 ml VE-H₂O, steril filtrieren und bei 4°C lagern
(blockt Peroxidasen)

2%ige Methylcellulose

10 g Methylcellulose

500 ml Aqua ad injectabilia

→ bei 4°C rühren bis die Methylcellulose gelöst ist (ü. N.), autoklavieren

Narkose-Lösung

Ketamin:Rompun:PBS 1:0,8:1

Neufuchsinlösung

1 g Neufuchsin

40 ml VE-H₂O

10 ml HCl

30 min bei RT rühren, durch einen Faltenfilter filtrieren und bei 4°C lagern

1 x PBS, pH 7,4

KCl 2,7 mM

KH₂PO₄ 1,5 mM

NaCl 137 mM

Na₂HPO₄ 6,5 mM

Peroxidase-Blockierung für die MHC II Färbung im Paraffinschnitt

80 ml Methanol

8 ml 30%iges H₂O₂

Saponin-Puffer

1xPBS

1% BSA

0,5 % Saponin

Substratlösung für die VL-4 Färbung

100 ml Substratpuffer + 100 µl Levamisol

25 mg Naphtol + 300 µl DMF

0,75 ml Neufuchsinlösung + 0,75 ml Natriumnitrit (2 g in 50 ml VE-H₂O)

→ unmittelbar vor Gebrauch ansetzen, 1 min inkubieren und zur Substratlösung geben.

Substratpuffer für die VL-4 Färbung

100 ml Substratpuffer 0,2 M Tris (10x)

900 ml VE-H₂O

TBE-Puffer

50 mM Tris

41,5 mM Borsäure

0,5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

10xTBS-Puffer

12,11 g Tris
 87,66 g NaCl
 VE-H₂O ad 1L

0,2 M Tris (10x)

24,228 g Tris
 1 L VE-H₂O
 → mit HCl auf pH 9 einstellen und bei RT lagern

Trypsinlösung für die MHC II Färbung im Paraffinschnitt

0,2 g Trypsin (2500 U)
 0,264 g CaCl₂ + 2H₂O
 In 100 µl TBS-Puffer

Puffer für die Hepatozytenisolation:

	Puffer I	Puffer II	Puffer III
NaCl	8,3 g	3,9 g	8,3 g
KCl	0,5 g	0,5 g	0,5 g
HEPES	2,4 g	24,0 g	0,18 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	/	0,7 g	0,18 g
pH-Wert	7,4	7,6	7,4

2.4 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion**Primer für die semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (5' – 3'):**

CIITA Transgen	
hCRP	TTA GGG CCA CCC CAG GCT AT
CIITA	AAC ACG TAC TGA TCC AGT TCC G
CIITA-/-	
CIITA-/- fwd	GAT GAT CGG AGA CAA GGG TGT GT
CIITA-/- rev	GTC AGG GAG CAG GAT CTT TG
CIITA-/-neo	CTG AAT GAA CTG CAG GAC GA
CIITA-/-neo2	ATA CTT TCT CGG CAG GAC CA
LCMV Z-Protein	
LCMV_Z_fwd	CAG ACA CCA CCT ATC TTG G
LCMV_Z_rev	ACC TTC AGT TTG GTT GGC

Primer für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion:

QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden)	
Histocompatibility 2, class II antigen A, alpha (H2-Aa)	Mm_H2-Aa_1_SG
Histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1 (H2-Ab1)	Mm_H2-Ab_1_SG
Histocompatibility 2, class II antigen E, beta 1 (H2-Eb1)	Mm_H2-Eb1_1_SG
Peptidylprolyl Isomerase A (Haushaltsgen)	Mm_Ppia_1_SG

2.5 Versuchstiere und ihre Behandlung

Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung des UKE (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) gezüchtet und gehalten. Die Experimente mit LCMV-infizierten Mäusen wurden in der Versuchstierhaltung des Heinrich-Pette-Instituts (Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie) durchgeführt.

Sämtliche Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen bei einer konstanten Temperatur von 20°C gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Alle hier beschriebenen Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung G96/06 und G10/102 durchgeführt. Für alle in vivo Studien wurden Mäuse im Alter von 8-14 Wochen verwendet. Die Wildtyp Mäuse der Hintergrund-Stämme C57BL/6 und FVB dienten als jeweilige Kontrolle für folgende transgene und knockout Linien:

Transgene bzw. knockout Linie	Hintergrund	Besonderheiten
CIITA ^{-/-} [139]	C57BL/6J	Keine Expression des Klasse II Transaktivators; keine MHC II Expression auf allen Zellen; kaum CD4 ⁺ T Zellen
CIITA tT	C57BL/6J	Heterozygot transgen für die Expression des Klasse II Transaktivators in Hepatozyten; MHC II Überexpression auf Hepatozyten unter der Kontrolle des humanen C-reaktives Protein (CRP)-Promotors
CIITA TT	C57BL/6J	Homozygot transgen für die Expression des Klasse II Transaktivators in Hepatozyten; MHC II Überexpression auf Hepatozyten unter der Kontrolle des humanen CRP-Promotors
hCRP-CIITA-AF	FVB	Heterozygot transgen für die Expression des Klasse II Transaktivators in Hepatozyten; MHC II Überexpression auf Hepatozyten unter der Kontrolle des humanen CRP-Promotors
hCRP-CIITA-AF X C57BL/6	FVB/C57BL/6J	F1-Generation aus hCRP-CIITA-AF und C57BL/6 Mäusen; Heterozygot transgen für die Expression des Klasse II Transaktivators in Hepatozyten; MHC II Überexpression auf Hepatozyten unter der Kontrolle des humanen CRP-Promotors

In vivo Depletion von CD4 T Zellen

Für die in vivo Depletion von CD4+ T Zellen wurden die Mäuse initial an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit anti-CD4 GK1.1 Antikörper intraperitoneal (i. p.) behandelt (0,3 mg Antikörper in 200µl PBS). Die Kontrollgruppe wurde mit der gleichen Menge eines irrelevanten Antikörpers desselben Isotyps (IgG2b) behandelt. Nach der initialen dreitägigen Depletion wurden die Mäuse für die Dauer des Versuchs zwei Mal wöchentlich mit der gleichen Menge Antikörper behandelt.

Infektion der Mäuse

Für die intravenöse (i. v.) Infektion der Mäuse, wurde Zellüberstand virusinfizierter L929-Zellen auf eine Konzentration von 5×10^6 FFU/ml mit PBS verdünnt und den Tieren anschließend 200 µl davon über die durch Rotlicht erwärmte Schwanzvene injiziert.

Bestimmung von Alanin-Aminotransferase

Den Mäusen wurde submandibulär Blut entnommen, welches mit 2µl EDTA pH 8 versetzt wurde. Zum Abseren wurde das Blut bei 956 x g und 20°C, 10 min lang zentrifugiert. 50µl Serum wurden mit 150µl PBS versetzt und die Proben bis zur Messung bei -80°C gelagert. Die Konzentration von Alanin-Aminotransferase (ALT) wurde in der Klinischen Chemie des UKE bestimmt.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Zellkulturmedien

Als Zellkulturmedium für L929-Zellen wurde entweder Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM GlutaMAXTM-1, Gibco, Darmstadt) mit 2 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin oder RPMI Medium 1640 (Gibco, Darmstadt) mit den gleichen Zusätzen verwendet. Für die Restimulation von Milzzellen und mononukleären Leberzellen wurde Panserin (PAN Biotech, Passau) mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol verwendet.

Für Hepatozyten wurde Williams E Medium [-] L-Glutamin (Gibco, Darmstadt) mit folgenden Zusätzen verwendet: 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 20 mM HEPES, und 0,05 % Insulin (mit 40 IE/ml in der Ursprungslösung).

2.6.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 1:10 oder 1:50 mit Trypanblau versetzt. Nur tote Zellen nehmen Trypanblau auf, so dass sie im Mikroskop von lebenden Zellen unterschieden werden können. 10 µl der so verdünnten Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellzahl bestimmt. Um die Gesamtzellzahl in der Suspension zu bestimmen, wurde die durchschnittliche Zellzahl aus zwei Großquadraten x Verdünnungsfaktor x Volumen der Zellsuspension und x Kammerfaktor (10^4) berechnet.

2.6.3 L929 Zellen

L929-Zellen sind eine Fibroblastenlinie, welche ursprünglich aus dem Bindegewebe von Mäusen isoliert wurde (DSMZ Nr. ACC 2). Die Kultivierung erfolgte in DMEM- oder in RPMI-Medium mit 2 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Zur Erhaltung der Zellen wurden diese, abhängig von der Konfluenz, zwei bis drei Mal in der Woche im Verhältnis

1:10 geteilt. L929-Zellen sind mit LCMV produktiv infizierbar. Sie wurden zur Herstellung von LCMV für die Infektion von Mäusen verwendet. Zudem wurden sie im FFA für die Bestimmung der Virustiters in Milz und Leber verwendet.

2.6.4 Herstellung von Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV)

Für die Herstellung von LCMV-WE wurden 15 ml L929 Zellen (s. Kapitel 2.6.3) in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in T75 Zellkulturflaschen für adhärente Zellen in DMEM mit 2 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Nach 24 h und einer Verdopplung der Zellen, wurden diese mit einer Multiplicity Of Infection (MOI-Multiplizität der Infektion) von 0,01 in 5 ml Medium mit LCMV-WE infiziert. Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit Virus inkubiert und ca. alle 10 min für die bessere Verteilung des Virus geschwenkt. Dann wurden die Zellkulturflaschen mit 5 ml Medium auf 10 ml aufgefüllt und für 48 h bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5 % inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 430 x g für 5 min bei 4°C zur Entfernung von Zellen und Zelltrümmern zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren. Die Zellkulturflaschen wurden erneut mit 10 ml Medium befüllt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Der Überstand wurde geerntet, mit dem 24 h zuvor geernteten Überstand vereinigt, homogenisiert und aliquotiert. Die Höhe des Titers wurde im Focus Forming Assay (FFA) bestimmt (s. Kapitel 2.6.5).

2.6.5 Bestimmung des LCMV Titers mittels Focus Forming Assay (FFA)

Im FFA wurden virushaltige Überstände zusammen mit L929-Zellen ausgesät. Infiziert das Virus eine Zelle, ist diese für eine weitere Infektion nicht mehr suszeptibel. Die Zelle teilt sich und es entstehen mehrere virusbefallene Zellen an derselben Stelle der Zellkulturplatte. Das Virus wurde dann mittels Antikörper detektiert und die befallenen Zellen durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Die entstandenen Foci wurden gezählt und der Virustiter der Überstände konnte so bestimmt werden.

a) Aufarbeitung der Proben

Zur Bestimmung des Virustiters im L929-Zellüberstand und in Milz und Leber aus LCMV infizierten Mäusen, wurde der FFA verwendet. Für die Bestimmung des Virustiters im L929-Zellüberstand wurde der Überstand aus der Virusherstellung (s. Kapitel 2.6.4) ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Für die Bestimmung des LCMV Titers in Milz und Leber infizierter Mäuse wurden die Organe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion entnommen, gewogen und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Es wurde jeweils eine Hälfte der Milz verwendet. Für den FFA der Leber wurden immer die gleichen Leberlappen verwendet: Der Lobus hepatis sinister lateralis, der Lobus hepatis dexter lateralis dorsalis und ventralis und der Lobus caudatus. Für die Berechnung des Titers in der gesamten Leber, wurde das jeweilige Verhältnis des Gesamt-Gewichts der Leber und des im FFA verwendeten Anteils bestimmt. Die Leberproben wurden mit jeweils 4 ml Medium versetzt, jeweils die Hälfte der Milz wurde mit 1 ml Medium versetzt (DMEM/2 % FCS/1 % P/S). Unter ständiger Kühlung wurden die Proben dann mittels FastPrep®-24 Instrument und Keramikugeln 30 sec homogenisiert. Für die Homogenisierung der Milzen wurde der 24x2 ml QuickPrep™ Adapter, für die Homogenisierung der Leber der 12 x 15 ml TeenPrep™ Adapter verwendet. Nach Zentrifugation bei $260 \times g$, 5 min und 4°C , wurden die Überstände für den FFA verwendet.

b) Ansetzen des FFA

Für den FFA wurden 200 μl L929 Zellen in Medium mit einer Konzentration von 8×10^5 Zellen/ml in 24-well Zellkulturplatten zusammen mit einer seriellen Verdünnung des virushaltigen Zell- oder Organüberstandes ausgesät. Die Proben wurden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach der Adhäsion der Zellen an den Boden der Zellkulturflasche

wurden die Zellen mit einer 1:1 Verdünnung 2xDMEM und 2%iger Methylzellulose überschichtet und für weitere 48 h inkubiert.

c) Entwicklung des FFA

Zur Entwicklung des FFA wurden Medium und Methylzellulose nach 48 h entfernt und die Zellen für 30 min mit 200 µl 4%igem Formalin in PBS fixiert. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und danach mit 200 µl 1%igem TritonX-100 in PBS für 20 min zur Permeabilisierung der Zellen inkubiert. Nach wiederholtem zweimaligem Waschen wurden die Zellen 60 min mit PBS/10% FCS zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit monoklonalem Ratte-anti-VL-4 Antikörper für 60 min inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das Nukleoprotein von LCMV. Zur Entfernung des nicht gebundenen Primärantikörpers wurden die Proben zwei Mal mit PBS gewaschen. Es folgte die 60minütige Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem (horse raddish peroxidase), polyklonalem goat-anti-rat (Ziege-anti-Ratte) Sekundär-Antikörper. Nach zweimaligem Waschen mit PBS, wurde die Farbreaktion mittels Envision Kit von DAKO durchgeführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von H₂O gestoppt, die Platten getrocknet und die entstandenen Foci wurden unter dem Mikroskop gezählt. Das Protokoll ist adaptiert nach Battegay et al. [141].

Die angegebene Detektionsgrenze ist bezogen auf einen Focus pro Doppelbestimmung in einer Verdünnung von 1:100. Um aus dem Virustiter des verwendeten Leberanteils, den Titer für die gesamte Leber zu ermitteln, diente das durchschnittliche Gewichtsverhältnis von verwendetem Leberanteil zum Gesamtgewicht der Leber als Berechnungsgrundlage. Da für den Assay die Hälfte der Milz eingesetzt wurde, wurde der ermittelte Titer verdoppelt, um den Titer für das gesamte Organ zu erhalten. Das Detektionslimit für die Milz lag bei 500 FFU, dass für die Leber bei 1734 FFU.

2.6.6 Isolation primärer Zellen

Für die Organentnahme wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation unter Narkose getötet (Ketamin:Xylazin (Rompun®):PBS 1:0,8:1; 200 µl/Tier intraperitoneal).

Isolation von Milzzellen

Für die Isolation von Gesamtmilzzellen, wurde die Milz durch ein Zellsieb mit einem Durchmesser von 100 µm zerrieben. Die Zellsuspension wurde mit 30 ml PBS 5 min bei 239 x g und 4°C gewaschen. Dann wurde eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt (Ammoniumchlorid - Kaliumhydrogencarbonat - (ACK)-Lyse). Dazu wurden die Zellen mit 1 ml ACK-Puffer (s. Kapitel 2.3) versetzt, ca. 50 sec inkubiert und die Reaktion mit 10 ml PBS gestoppt. Die Zellen wurden erneut gewaschen, in 10 ml Panserin mit 1 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen und gezählt.

Isolation von mononukleären Leberzellen

Für die Isolation mononukleärer Zellen aus der Leber, wurden die Lebern zunächst über die Pfortader (Vena Porta Hepatis) mit 2 ml PBS perfundiert. Die Leber wurde durch ein Zellsieb mit 100 µm Durchmesser zerrieben, in 30 ml PBS aufgenommen und bei 4°C und 248 x g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml 40%igem Percoll in Medium (DMEM, 2 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. 3 ml 70%iges Percoll in Medium wurden mit der Zellsuspension überschichtet und bei 524 x g, 20 min und 20°C zentrifugiert. Die obere Schicht, bestehend aus Fett und Hepatozyten, wurde abgenommen und die restliche Flüssigkeit inkl. der Zellen mit 40 ml PBS bei 248 x g, 5 min und 20°C gewaschen. Es wurde eine ACK-Lyse der Erythrozyten durchgeführt (s. Kapitel 2.6.6), die Zellen erneut gewaschen und zum Zählen in 500 µl PBS aufgenommen.

Isolation von Hepatozyten

Für die Isolation von Hepatozyten wurden die Mäuse betäubt (s. Kapitel 2.6.6). Die Pfortader wurde mit einer Braunüle kanüliert und die Nadel mit einem Bindfaden fixiert. Nach der Eröffnung der Vena cava wurde die Leber luftblasenfrei mit 100 ml vorgewärmtem Puffer I (s. Kapitel 2.3) durchspült. Hierfür wurde der Puffer mittels Wasserbad und Rückflusskühler auf 37°C erwärmt und über eine Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min durch die Leber gepumpt. Danach wurde die Leber mit einer Geschwindigkeit von 8 ml/min mit 0,15 PZ-U/ml Kollagenase in 50 ml Puffer II (s. Kapitel 2.3) durchspült und so die Hepatozyten aus ihrem Zellverband gelöst. Die Leber wurde entnommen, die Kapsel geöffnet und die Hepatozyten in einer Petrischale mit Puffer III (s. Kapitel 2.3) durch vorsichtiges Schütteln gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit einem Durchmesser von 100 µm in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit Puffer III auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 30 x g und 20°C 5 min mit einer Anlaufzeit von 30 sec und ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 ml Hepatozytenmedium unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und die Zellen für den jeweiligen Versuch verwendet.

2.6.7 Restimulation von Zellen

Für die Restimulation wurden Milzzellen oder mononukleäre Leberzellen in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml aufgenommen und jeweils 200 µl in ein well einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät. Für die virusspezifische Restimulation von CD8+ T Zellen wurden 3 µg/ml immundominantes, MHC I restringiertes LCMV Peptid gp33 zu den Zellen gegeben und diese für 4 h bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Für die Messung der Zytokine IFN γ und TNF α wurden die Zellen in

Anwesenheit von 1 µl/ml Monensin A restimuliert, um die Ausschleusung der Zytokine in den extrazellulären Raum zu unterbinden. Für die Bestimmung der Degranulationsfähigkeit mittels Oberflächenfärbung von CD107a wurden die Zellen in Anwesenheit von 0,65 µl/ml Brefeldin A und 5 µl/ml CD107a-FITC restimuliert. So wurden auch CD107a Moleküle gefärbt, welche während der Restimulation an die Oberfläche der Zellen gelangten und dann wieder internalisiert wurden.

2.6.8 Lebend/tot Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Um in der durchflusszytometrischen Messung lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung mit Pacific Orange Succimidyl Ester (PacO-NHS) gefärbt. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein und reagiert mit freien Aminen, während lebende Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt bleiben.

Die Zellen wurden dazu in 5 ml Röhren mit PBS gewaschen (430 x g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Dann wurden 200 µl einer 1:1000 Verdünnung der 1,34 mM Stammlösung zu den Zellen gegeben und diese für 25 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und mit der Oberflächenfärbung begonnen.

2.6.9 Färbung von Oberflächenmarkern

Für die Färbung von Oberflächenmarkern wurden i. d. R. 1×10^6 Zellen pro Färbung in 5 ml Röhren überführt und mit 2 ml PBS/2% BSA bei 430 x g und 4°C 5 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 µl Fluoreszenz-markiertem Antikörper pro Oberflächenmolekül bei 4°C für 20 min im Dunkeln gefärbt. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS/2 % BSA gewaschen und über Nacht in PBS/1 % PFA fixiert. Entweder wurden die Zellen erneut mit PBS/2 % BSA gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 300 µl PBS aufgenommen oder es wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt.

Bei der Färbung von MHC II auf Hepatozyten erfolgten die Waschschrirte bei 30 x g und 4 min mit einer Anlaufzeit von 30 sec und ohne Bremse. Als Positivkontrolle für die Färbung von MHC II auf der Oberfläche von Hepatozyten wurden jeweils Gesamt-Milzzellen mit demselben Antikörper gefärbt.

2.6.10 Färbung LCMV-spezifischer Zellen

Dextramere haben ein Dextran-„Rückgrat“ (s. Abb. 6) an das Fluorophore und mehrere mit Peptid beladene MHC I-Moleküle gekoppelt sind.

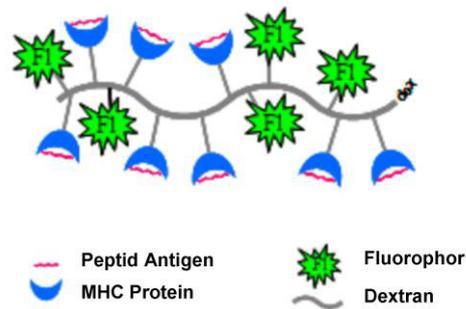


Abb. 6: Darstellung eines Dextramers für die Färbung LCMV-spezifischer Zellen.

Modifiziert nach Immudex MHC Dextramer [142].

<http://www.immudex.com/technology/dextramer-technology.aspx>

Für die Dextramerfärbung LCMV-spezifischer CD8⁺ T Zellen wurden 1×10^6 Zellen in 5 ml Röhren mit PBS/5 % FCS bei 430 x g und 4°C 5 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 3 µl Fluoreszenz-markiertem Dextramer versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei 20°C im Dunkeln wurde Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD8 hinzugegeben und für weitere 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS/5 % FCS gewaschen und mit PBS/1 % PFA über Nacht fixiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 300 µl PBS aufgenommen.

2.6.11 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung von IFN γ und TNF α wurden die Zellen nach der Fixierung (s. Kapitel 2.6.9) mit PBS/2 % BSA/0.5 % Saponin gewaschen, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen intrazellulär mit 1 μ l Fluoreszenz-markiertem Antikörper für jedes zu messende Zytokin 20 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS/2 % BSA/0.5 % Saponin zentrifugiert, um nicht gebundenen Antikörper aus der Zelle zu entfernen. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen anschließend in 300 μ l PBS aufgenommen.

2.6.12 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenz-markierte Zellen vereinzelt, mittels Laserlicht angeregt und das daraufhin emittierte Licht der Fluorochrome wird detektiert. Die Fluoreszenz-Markierung erfolgt entweder über Farbstoffe, die von den Zellen aufgenommen wurden oder durch an die Zellen gebundene Fluorochrom-gekoppelte Antikörper. Diese binden an die zu untersuchenden Oberflächenmarker oder intrazellulären Zytokine (s. Kapitel 2.6.9 und 2.6.11) und können so Aufschluss über Identität und Eigenschaften der Zellen geben. In der Regel wurde eine Färbung der toten Zellen (s. Kapitel 2.6.8) durchgeführt, die zusammen mit Zelldoubletten von der Messung ausgeschlossen wurden. Als Kontrollen für mehrfach gefärbte Proben wurden Einzelfärbungen der Zellen angefertigt, mit deren Hilfe die Parameter des Zytometers eingestellt wurden. Um auszuschließen, dass die detektierten Fluoreszenzen durch eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Zelle zustande kamen, wurde für jeden verwendeten Antikörper als Kontrolle auch eine Einzelfärbung mit einem irrelevanten Antikörper des entsprechenden Isotyps und dem gleichen daran gekoppelten Fluorochrom angefertigt. Die Messungen wurden mit Hilfe der Diva 6 Software ausgewertet.

2.7 Histologie

2.7.1 Präparation der Organe

Für die Anfertigung von histologischen Schnitten wurden die Lebern der Mäuse zunächst mit 2 ml PBS durchspült.

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die Lebern nach der Entnahme über Nacht in 4%iger gepufferter Formalinlösung (s. Kapitel 2.3) fixiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Lebern zunächst 2 h in Vollentsalztem Wasser (VE-H₂O) gewässert und dann eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt (Inkubation in 20%igem und 40%igem Isopropanol für jeweils 45 min). Die anschließende Lagerung der Organe bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in 70%igem Isopropanol. Die weitere Fixierung der Organe und die Einbettung in Paraffin erfolgten in der Pathologie des UKE. Nach der Einbettung wurden am Mikrotom 3µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträgern fixiert.

Für die Herstellung von Schnitten aus kryokonservierten Organen wurde der Lobus hepatis sinister medialis der Leber mit Hilfe von Tissue Tek® und Trockeneis fixiert und anschließend bei -80°C gelagert. Am Kryotom wurden dann 8µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost Objektträgern fixiert. Die kryokonservierten Schnitte wurden anschließend ebenfalls bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor der Färbung wurden die kryokonservierten Leberschnitte in 99%igem Aceton 10 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert, dann in TBS gewaschen und für 15 min getrocknet.

2.7.2 Absteigende Alkoholreihe

Für die Färbung von Paraffin-fixierten Organschnitten wurden diese mit Hilfe von Xylol entparaffiniert (3 x 5 min) und dann einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen (jeweils 4 min 100 %, 90 %, 70 % und 50 % Ethanol). Danach wurden die Schnitte für 2 min in VE-H₂O gespült.

2.7.3 Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung von Paraffinschnitten

Nach der Entparaffinierung und der Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte drei Mal mit TBS gewaschen und dann für 5 min in einer Hämatoxilin Färbelösung gefärbt. Dann wurden die Schnitte unter fließendem VE-H₂O für 10 min gebläut und für 5 min in Eosin-Färbelösung inkubiert. Die Schnitte wurden wieder mit VE-H₂O für 10 min gewaschen und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe und Inkubation in Xylol mit Eindeckmedium (Eukitt) eingedeckt.

2.7.4 MHC II Färbung im Paraffinschnitt

Für die Färbung von MHC II im Paraffinschnitt wurden diese nach der Entparaffinierung für 2 min in TBS-Puffer gespült. Es wurde eine Trypsinlösung zur Vorbehandlung der Schnitte hergestellt (s. Kapitel 2.3) und diese auf 37°C vorgewärmt. Darin wurden die Schnitte dann für 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden sie dreimalig mit TBS-Puffer gespült und mittels DAKO Pen umrandet. Dann wurde eine Blockierung der endogenen Peroxidasen mit Hilfe des unter Kapitel 2.3 angegebenen Peroxidaseblocks durchgeführt (30 min; RT). Es folgte dreimaliges Waschen in TBS (jeweils 2 min) und das Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen mit Blockierungspuffer (s. Kapitel 2.3) für 20 min bei RT. Dieser und alle weiteren Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Der Antikörper gegen MHC II wurde in Blockierungspuffer 1:100 bzw. 1:500 verdünnt, 100µl/Schnitt wurden aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurde Biotin gekoppelter rabbit-anti-rat (Kaninchen-anti-Ratte) Antikörper 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt und 100 µl/Schnitt für 60 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Nach drei Waschsritten in TBS wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin aus dem Biotin Blocking System 1:300 in Blockierungspuffer verdünnt und auf die Schnitte gegeben (100µl/Schnitt; 60 min; RT), dann wurden die Schnitte erneut gewaschen. Für die Farbreaktion wurde das

Envision Detektion System verwendet. 1µl DAB-Chromogen wurden in 100µl Substratlösung pro Schnitt je nach Farbreaktion für wenige Sekunden inkubiert. Der Färbeprozess wurde mit TBS gestoppt. Dann wurde eine Kernfärbung mit Meyer`s Hämalaun durchgeführt (maximal 1 min) und die Färbung im Folgenden für 10 min unter fließendem Wasser gebläut. Abschließend wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt und die Schnitte mit Eindeckmedium (Eukitt) eingedeckt.

2.7.5 Aufsteigende Alkoholreihe

Nach der jeweiligen Färbung wurden die Schnitte einer aufsteigender Alkoholreihe unterzogen: Dazu wurden sie zweimal kurz in 50%iges Ethanol getaucht, für 30 sec in 70%iges, für 1 min in 90%iges und zweimal für 2 min in 100%iges Ethanol getaucht. Es folgten zwei dreiminütige Inkubationsschritte in Xylol. Danach wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

2.7.6 Färbung von LCMV Nukleoprotein im Kryoschnitt

Nach der Fixierung wurden die Schnitte 10 min in TBS gewaschen und für 60 min mit unter Kapitel 2.3 angegebenem Blockierungspuffer inkubiert. Dann wurden die Schnitte drei Mal für 3 min in PBS gewaschen. AF488 (AlexaFluor488) gekoppelter VL-4 Antikörper, spezifisch für das Nukleoprotein von LCMV, wurde 1:200 in PBS/1 % BSA/5 % Ratte Normalserum verdünnt und für 60 min auf die Schnitte gegeben. Diese wurden erneut drei Mal für 3 min in TBS gewaschen. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte für 1 bis 3 min in 1:1000 in PBS verdünntem HOECHST 33258® (pentahydrat(bis-benzimide)) gefärbt und einmal 5 min in PBS gewaschen. Die Fluoreszenz wurde mittels eines Keyence Bioevo BZ-9000 Mikroskops und der entsprechenden Analyse Software detektiert.

Die Kopplung von AlexaFluor® 488 (AF488) an VL-4 Antikörper, spezifisch für das LCMV Nukleoprotein, wurde mit dem „AlexaFluor® Monoclonal Antibody Labeling Kit“

nach Herstellerangaben durchgeführt. Der verwendete Antikörper wurde aus einer Hybridom-Zelllinie gewonnen und stand im Labor zur Verfügung.

Die Färbung des LCMV Nukleoproteins im Kryoschnitt wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Jan-Hendrik Kozik angefertigt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Die Isolation von RNA aus Lebergewebe erfolgte mit dem NucleoSpin® TriPrep Kit nach Herstellerangaben.

2.8.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µl RNA mit dem „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR“ nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert. Dies erfolgte zum einen für die Bestimmung des transgen oder knockout Status der Mäuse und zum anderen für die quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) Analyse der MHC II Ketten und des LCMV Z-Proteins.

Quantitative Real Time-PCR

Für die Bestimmung des RNA Spiegels der MHC II-Ketten und des LCMV Z-Proteins in Lebergewebe, wurde 1 µl cDNA (s. Kapitel 2.8.2) mit Hilfe des „Light Cycler® FastStart DNA Master SYBR Green I“ Kits und den unter Kapitel 2.4 angegebenen QuantiTect Primer Assays, bzw. Primern für das LCMV Z-Protein, im Light-Cycler 1.5 von Roche amplifiziert. Als Haushaltsgen, auf das die Daten für die Auswertung normalisiert wurden (Δct), wurde Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) verwendet. Die Analyse der Daten

erfolgte mittels LightCycler Software Version 3. Für die Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

95°C	10 min	Initiale Denaturierung	
95°C	10 sec	Denaturierung	} 45 x
59°C/68°C	5 sec	Annealing	
72°C	7 sec	Elongation	
72°C	5 min	Finale Elongation	

Für die MHC II Kette H2Ab1 wurde eine Annealing-Temperatur von 59°C gewählt, für alle anderen eine Temperatur von 68°C. Alle Proben wurden in Triplikaten bestimmt. Zur Kontrolle der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve des Produkts erstellt.

Die qRT-PCR und die dazugehörigen Schritte aus den Kapiteln 2.8.1 und 2.8.2 wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Jan-Hendrik Kozik durchgeführt.

Semi-quantitative PCR

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen in einer PCR wurden Schwanzbiopsien der zu testenden Mäuse mit Proteinase K über Nacht bei 55°C unter Schütteln verdaut. Für den Verdau wurden 3 µl Proteinase K und 80 µl Proteinase K-Puffer (s. Kapitel 2.3) zu den Biopsien gegeben. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben am nächsten Tag für 20 min bei 95°C inkubiert. 2 µl des Ansatzes, 12,5 µl Dream Taq Master Mix, jeweils 0,15 µl Primer und 10,2 µl H₂O (PCR Grade) wurden für die PCR nach folgendem Programm eingesetzt:

94°C	5 min	Initiale Denaturierung	
94°C	30 sec	Denaturierung	} 35 x
68°C/62°C	30 sec	Annealing	
72°C	30 sec	Elongation	
72°C	5 min	Finale Elongation	
4°C	∞		

Für die PCR zur Identifizierung von CIITA transgenen Mäusen wurde das Annealing bei 68°C durchgeführt, für die CIITA-/- PCR bei 62°C.

Die amplifizierten Proben wurden zusammen mit Gelred als Ladepuffer auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch in TBE-Puffer (s. Kapitel 2.3) der Größe nach getrennt. Als Größenmarker diente eine 100 bis 10.000 bp DNA-Leiter. Die Analyse der amplifizierten Fragmente erfolgte unter UV-Licht.

2.9 Statistische Auswertung

Falls nicht anders erwähnt, wurde für die statistische Bewertung der Ergebnisse der Mann-Whitney-U Test angewendet. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant bewertet (*); (p < 0,01: **; p < 0,001: ***). Für den Vergleich einer Gruppe mit drei Stichproben wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dies wurde im jeweiligen Fall angemerkt.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss eines CD4⁺ T Zell-Mangels auf die akute LCMV-WE Infektion untersucht. Hierbei wurden die Kinetik der Infektion, die Leberschädigung, die Entzündung der Leber und der Einfluss der fehlenden CD4⁺ T Zell-Hilfe auf die zytotoxische CD8⁺ T Zell-Antwort untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die virale Hepatitis nach der Infektion mit LCMV-WE zu einer Induktion hepatozellulärer MHC II Expression in C57BL/6 Wildtyp Mäusen führt. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit hepatozellulär durch MHC II aktivierte CD4⁺ T Zellen einen Einfluss auf Generierung von Gedächtnis-CD8⁺ T Zellen ausüben.

3.1 Charakterisierung des Lymphozytenkompartiments von CIITA^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen

CIITA^{-/-} Mäusen fehlt der Transaktivator für die Expression von MHC II. Dies sollte zu einer Störung der MHC II Expression in diesen Mäusen führen. Zur Verifizierung des MHC II-Mangels in diesen Mäusen wurde, als Marker für die Expression, der mRNA Gehalt zwei verschiedener MHC II Ketten getestet. Dafür wurde mRNA aus Lebergewebe isoliert, cDNA hergestellt und in einer qRT-PCR eingesetzt. Während die relativen mRNA Mengen bei C57BL/6 Mäusen - bezogen auf das Haushaltsgen Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) - bei ca. eins lagen, konnte in CIITA^{-/-} Mäusen so gut wie keine mRNA für die beiden untersuchten MHC II-Ketten detektiert werden (H2Aa p=0,0268; H2Ab1 p=0,0060) (s. Abb. 7). CIITA^{-/-} Mäuse besitzen somit so gut wie keine MHC II-Moleküle.

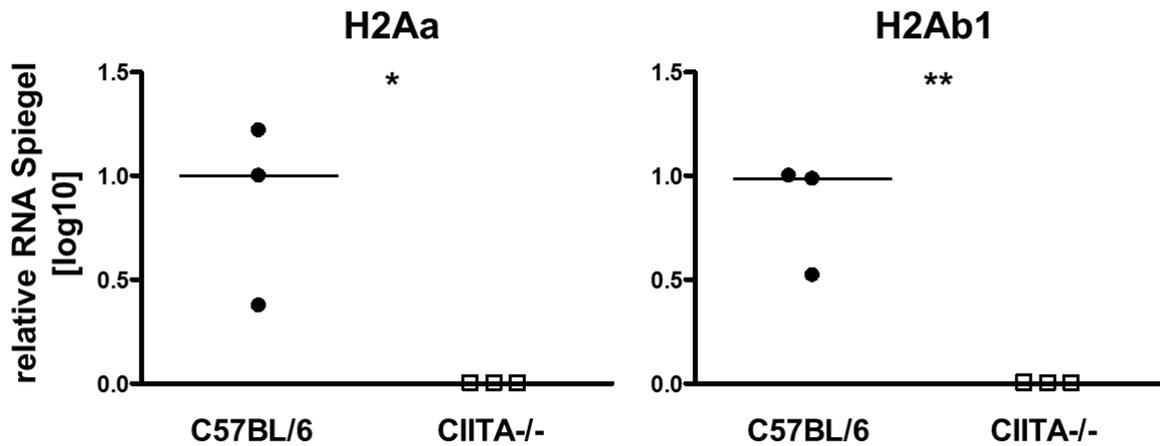


Abb. 7: Relative mRNA-Spiegel (Δ ct) der MHC II Ketten H2Aa und H2Ab1 in der Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen, normalisiert auf die Expression des Haushaltgens Peptidylpropyl Isomerase A (PPIA).

In CIITA^{-/-} Mäusen war so gut wie keine mRNA der MHC II Ketten zu detektieren. (H2Aa p=0,0268; H2Ab1 p= 0,0060). Für die Berechnung der p-Werte wurde der ungepaarte t-Test verwendet.

Als Folge davon sollte die MHC II abhängige CD4⁺ T Zell-Stimulation gestört sein und die Mäuse sollten auch nur sehr wenige CD4⁺ T Zellen besitzen. Um dies zu überprüfen, und ihre Eignung für die Untersuchung einer akuten Leberinfektion im CD4⁺ T Zell-lymphopenischen Milieu zu verifizieren, wurden naive CIITA^{-/-} Mäuse und zum Vergleich C57BL/6 Wildtyp Mäuse auf ihre CD4⁺ T Zellzahl untersucht. Dafür wurden Milzzellen und mononukleäre Leberzellen isoliert und der Anteil an CD4⁺ T Zellen innerhalb der CD3⁺ Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Beim Vergleich des CD4⁺ T Zell-Anteils in Milz und Leber von CIITA^{-/-} und C57BL/6 Wildtyp Mäusen, zeigte sich eine stark verringerte Anzahl an CD4⁺ T Zellen in den CIITA^{-/-} Mäusen, sowohl anteilig an der CD3⁺ Lymphozytenpopulation (Milz und Leber p=0,0286), als auch beim Vergleich der absoluten CD4⁺ T Zellzahlen in Milz (p=0,0002) und Leber (p=0,0053) (s. Abb. 8). So hatten C57BL/6 Wildtyp Mäuse im Schnitt 109×10^5 , CIITA^{-/-} Mäuse dagegen nur 10×10^5 CD4⁺ T Zellen in der Milz. Die Leber von C57BL/6 Wildtyp Mäusen wies im Schnitt $2,3 \times 10^5$ CD4⁺ T Zellen auf, die von CIITA^{-/-} Mäusen dagegen lediglich $0,6 \times 10^5$ Zellen (s. Abb. 8).

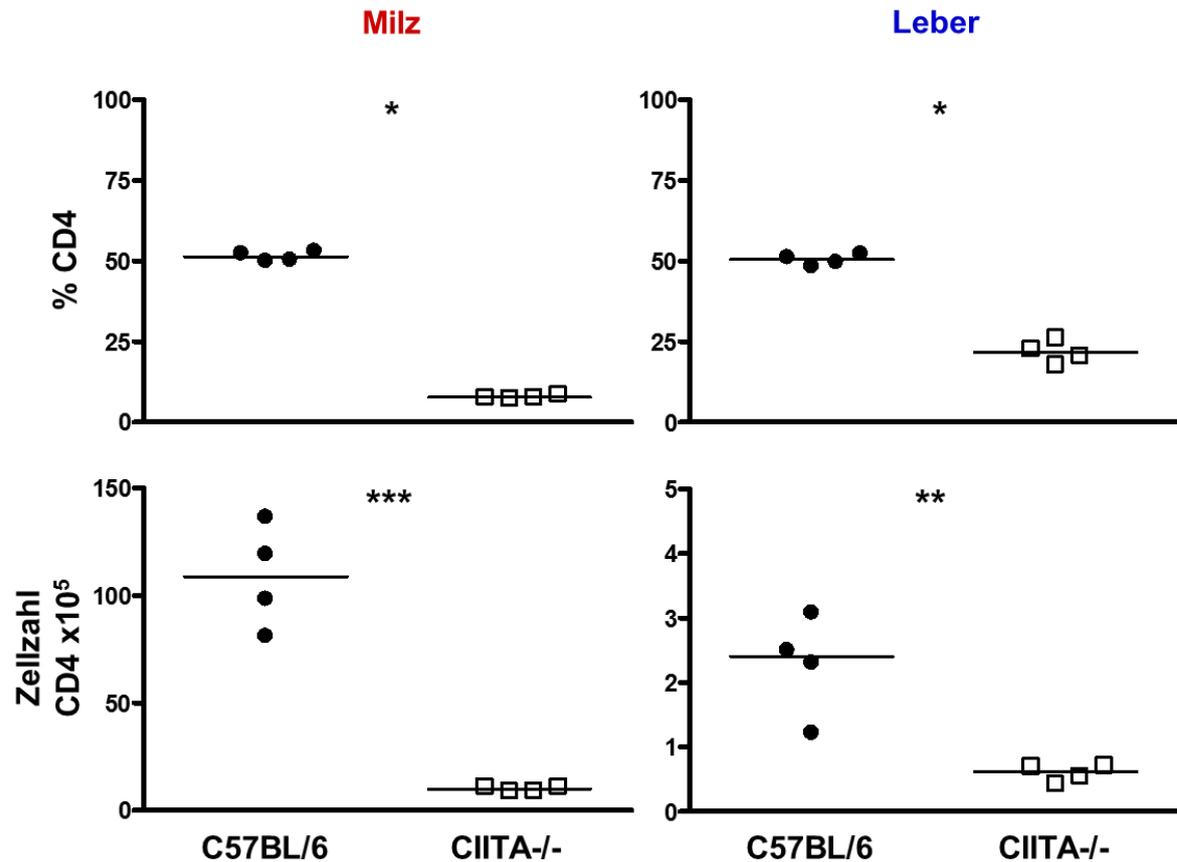


Abb. 8: CD4+ T Zellzahlen in CIITA-/- im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

Aus naiven C57BL/6 Wildtyp und CIITA-/- Mäusen wurden Milzzellen und mononukleäre Leberzellen isoliert und die Oberflächenexpression von CD4 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In den oberen beiden Abbildungen ist der prozentuale Anteil CD4+ T Zellen innerhalb der CD3+ T Lymphozyten in Milz und Leber dargestellt. Der Anteil an CD4+ T Zellen ist in Milz und Leber von CIITA-/- Mäusen stark verringert (Milz und Leber $p=0,0286$). Die unteren beiden Abbildungen zeigen die absolute Zellzahl CD4+ T Zellen in Milz und Leber. CIITA-/- Mäuse wiesen auch eine stark verringerte Gesamt-CD4+ T Zell-Anzahl auf (Milz $p=0,0002$; Leber $p=0,0053$).

Um auszuschließen, dass der Mangel an CD4+ T Zellen in CIITA-/- Mäusen eine Nische schafft und so zu einer erhöhten CD8+ T Zellzahl führt, wurden auch Anteil und Anzahl der CD8+ T Zellen beider Mauslinien miteinander verglichen. Durch die fehlenden CD4+ T Zellen wiesen die CIITA-/- Mäuse anteilig mehr CD8+ T Zellen im CD3+ Lymphozytenkompartiment auf (Milz und Leber $p=0,0286$) (s. Abb. 9). Die absoluten CD8+ T Zellzahlen in Milz und Leber aber waren in beiden Versuchsgruppen sehr ähnlich: im Schnitt 87×10^5 Zellen pro Milz in C57BL/6 und 81×10^5 Zellen in CIITA-/- Mäusen, bzw. $1,7 \times 10^5$ Zellen pro Leber in C57BL/6 und $1,5 \times 10^5$ Zellen in

CIITA^{-/-} Mäusen innerhalb der mononukleären Leberzellen (s. Abb. 9). Die Mäuse wiesen also eine stark verminderte CD4⁺ T Zell-Anzahl, jedoch eine vergleichbare hohe Zellzahl in ihrem CD8⁺ T Zell-Kompartiment auf. Unterschiede innerhalb der CD8⁺ T Zellzahlen im Infektionsverlauf wären demzufolge nicht auf unterschiedliche Ausgangszahlen der CD8⁺ T Zellen zurückzuführen.

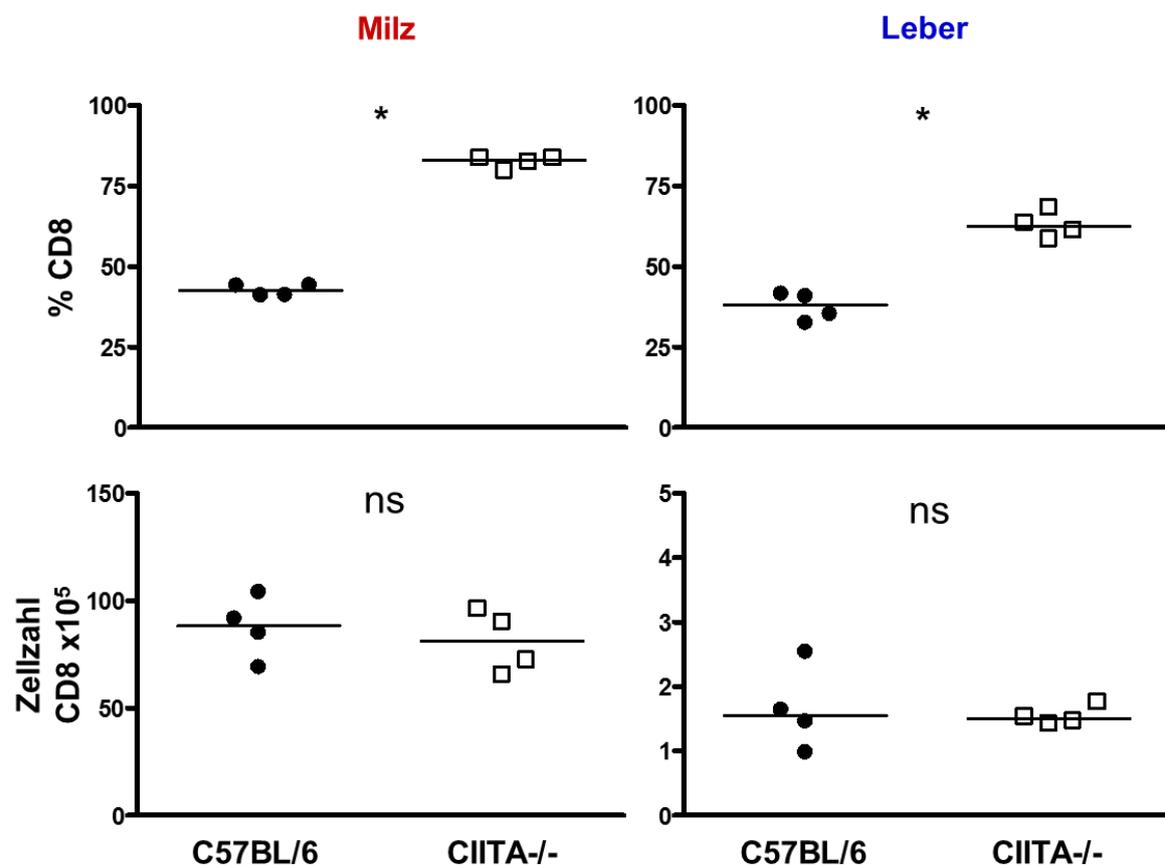


Abb. 9: CD8⁺ T Zellzahlen in Milz und Leber von CIITA^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

Die Oberflächenexpression von CD8 auf Milzzellen und mononukleärer Leberzellen von C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In den oberen beiden Abbildungen ist der prozentuale Anteil CD8⁺ T Zellen an der CD3⁺ T Lymphozytenpopulation in Milz und Leber dargestellt. Der relative Anteil an CD8⁺ T Zellen innerhalb der CD3⁺ T Zellen ist signifikant erhöht (Milz und Leber $p=0,0286$). Die unteren beiden Abbildungen zeigen die absolute Zellzahl CD8⁺ T Zellen in Milz und Leber. Diese ist in beiden Mauslinien vergleichbar hoch (Milz $p=0,5582$; Leber $p=0,7564$) (ns - nicht signifikant).

3.2 Kinetik der LCMV Infektion

3.2.1 Vergleich des Virustiters mittels Focus Forming Assay (FFA)

Um herauszufinden, ob es bei CIITA^{-/-} Mäusen aufgrund ihres CD4⁺ T Zell-Mangels bei einer akuten Infektion mit LCMV-WE zu einer veränderten Kinetik kommt, wurden männliche CIITA^{-/-} und als Vergleich C57BL/6 Wildtyp Mäuse gleichen Geschlechts und Alters mit 1×10^6 FFU LCMV-WE intravenös (i. v.) infiziert. An den Tagen 7, 9, 12, 15, 18, 21 und 30 nach Infektion wurden Milz und Leber entnommen und der Virustiter mittels FFA bestimmt. Pro Versuchsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils vier bis sieben Tiere getestet.

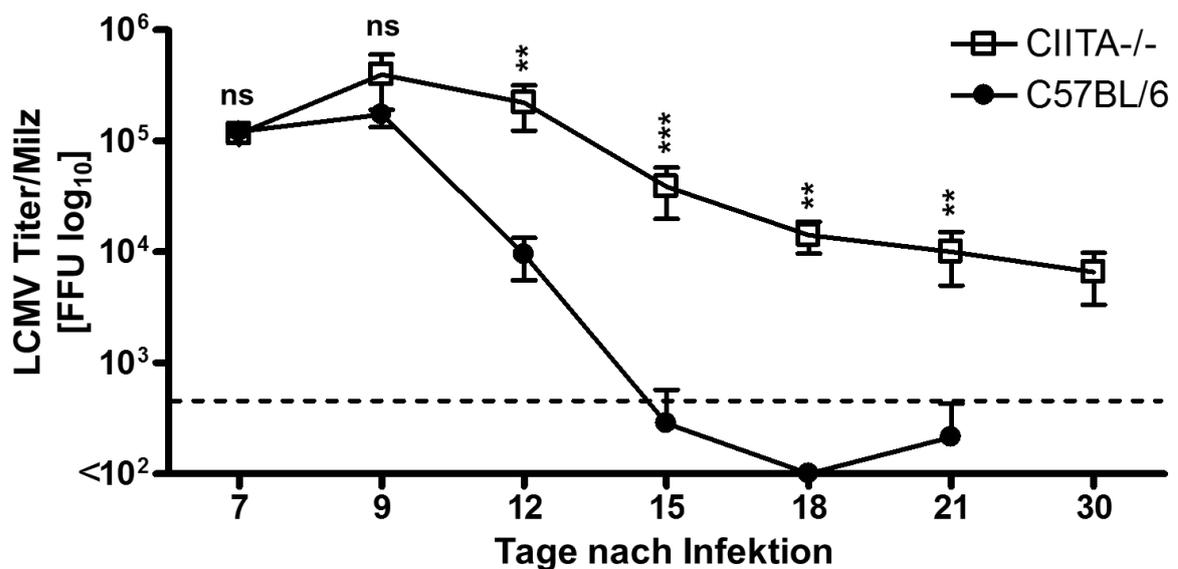


Abb. 10: Virustiter in der Milz an Tag 7, 9, 12, 15, 18, 21 und 30 nach Infektion mit 10^6 FFU LCMV-WE. Die gestrichelte Linie repräsentiert das Detektionslimit.

CIITA^{-/-} Mäuse haben ab Tag 9 nach Infektion einen höheren Virustiter in der Milz. (Tag 12 $p=0,0012$; Tag 15 $p=0,0006$; Tag 18 $p=0,0043$; Tag 21 $p=0,0012$). Außerdem zeigten sie eine deutlich verlängerte Viruspersistenz im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen

An Tag 30 nach Infektion wurden lediglich CIITA^{-/-} Mäuse getestet. CIITA^{-/-} Mäuse zeigten ab Tag 9 nach Infektion einen tendentiell und ab Tag 12 sogar einen signifikant erhöhten Virustiter in beiden Organen über den gesamten weiteren Verlauf der Infektion (Milz Tag 12 $p=0,0012$, Tag 15 $p=0,0006$, Tag 18 $p=0,0043$, Tag 21 $p=0,0012$; Leber

Tag 12 $p=0,0012$, Tag 15 $p=0,0003$, Tag 18 $p=0,0043$, Tag 21 $p=0,0012$)

(s. Abb. 10 und Abb. 11). Darüber hinaus war eine deutlich verlängerte Persistenz des Virus in CIITA^{-/-} Mäusen festzustellen, die bis mindestens Tag 30 nach Infektion anhielt. In C57BL/6 Wildtyp Mäusen hingegen war das Virus an Tag 15 nach Infektion in den meisten Tieren eliminiert: Bei sechs von jeweils sieben C57BL/6 Wildtyp Mäusen lagen die Virustiter an Tag 15 und 21 in der Milz und an Tag 15 in der Leber unter der Detektionsgrenze. An Tag 18 in der Milz und an Tag 18 und 21 in der Leber lagen die Titer aller C57BL/6 Wildtyp Mäuse unter der Detektionsgrenze (s. Abb. 10 und Abb. 11).

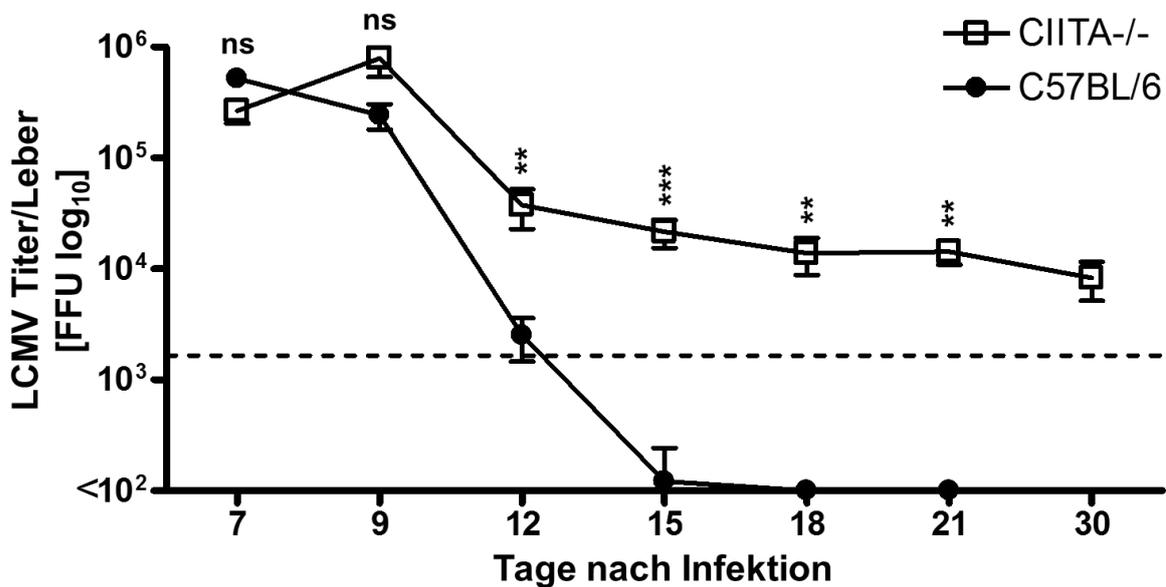


Abb. 11: Virustiter in der Leber an Tag 7, 9, 12, 15, 18, 21 und 30 nach Infektion mit 10⁶ FFU LCMV-WE. Die gestrichelte Linie repräsentiert das Detektionslimit.

CIITA^{-/-} Mäuse haben ab Tag 9 nach Infektion einen höheren Virustiter in der Leber, mit einem signifikanten Unterschied ab Tag 12 nach Infektion (Tag 12 $p=0,0012$; Tag 15 $p=0,0003$; Tag 18 $p=0,0043$; Tag 21 $p=0,0012$). Außerdem zeigen sie eine deutlich verlängerte Viruspersistenz im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

3.2.2 Analyse des LCMV Z-Protein mRNA-Spiegels in der Leber

Zur Kontrolle des im FFA ermittelten Virustiters, wurde die relative Expression des LCMV Z-Proteins durch Bestimmung des mRNA Spiegels an Tag 9, 12, 15 und 18 mittels qRT-PCR in der Leber bestimmt. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurden hierfür jeweils die vier Proben verwendet, die im FFA dem Median am nächsten lagen.

CIITA^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen eine höhere relative Menge der LCMV Z-Protein mRNA in der Leber auf (s. Abb. 12), welches den Ergebnissen des FFA entsprach (s. Abb. 11). An den Tagen 12, 15 und 18 waren die Werte signifikant erhöht (Tag 12, 15 und 18 $p=0,0286$).

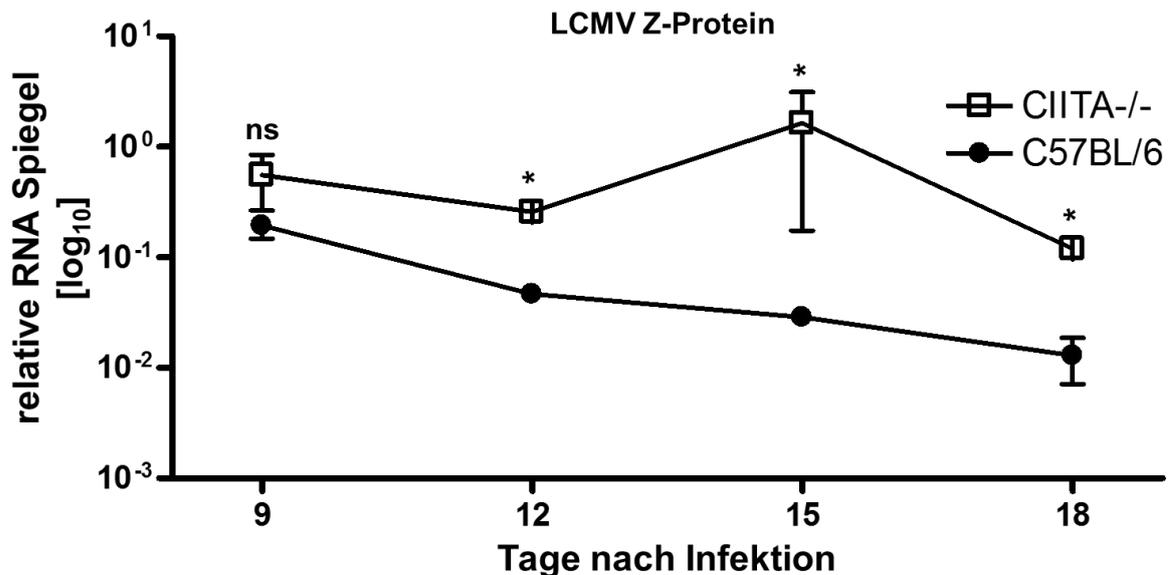


Abb. 12: mRNA-Spiegel des LCMV Z-Proteins in der Leber an Tag 9, 12, 15 und 18 nach Infektion mit LCMV-WE.

CIITA^{-/-} Mäuse wiesen zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen einen höheren mRNA-Spiegel des LCMV Z-Proteins in der Leber auf. Ab Tag 12 waren die Unterschiede signifikant (Tag 12, 15 und 18 $p=0,0286$).

3.2.3 Färbung des LCMV Nukleoproteins im Leberschnitt

Zur weiteren Kontrolle der Infektion in der Leber, und um einen Eindruck darüber zu gewinnen, welche Zellen der Leber mit LCMV infiziert waren, wurden Kryoschnitte der infizierten Lebern mit Fluoreszenz-markiertem VL-4 Antikörper gefärbt, der an das LCMV Nukleoprotein bindet. Schnitte und Färbungen wurden für alle in Kapitel 3.2.1 einbezogenen Versuchstiere angefertigt. Jeweils ein repräsentatives Beispiel ist in Abb. 13 dargestellt. Beide Versuchsgruppen zeigten vor allem eine Infektion der Hepatozyten, die bei CIITA^{-/-}-Mäusen deutlich länger zu detektieren war als in C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

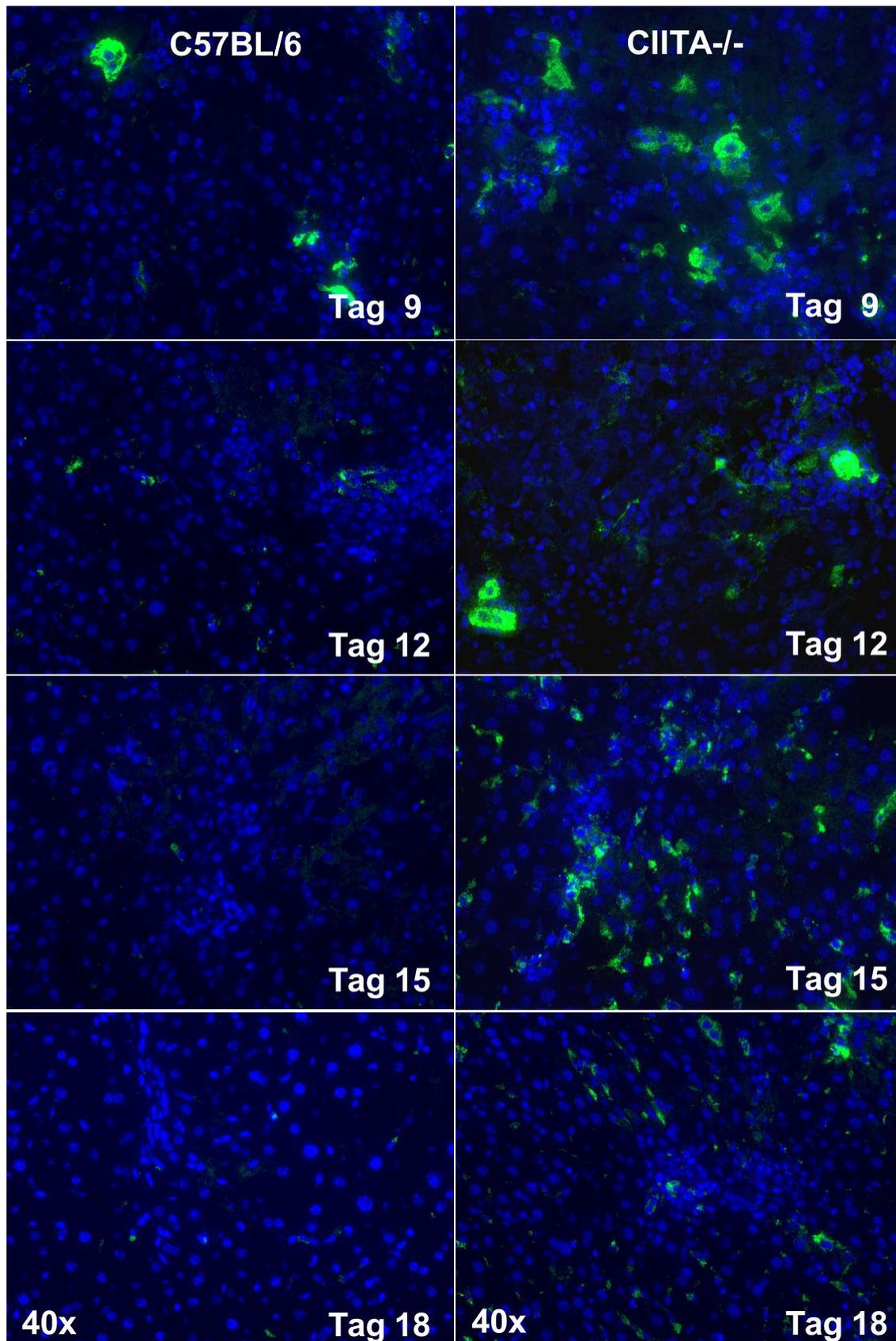


Abb. 13: Fluoreszenzfärbung des LCMV Nukleoproteins in Kryoschnitten der Leber an Tag 9, 12, 15 und 18 nach Infektion in CIITA^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen. In CIITA^{-/-} konnten im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen zu allen Zeitpunkten wesentlich mehr virusbefallene Zellen detektiert werden.

3.3 LCMV Infektion nach CD4+ T Zell-Depletion

Um die Ergebnisse aus der Infektion von CIITA^{-/-} Mäusen noch in einem anderen CD4+ T Zell-lymphopenischen Modell zu verifizieren, wurden in C57BL/6 Wildtyp Mäusen CD4+ T Zellen durch die intraperitoneale (i. p.) Gabe des depletierenden Antikörpers GK1.5 spezifisch entfernt. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse gleichen Geschlechts und Alters mit der gleichen Menge eines irrelevanten Antikörpers des entsprechenden Isotyps behandelt. Die Effizienz der Depletion ist in Abb. 14 dargestellt. Mit GK1.1 anti-CD4 Antikörper behandelte Mäuse wiesen signifikant weniger CD4+ T Zellen auf als die mit Kontroll-Antikörper behandelte Vergleichsgruppe ($p < 0.0001$). Abb. 15 zeigt einen repräsentativen Dotplot von CD3+ Lymphozyten der Milz. In mit Kontroll-Antikörper behandelten Mäusen waren 47,2 % dieser Zellen positiv für CD4, in anti-CD4 behandelten Mäusen nur 0,6 %.

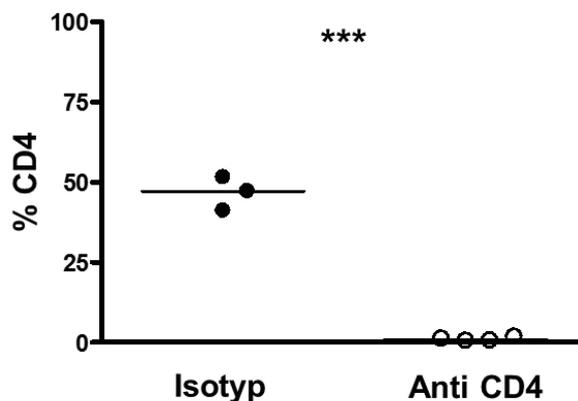


Abb. 14: Effizienz der CD4+ T Zell-Depletion in C57BL/6 Wildtyp Mäusen nach anti-CD4 Antikörpergabe.

Dargestellt ist der Anteil CD4+ T Zellen an CD3+ Lymphozyten nach Behandlung mit Kontroll- bzw. anti-CD4 Antikörper. In den mit Kontroll-Antikörper desselben Isotyps behandelten Mäusen lag der CD4+ T Zell-Anteil im Schnitt bei 47 %. In GK1.1 anti-CD4 behandelten C57BL/6 Wildtyp Mäusen waren die CD4+ T Zellen so gut wie eliminiert ($p < 0,0001$ nach ungepaartem t-Test).

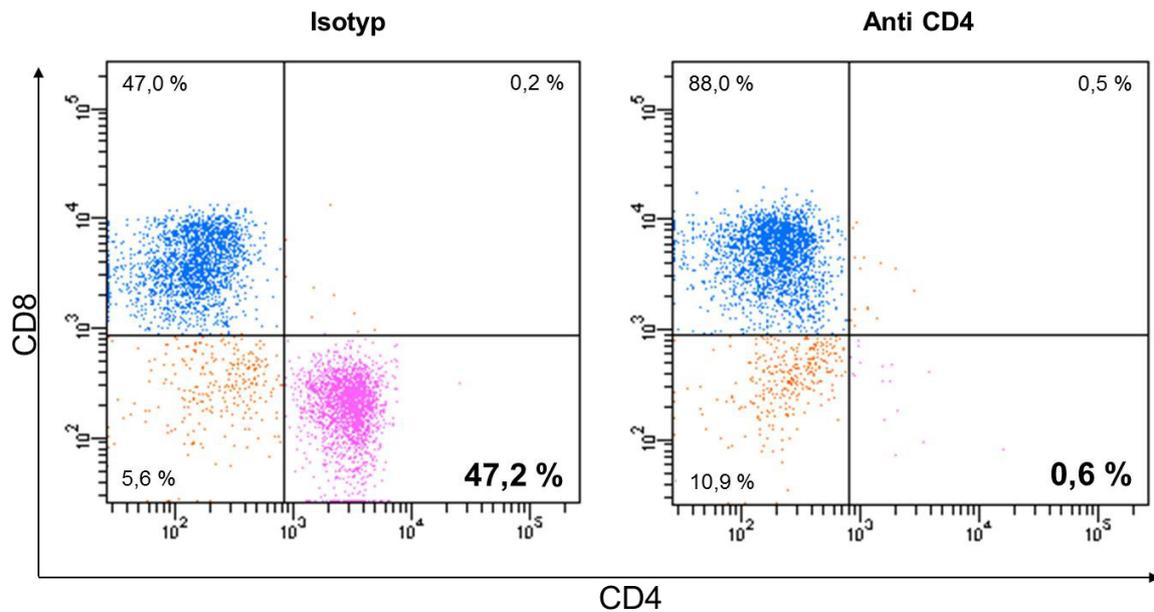


Abb. 15: Repräsentativer Dotplot der CD4+ T Zell-Depletion in C57BL/6 Wildtyp Mäusen nach anti-CD4 Antikörpergabe.

Anteil CD4+ und CD8+ T Zellen an CD3+ Lymphozyten nach der Behandlung mit Kontroll-Antikörper bzw. CD4+ T Zell-depletierendem GK1.1 Antikörper. Nach der Gabe des depletierenden Antikörpers konnten so gut wie keine CD4+ T Zellen mehr in den behandelten Mäusen detektiert werden (0,6 % CD4+ T Zellen). In den mit Kontroll-Antikörper desselben Isotyps behandelten Mäusen lag der Anteil an CD4+ T Zellen der CD3+ T Zell-Population bei 47,2%.

Nach initialer CD4+ T Zell-Depletion wurden die Mäuse mit 1×10^6 FFU LCMV-WE i. v. infiziert und die Virustiter wie zuvor in den CIITA^{-/-} Mäusen per FFA, durch Bestimmung des Z-Protein mRNA Gehalts und Anfärbung des LCMV Nukleoproteins mittels VL-4 Antikörpers im Kryoschnitt an Tag 18 nach Infektion bestimmt- der Zeitpunkt zu dem das Virus in unbehandelten C57BL/6 Wildtyp Mäusen eliminiert war. Wie in den CIITA^{-/-} Mäusen, war auch in den CD4+ T Zell-depletierten Mäusen an Tag 18 nach Infektion noch Virus im FFA zu detektieren, nicht aber in den mit Kontroll-Antikörper des selben Isotyps behandelten Vergleichsmäusen (Milz $p=0,0077$; Leber $p=0,0194$) (s. Abb. 16). Auch die LCMV Z-Protein mRNA Spiegel der Leber lagen in den Mäusen mit CD4+ T Zell-Mangel höher als in den Kontrolltieren ($p=0,0357$) (s. Abb. 17).

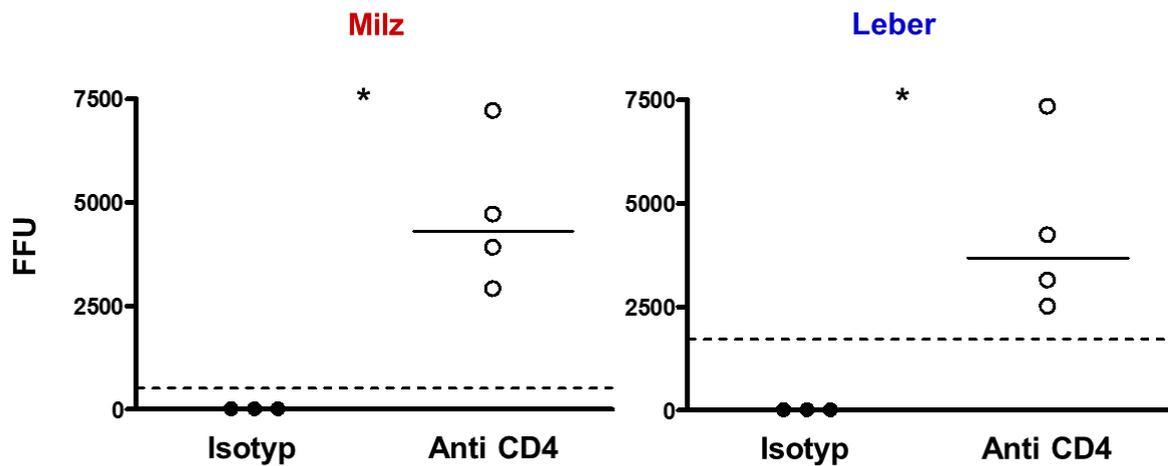


Abb. 16: Virustiter an Tag 18 nach LCMV Infektion in Milz und Leber von CD4+ T Zell-depletierten im Vergleich zu Kontroll-Antikörper behandelten Mäusen.

CD4+ T Zell-depletierte Mäuse zeigten an Tag 18 nach Infektion in Milz und Leber im Vergleich zu Kontroll-Antikörper behandelten Mäusen immer noch einen erhöhten Virustiter im FFA. Bei mit Kontroll-Antikörper behandelten Mäusen lagen die Titer an Tag 18 nach Infektion unter dem Detektionslimit (Milz $p=0,0077$; Leber $p=0,0194$). Für die Berechnung der p-Werte wurde der ungepaarte t-Test verwendet.

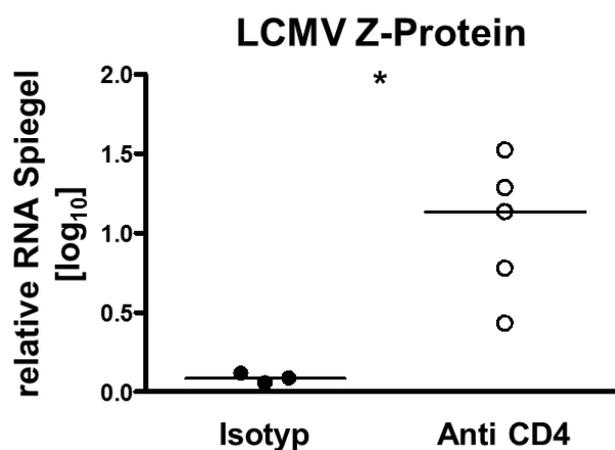


Abb. 17: Relative mRNA-Spiegel (Δct) des LCMV Z-Proteins in der Leber an Tag 18 nach LCMV-WE Infektion, normalisiert auf die Expression des Haushaltgens Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA).

Aus an Tag 18 nach LCMV Infektion entnommenen Leberproben wurde RNA isoliert. Die daraus generierte cDNA wurde für die Real-Time-PCR eingesetzt. In den Leberproben der CIITA^{-/-} Mäuse befand sich signifikant mehr Z-Protein mRNA als in den Proben der Vergleichsgruppe ($p=0,0357$). Für die Berechnung der p-Werte wurde der ungepaarte t-Test verwendet.

Bei der Färbung des LCMV Nukleoproteins in Kryoschnitten an Tag 18 nach Infektion, war in den Lebern der CD4+ T Zell-depletierten Mäuse noch Virus detektierbar, nicht aber in den der Vergleichsgruppe (s. Abb. 18). Dies bestätigt, dass der Grund für die veränderte Infektionskinetik in CIITA^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen anscheinend

durch die CD4+ T Zell-Lymphopenie dieser Tiere begründet war. Die CIITA^{-/-} Mäuse wurden daher für alle weiteren Untersuchungen zur Rolle von CD4+ T Zellen in der LCMV Infektion verwendet.

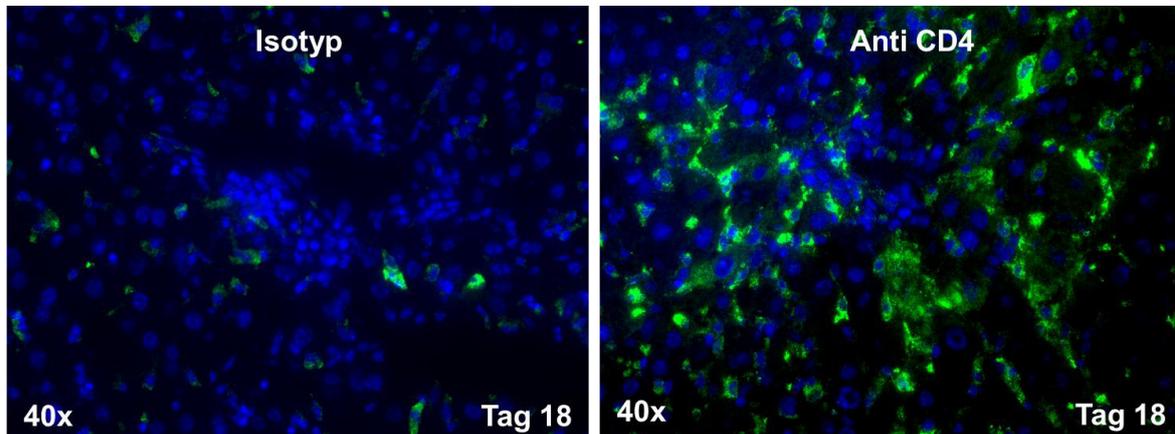


Abb. 18: Fluoreszenzfärbung des LCMV Nukleoproteins in Kryoschnitten der Leber an Tag 18 nach Infektion in CD4+ T Zell-depletierten im Vergleich zu Kontroll-Antikörper behandelten Mäusen.

In den mit CD4-depletierendem Antikörper behandelten Mäusen konnten wesentlich mehr virusbefallene Zellen detektiert werden als in den mit Kontroll-Antikörper behandelten Tieren.

3.4 Serumtransaminasen nach LCMV Infektion

Um herauszufinden, ob es bei der Infektion von Mäusen mit einem CD4+ T Zell-Mangel neben einem erhöhten Virustiter und einer verlängerten Viruspersistenz auch zu einer veränderten Schädigung der Leber kommt, wurde als Surrogatmarker für die Leberschädigung die Konzentration von Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum bestimmt. Normalerweise ist dieses Enzym im Zytoplasma der Hepatozyten enthalten. Bei einer Schädigung der Zellen kommt es zur Freisetzung und dadurch zu einer Erhöhung der Konzentration im Serum. Den Mäusen wurde zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion submandibulär Blut entnommen und der ALT Spiegel wurde im Serum bestimmt (s. Abb. 19).

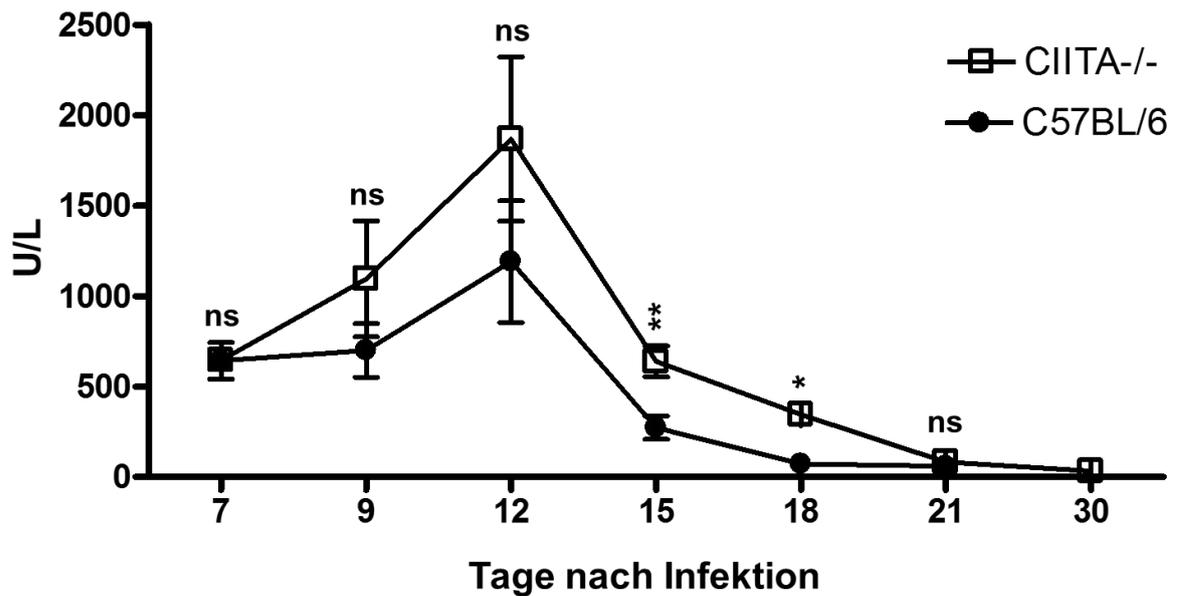


Abb. 19: ALT Werte im Serum zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach LCMV Infektion.

Nach der Infektion mit LCMV-WE wurde den Mäusen Blut entnommen und die ALT-Konzentration im Serum bestimmt. Zu allen Zeitpunkten ab Tag 9 wiesen die CIITA-/- Mäuse eine höhere ALT-Konzentration im Serum auf als die C57BL/6 Vergleichsgruppe. An Tag 15 und 18 unterschieden sich die Werte signifikant (Tag 15 $p=0,0012$; Tag 18 $p=0,0317$).

An Tag 7 nach Infektion lagen die ALT-Werte in beiden Mausgruppen bei durchschnittlich 645 U/L. Zu jedem weiteren Zeitpunkt waren die ALT-Werte in den CIITA-/- Mäusen höher, d. h. die Schädigung der Leber stärker als in den Vergleichsmäusen, wobei sich die Werte an Tag 15 und 18 signifikant unterschieden (Tag 15 $p=0,0012$; Tag 18 $p=0,0317$). In beiden Versuchsgruppen wurde das Maximum der Schädigung an Tag 12 erreicht. In C57BL/6 Wildtyp Mäusen lag die Konzentration bei durchschnittlich 1190 U/L, bei CIITA-/- Mäusen bei durchschnittlich 1868 U/L. Das Maximum der Leberschädigung wird also nach dem Maximum der Viruslast erreicht, welches in CIITA-/- Mäusen und Kontrolltieren an Tag 9 erreicht wurde (s. Abb. 19). In nicht infizierten Mäusen lagen die ALT Werte in beiden Mausgruppen unter der Detektionsgrenze (Daten nicht gezeigt).

Auch bei CD4+ T Zell-Mangel nach anti-CD4 Antikörpergabe wiesen die Mäuse im Vergleich zur Gruppe, die mit irrelevantem Kontroll-Antikörper behandelt wurde, an Tag 18 nach LCMV Infektion eine signifikant höhere ALT-Konzentration im Serum auf ($p=0,0317$). Dabei lag der durchschnittliche Wert bei den C57Bl/6 Wildtyp Vergleichsmäusen bei 60 U/L und bei CIITA-/- Mäusen bei 169 U/L (s. Abb. 20).

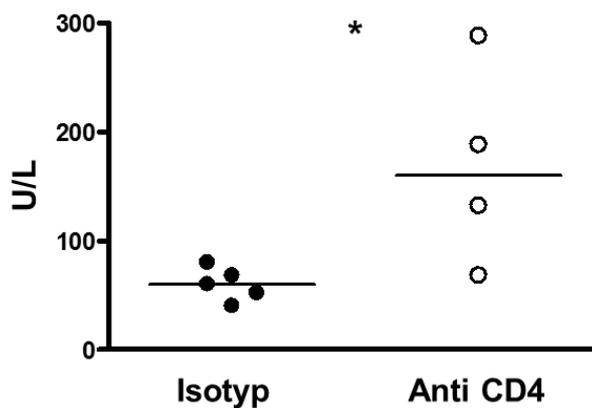


Abb. 20: ALT Werte im Serum von C57BL/6 Wildtyp und CD4+ T Zell-depletierten Mäusen nach CD4-Depletion an Tag 18 nach LCMV Infektion.

Nach Antikörpergabe und Infektion mit LCMV-WE wurde den Mäusen submandibulär Blut entnommen und die ALT-Konzentration im Serum bestimmt. Es gab einen signifikanten Unterschied der ALT-Werte zwischen den beiden Gruppen ($p=0,0317$) mit einer höheren ALT-Konzentration in den CIITA-/- Mäusen.

3.5 Histologische Untersuchung der Leber

Um den Befund einer stärkeren Infiltration der Lebern von CIITA^{-/-} Mäusen nach LCMV-WE Infektion zu überprüfen, wurden Paraffinschnitte der Lebern Hämatoxilin-Eosin (HE) gefärbt und im Mikroskop auf den Grad ihrer Entzündung überprüft. Zwar wurden in beiden Versuchsgruppen starke Infiltrationen der Leber beobachtet, jedoch konnte hier kein konsistenter Unterschied zwischen C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der unterschiedliche Grad der Entzündung in den Mäusen war also nur mittels Durchflusszytometrie, nicht aber anhand von Leberschnitten zuverlässig festzustellen. Abb. 21 zeigt die Infiltration in der Leber einer C57BL/6 Wildtyp Maus an Tag 9 nach Infektion im Vergleich zu einer naiven C57BL/6 Wildtyp Maus.

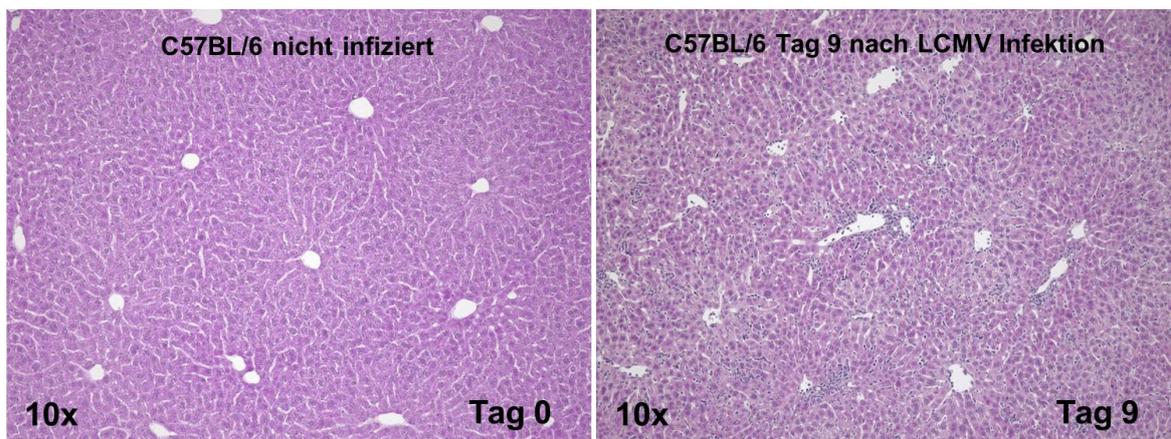


Abb. 21: Infiltration der Leber einer naiven C57BL/6 Wildtyp Maus und an Tag 9 nach Infektion mit LCMV-WE.

Nach Infektion kommt es zur massiven Infiltration der Leber mit Entzündungszellen und zu Läsionen im Lebergewebe.

3.6 Analyse von Milzzellen und mononukleären Leberzellen

Um den Grund für die erhöhte Viruslast, die verlängerte Viruspersistenz und die stärkere Leberschädigung in CIITA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen aufzuklären, wurden Milzzellen und mononukleäre Leberzellen, in denen die Leber-infiltrierenden Entzündungszellen enthalten sind, näher untersucht.

3.6.1 Gesamtzellzahlen in Milz und Leber

Obwohl CIITA^{-/-} Mäusen das CD4⁺ T Zell-Kompartiment fehlte, zeigten beide Versuchsgruppen an Tag 12 nach Infektion eine ähnliche Anzahl Gesamt-Milzzellen (s. Abb. 22). Im Schnitt lagen die Zellzahlen an Tag 12 in der Milz von C57BL/6 Wildtyp Mäusen bei $12,8 \times 10^7$ und in CIITA^{-/-} Mäusen bei $18,1 \times 10^7$ Zellen ($p=0,8421$). Die Zellzahl nahm hier in beiden Versuchsgruppen bis Tag 15 nach Infektion in ähnlichem Maße ab. So lag die durchschnittliche Anzahl in C57BL/6 Wildtyp Mäusen an Tag 15 bei $6,9 \times 10^7$, in CIITA^{-/-} Mäusen bei $6,5 \times 10^7$ Zellen pro Milz.

Weiterhin kam zu einer vergleichbar starken Infiltration der Leber (s. Abb. 22). Die Anzahl mononukleärer Leberzellen an Tag 12 lag bei C57BL/6 Wildtyp Mäusen bei $0,7 \times 10^7$ und bei CIITA^{-/-} Mäusen bei $0,6 \times 10^7$ (Leber $p=0,6607$). Im Gegensatz zur Milz nahm die Zahl mononukleärer Zellen in der Leber von C57BL/6 Wildtyp Mäusen bis Tag 15 nach Infektion zusammen mit der Eliminierung des Virus ab, während sie in der Leber von CIITA^{-/-} Mäusen gleich blieb. Dementsprechend enthielten die Lebern von CIITA^{-/-} Mäusen an Tag 15 nach Infektion mit $0,77 \times 10^7$ Zellen signifikant mehr mononukleäre Zellen als die der Vergleichsgruppe mit $0,35 \times 10^7$ Zellen ($p=0,0003$) (s. Abb. 22).

Demgemäß wiesen die Lebern von CIITA^{-/-} Mäusen initial an Tag 12 ebenso viele mononukleäre Zellen auf wie die von C57BL/6 Wildtyp Mäusen. Jedoch schien die Leberentzündung nachfolgend in CIITA^{-/-} Mäusen nicht im gleichen Maße zurückzugehen, da die Infektion anscheinend nicht effizient bekämpft werden konnte. Die

Ursache könnte eine andere Zusammensetzung des Leberinfiltrats oder eine unterschiedliche Funktion der Entzündungszellen sein. Dies wurde daher in den folgenden Untersuchungen näher beleuchtet.

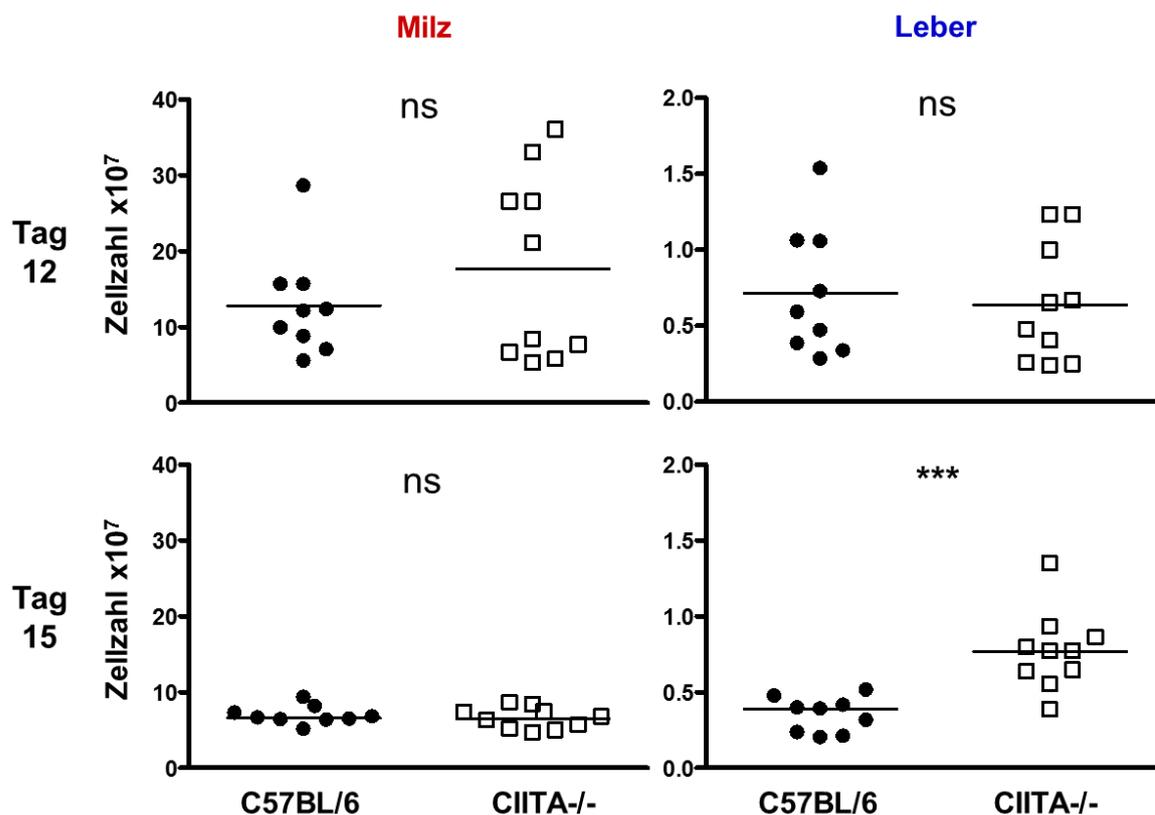


Abb. 22: Gesamtzellzahlen der Milz und mononukleärer Leberzellen von CIITA^{-/-} und C57BL/6 Wildtyp Mäusen an Tag 12 und 15 nach Infektion.

An Tag 12 und 15 in der Milz und an Tag 12 in der Leber gab es keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzellzahl von Milz und Leber beider Gruppen. An Tag 15 nach Infektion hingegen zeigte sich eine deutliche größere Population mononukleärer Leberzellen in den CIITA^{-/-} Mäusen ($p=0,0003$). Die einzelnen Graphiken repräsentieren vereinigte Zellzahlen aus zwei unabhängigen Versuchen.

3.6.2 Anzahl von NK-Zellen, NKT-Zellen, Makrophagen und B-Zellen

Um herauszufinden, ob in den beiden Versuchsgruppen unterschiedliche Zellpopulationen zur Entzündung in der Leber beitrugen und so auch möglicherweise einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion nehmen konnten, wurden Gesamt-Milzzellen und mononukleäre Leberzellen an Tag 15 nach Infektion isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Zahl an Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen, NK1.1+ Lymphozyten), Natürlichen Killer T Zellen (NKT-Zellen, NK1.1+/CD3+ Lymphozyten), eine Gruppe von T Zellen, die NK-Zell-Marker exprimiert [40], Makrophagen (F4/80+ Zellen) und B-Zellen (B220+ Lymphozyten) untersucht (s. Abb. 23).

In den Milzzellen der CIITA^{-/-} und der Kontrolltiere befanden sich vergleichbare hohe Zahlen an F4/80+ Makrophagen ($p=0,6820$) und B220+ B-Zellen ($p=0,6558$). Jedoch wiesen die Milzen der CIITA^{-/-} Mäuse signifikant weniger NK- ($p=0,0097$) und NKT-Zellen ($p=0,0155$) auf. Innerhalb der mononukleären Leberzellen gab es aber keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpopulationen (NK-Zellen $p=0,4347$; NKT-Zellen $p=0,2994$; Makrophagen $p=0,3617$; B-Zellen $p=0,1078$). Diese vier Zellpopulationen trugen also nicht zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Leber-infiltrierenden Zellen bzw. zur erhöhten Zellzahl in den Lebern von CIITA^{-/-} Mäusen an Tag 15 nach Infektion bei. NK- und NKT-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem. Wie das Fehlen der CD4+ T Zell-Hilfe zu einer geringeren Anzahl dieser Zellen in der Milz führen konnte, ist nicht ersichtlich.

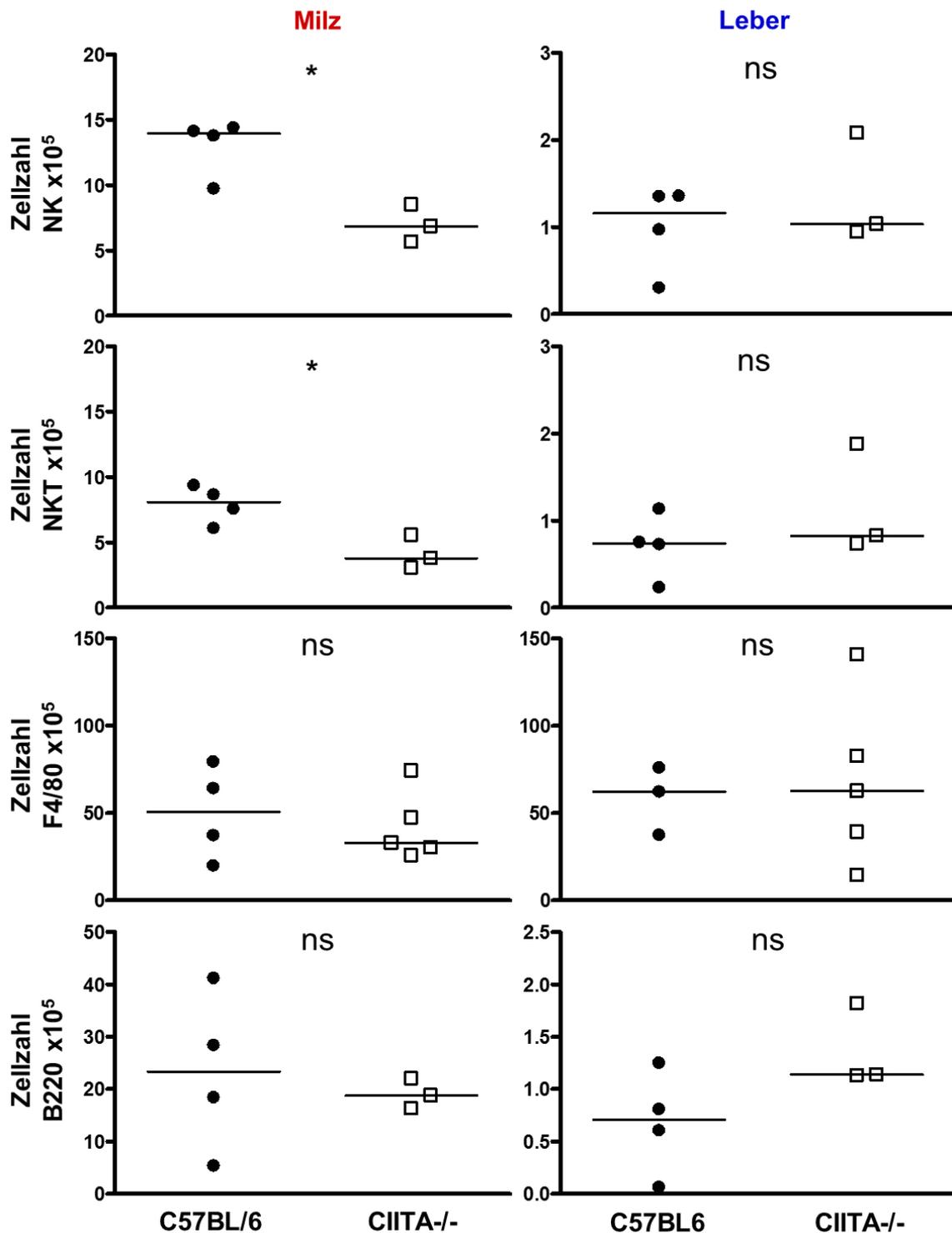


Abb. 23: Gesamtzahl an Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), Natürlichen Killer T Zellen (NKT-Zellen), Makrophagen (F4/80+ Zellen) und B-Zellen (B220+ Zellen) in Milz und Leber an Tag 15 nach LCMV Infektion in CIITA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

Die Milzen von CIITA^{-/-} Mäusen wiesen eine signifikant niedrigere Anzahl NK-Zellen auf (NK1.1+ Lymphozyten; $p=0,0097$). Außerdem besaßen sie eine signifikant niedrigere Anzahl NKT-Zellen (NK1.1+/CD3+ Lymphozyten; $p=0,0155$). In der Leber waren die Zellzahlen nicht signifikant unterschiedlich (NK-Zellen $p=0,4347$; NKT-Zellen $p=0,2994$). F4/80+ Makrophagen und B220+ Lymphozyten (B-Zellen) unterschieden sich weder signifikant in der Milz noch in der Leber der beiden Versuchsgruppen (Makrophagen: Milz $p=0,6820$, Leber $p=0,3617$; B-Zellen: Milz $p=0,6558$, Leber $p=0,1078$).

3.6.3 Analyse der Gesamt-CD8+ T Zellzahl

Da die Viruselimination in der LCMV Infektion vor allem von einer effizienten CD8+ T Zell-Antwort abhängt, wurde auch die Gesamt-CD8+ T Zellzahl in Milz und Leber der beiden Versuchsgruppen überprüft. Die Gesamt-CD8+ T Zellen expandierten in der Milz von Tag 12 zu Tag 15 in beiden Versuchsgruppen zunächst gleich stark und es zeigten sich jeweils keine Unterschiede in der Zellzahl (s. Abb. 24). In der Leber dagegen waren an Tag 12 nach Infektion mit durchschnittlich $11,6 \times 10^5$ in CIITA^{-/-} Mäusen vs. $29,9 \times 10^5$ in C57BL/6 Wildtyp Mäusen, deutlich weniger CD8+ T Zellen in den Lebern der CIITA^{-/-} Mäuse zu finden ($p=0,0317$). An Tag 15 nach Infektion war die Anzahl der Gesamt-CD8+ T Zellen in beiden Versuchsgruppen vergleichbar hoch.

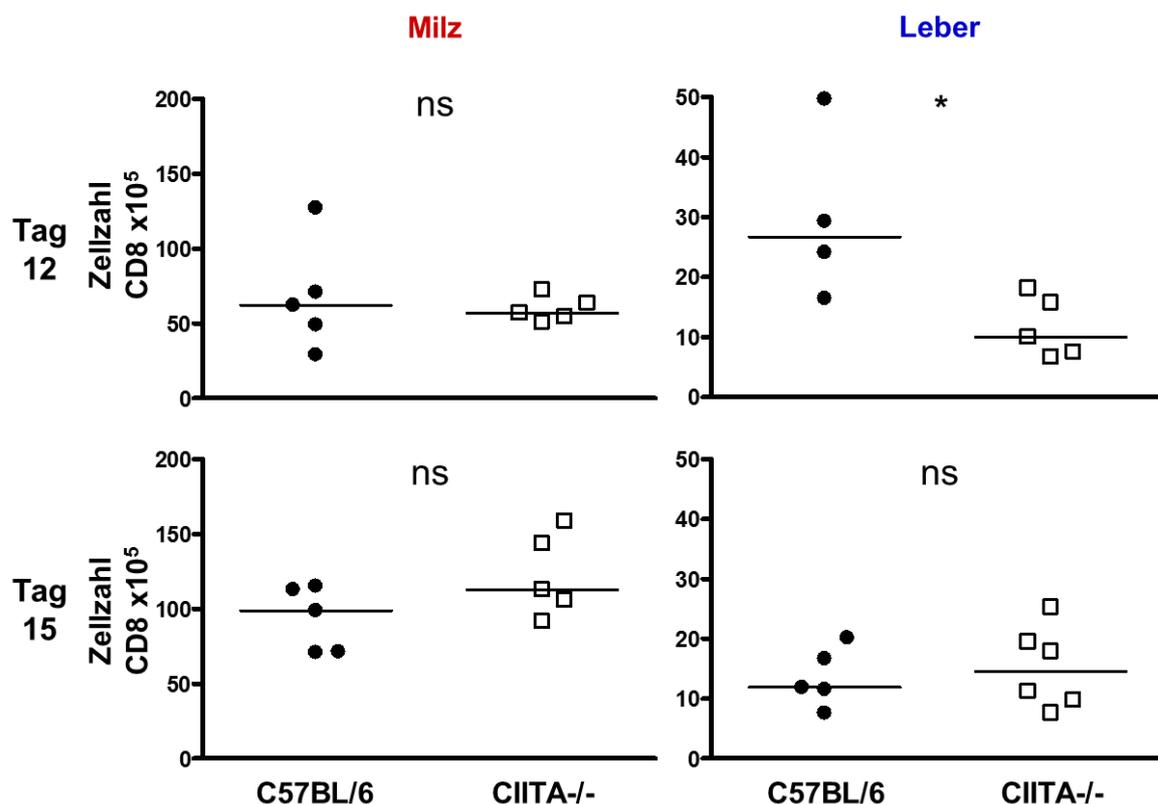


Abb. 24: CD8+ T Zellzahl an Tag 12 und 15 nach LCMV Infektion in Milz und Leber von CIITA^{-/-} und C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

Es gab zwischen den beiden Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied in der CD8+ T Zellzahl an Tag 12 in der Milz und an Tag 15 in Milz und Leber. An Tag 12 enthielten die mononukleären Leberzellen der CIITA^{-/-} Mäuse signifikant weniger CD8+ T Zellen als die der C57BL/6 Vergleichsgruppe ($p=0,0317$).

Obwohl sich die Gesamtzahl der mononukleären Leberzellen an Tag 12 nach Infektion nicht unterschied, führte der CD4+ T Zell-Mangel der CIITA-/- Mäuse anscheinend zu einer reduzierten Expansion oder Rekrutierung von CD8+ T Zellen in die Leber. Die CD8+ T Zellen in C57BL/6 Wildtyp Mäusen expandierten und wurden in die Leber rekrutiert. So konnten sie die Infektion bekämpfen, und ihre Anzahl ging bei nachlassender Virämie an Tag 15 wieder zurück.

3.7 Funktionelle Analyse der CD8+ T Zellantwort

Da die LCMV Viruselimination nicht nur von der Anzahl, sondern vor allem von der Effizienz der zytotoxischen CD8+ T Zell-Antwort (CTL-Antwort- cytotoxic T lymphocyte) abhängt, wurden CD8+ T Zellen an Tag 12 und 15 nach Infektion hinsichtlich ihrer LCMV Spezifität, Aktivierung, Zytokinproduktion, Degranulation und ihrer inhibitorischen Moleküle mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden die Zellen an Tag 12 und 15 nach Infektion isoliert und die entsprechenden Oberflächenmoleküle angefärbt. Für die Bestimmung der Zytokinproduktion und die Messung der Degranulationsfähigkeit der LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen wurden diese vor der Färbung Antigen-spezifisch mit MHC I-restringiertem, immundominantem gp33 LCMV Peptid restimuliert. LCMV-spezifische CD8+ T Zellen wurden mit Fluoreszenz-markierten Dextrameren gefärbt (s. Kapitel 2.6.10).

3.7.1 Analyse der virusspezifischen CD8+ T Zell-Antwort

Für die Analyse der virusspezifischen CD8+ T Zell-Antwort wurden an Tag 12 und 15 nach Infektion Milzzellen und mononukleäre Leberzellen aus CIITA-/- Mäusen und C57BL/6 Wildtyp Mäusen isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre virusspezifischen CD8+ T Zellen hin untersucht. An Tag 12 nach Infektion zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl Dextramer+ LCMV-spezifischer CD8+ T Zellen in

Milz und Leber der CIITA^{-/-} und der Kontrollmäuse (Milz $p=0,1508$; Leber $p=0,0556$) (s. Abb. 25). Doch ist eine Tendenz zu einer geringeren Zahl virusspezifischer Zellen in CIITA^{-/-} Mäusen erkennbar. Während die Zahl Dextramer⁺ LCMV-spezifischer CD8⁺ T Zellen in Milz und Leber von C57BL/6 Wildtyp Mäusen von Tag 12 zu Tag 15 im Schnitt zunahm, blieb die Zahl in der Leber von CIITA^{-/-} Mäusen annähernd gleich. So befanden sich an Tag 15 nach Infektion sowohl in der Milz als auch in der Leber signifikant weniger LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen in den CIITA^{-/-} Mäusen (Milz $p=0,0016$; Leber $p=0,0028$) (s. Abb. 25). Abb. 26 zeigt einen repräsentativen Dotplot der LCMV-spezifischen Dextramerfärbung.

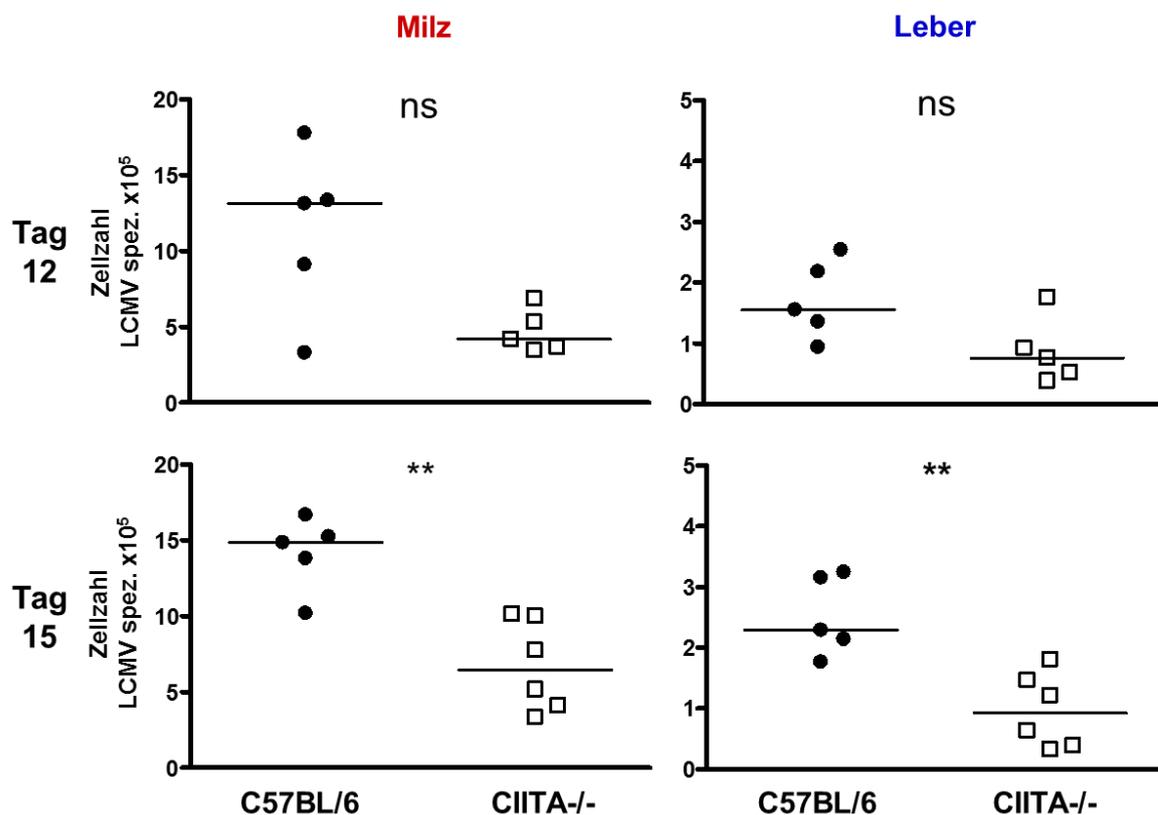


Abb. 25: LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen in Milz und Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen an Tag 12 und 15 nach Infektion.

C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäuse wurden mit LCMV infiziert, an Tag 15 nach Infektion wurden Milzzellen und mononukleäre Leberzellen isoliert und mit Antikörper gegen CD8 und mit LCMV-spezifischem Dextramer gefärbt. In den CIITA^{-/-} Mäusen gab es an Tag 12 tendentiell (Milz $p=0,1508$; Leber $p=0,0556$) und an Tag 15 signifikant weniger Dextramer⁺ LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen in den CIITA^{-/-} Mäusen (Milz $p=0,0016$; Leber $p=0,0028$).

Während die Gesamt-CD8+ T Zellzahl in C57BL/6 Wildtyp Mäusen von Tag 12 zu Tag 15 wieder abnahm, expandierten die LCMV-spezifischen CTL in C57BL/6 Wildtyp Mäusen weiter und führten zur effizienten Eliminierung des Virus. An Tag 15 nach Infektion war das Virus in fast allen Tieren eliminiert (s. Abb. 11), so dass die Population an Gesamt-CD8+ T Zellen in der Leber kontrahierte (s. Abb. 24), während die Frequenz LCMV-spezifischer CTL erhöht war (s. Abb. 25). C57BL/6 immunkompetente Wildtyp Mäuse mit intakter CD4+ T Zell-Hilfe konnten das Virus also durch die Expansion spezifischer CTL schnell und effizient eliminieren, so dass die Gesamtzahl an CD8+ T Zellen in der Leber der Tiere abnahm, während die LCMV-spezifischen CTL das Virus effizient bekämpfen konnten.

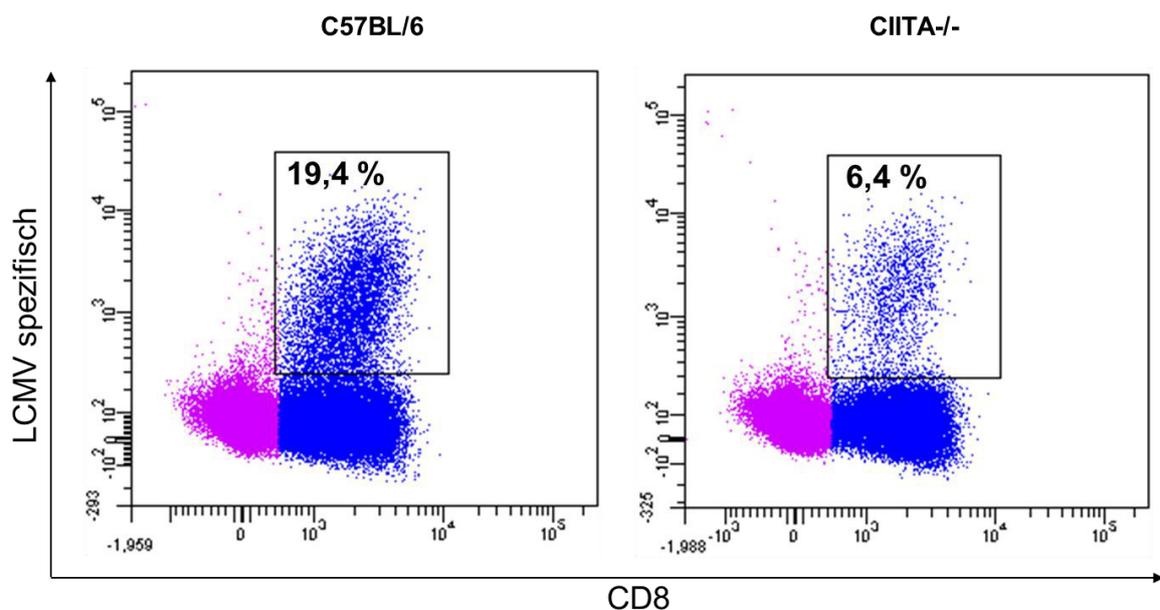


Abb. 26: Repräsentativer Dotplot einer Färbung LCMV-spezifischer CD8+ T Zellen in der Leber von C57BL/6 Wildtyp bzw. CIITA-/- Mäusen an Tag 15 nach LCMV Infektion. CIITA-/- Mäuse besaßen deutlich weniger virusspezifische CD8+ T Zellen im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

3.7.2 Aktivierung der CD8+ T Zellen

CD8+ T Gesamtzellen und Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen aus Milz und Leber wurden mittels der Oberflächenmarker CD44 und CD69 auf ihre Aktivierung

überprüft. Innerhalb der Gesamt-CD8+ T Zellpopulation gab es, sowohl in der Milz als auch in der Leber, keinen Unterschied in der Expression der beiden Oberflächenmarker (CD44: Milz $p=0,3517$, Leber $p=0,8180$; CD69: Milz $p=0,1606$, Leber $p=0,2387$) (s. Abb. 27). Die Gesamt-CD8+ T Zellpopulation ist also in beiden Versuchsgruppen ähnlich gut aktiviert.

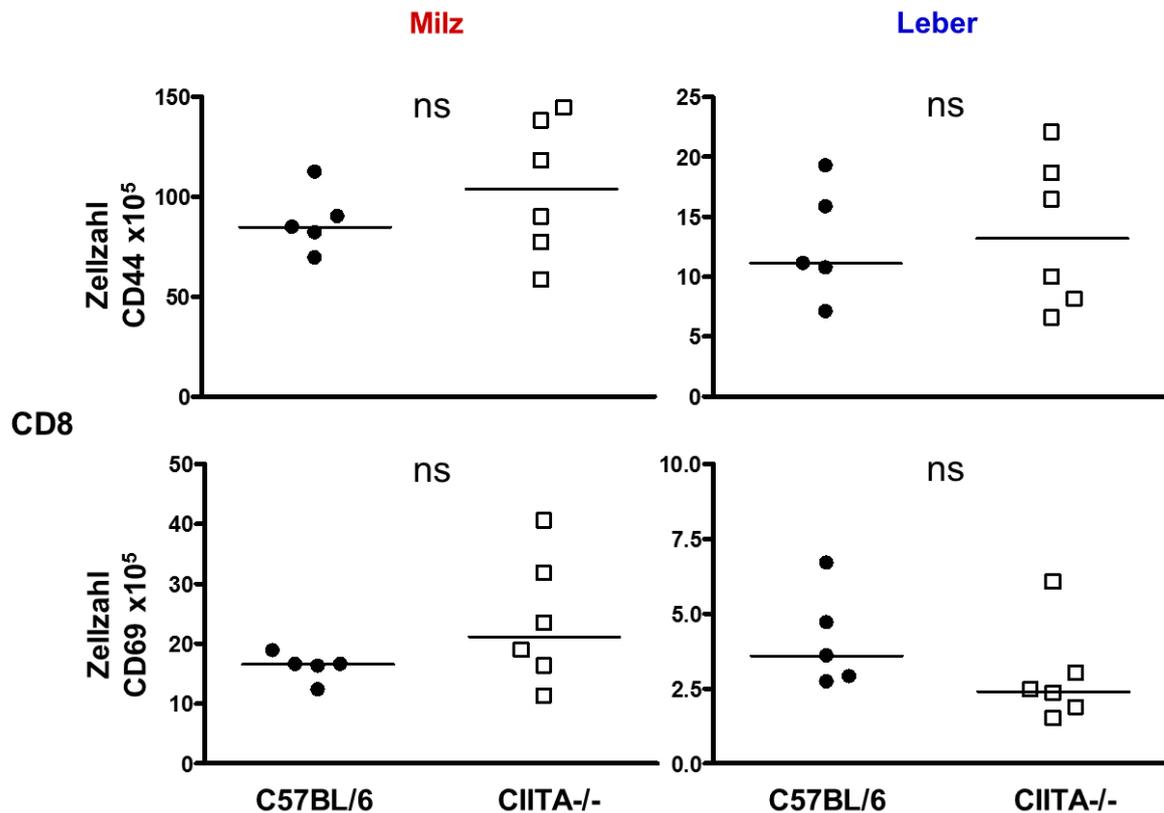


Abb. 27: CD44+ und CD69+ CD8+ T Zellen in Milz und Leber an Tag 15 nach LCMV-WE Infektion in C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen.

In der gesamten CD8+ T Zell-Population gab es vergleichbar viele CD44+ und CD69+ Zellen in der Milz und in der Leber von CIITA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen (CD44: Milz $p=0,3517$, Leber $p=0,8180$; CD69: Milz $p=0,1606$, Leber $p=0,2387$).

Anders als bei den Gesamt-CD8+ T Zellen, zeigten sich bei den LCMV-spezifischen Dextramer+ CD8+ T Zellen signifikante Unterschiede in der Expression von CD44 und CD69 in der Milz und in der Leber. Weniger Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen exprimierten CD44 in den CD4+ T Zell-lymphopenischen CIITA^{-/-} Mäusen (Milz $p=0,0017$, Leber $p=0,0027$). Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass

es in CIITA^{-/-} Mäusen weniger Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen gibt: so dass auch insgesamt weniger LCMV-spezifische Zellen aktiviert sein können. Beim Vergleich der Zellzahlen der Dextramer+ LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen in Abb. 25 und der CD44+ Dextramer+ LCMV-spezifischen Zellen in Abb. 28 fällt auf, dass in etwa die gleiche Anzahl Zellen LCMV-spezifisch und CD44+ ist, also quasi alle LCMV-spezifischen Zellen auch den Aktivierungsmarker CD44 exprimieren. Der Aktivierungsmarker CD69 wurde nur auf einem Teil der LCMV-spezifischen Zellen exprimiert (s. Abb. 28), doch insgesamt sind auch hier weniger Dextramer+ LCMV-spezifische Zellen der CIITA^{-/-} Mäuse positiv für CD69, wobei der Unterschied in der Leber signifikant war (Milz $p=0,1680$; Leber $p=0,0012$).

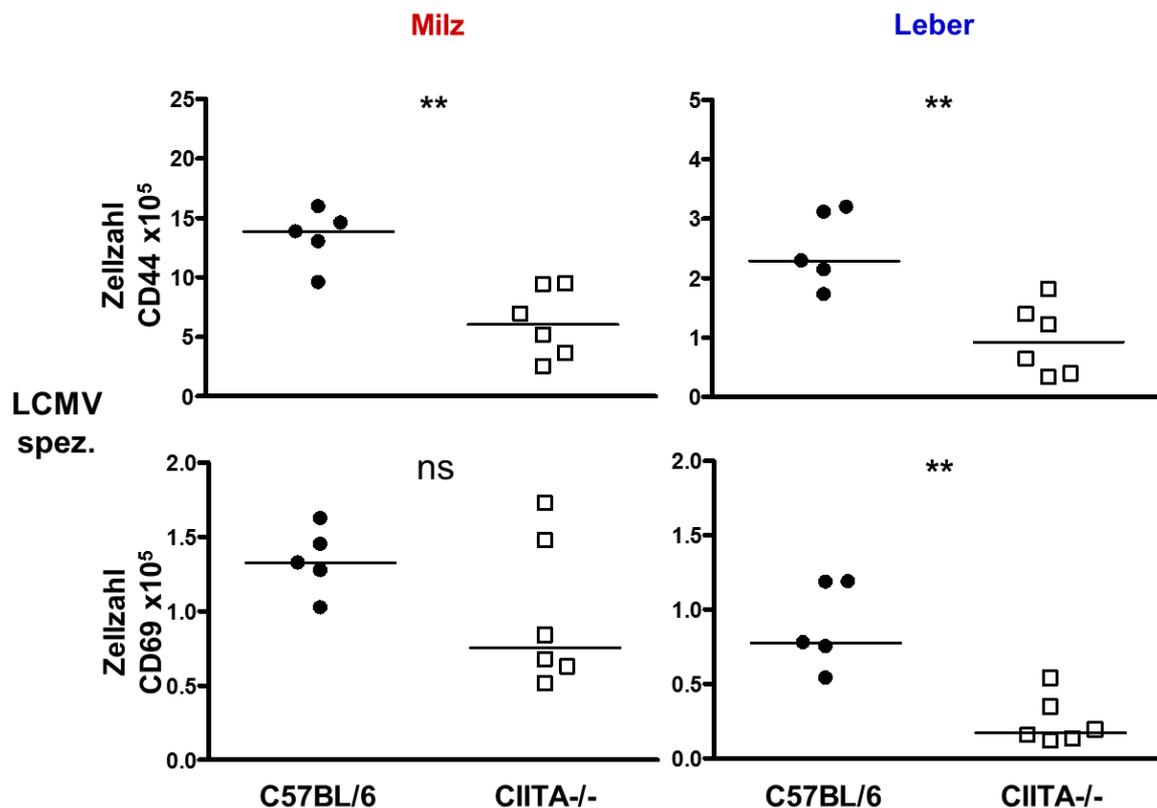


Abb. 28: CD44 und CD69 positive LCMV-spezifische CD8+ T Zellen in Milz und Leber an Tag 15 nach LCMV-WE Infektion in C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen.

Es gab sowohl in der Milz als auch in der Leber von CIITA^{-/-} Mäusen eine geringere Anzahl CD44+ und CD69+ Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen (CD44: Milz $p=0,0017$, Leber $p=0,0027$; CD69: Milz $p=0,1680$, Leber $p=0,0012$).

Innerhalb der Gesamt-CD8+ T Zellen sind also vergleichbar viele Zellen in beiden Versuchsgruppen aktiviert (s. Abb. 27), obwohl es in den CIITA^{-/-} Mäusen weniger LCMV-spezifische Zellen gibt (s. Abb. 25). In den CIITA^{-/-} Mäusen war also eine größere Anzahl unspezifischer CD8+ T Zellen aktiviert. Da CIITA^{-/-} Mäuse deutlich weniger Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen enthielten, ist hier auch die Anzahl CD44+ bzw. CD69+ Dextramer+ LCMV-spezifischer aktivierter CD8+ T Zellen deutlich niedriger.

3.7.3 Zytokinproduktion der CD8+ T Zellen

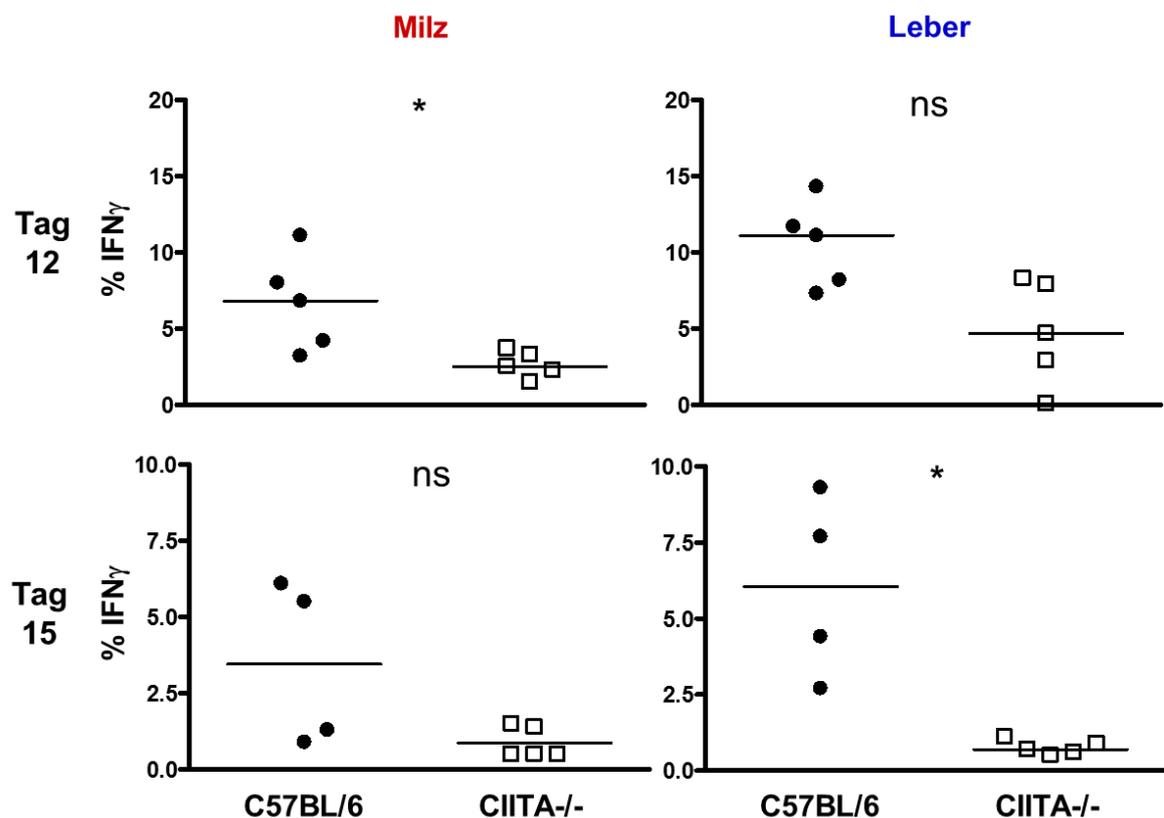


Abb. 29: IFN γ Produktion von CD8+ T Zellen an Tag 12 und 15 nach LCMV Infektion in Milz und Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen.

Gesamtmilzzellen und mononukleäre Leberzellen wurden isoliert und antigenspezifisch mit gp33-Peptid restimuliert. Es wurde eine CD8 Oberflächenfärbung sowie eine intrazelluläre IFN γ Färbung durchgeführt. In beiden Organen und zu beiden Zeitpunkten gab es weniger IFN γ produzierende CD8+ T Zellen in den CIITA^{-/-} Mäusen (Tag 12: Milz $p=0,0317$, Leber $p=0,0556$; Tag 15: Milz $p=0,0746$, Leber $p=0,0054$).

In der antiviralen zytotoxischen CD8+ T Zell-Antwort ist u. a. die Fähigkeit zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen, antiviralen Zytokinen entscheidend für die Klärung der Infektion. Dazu gehören IFN γ und TNF α . Um die Menge an IFN γ und TNF α produzierender LCMV-spezifischer CD8+ T Zellen zu bestimmen, wurden Milzzellen und mononukleäre Leberzellen isoliert und Antigen-spezifisch mit immundominantem gp33 LCMV Peptid restimuliert. Dann wurden eine CD8 Oberflächenfärbung und eine intrazelluläre Zytokinfärbung für IFN γ bzw. TNF α durchgeführt.

Zu beiden Zeitpunkten, sowohl in der Milz als auch in der Leber, bildeten die CD8+ T Zellen der CIITA $^{-/-}$ Mäuse weniger IFN γ (s. Abb. 29). In der Milz an Tag 12 und in der Leber an Tag 15 waren die Unterschiede signifikant (Tag 12: Milz p=0,0317, Leber p=0,0556; Tag 15: Milz p=0,0746, Leber p=0,0054). In Abb. 30 ist ein repräsentativer Dotplot der IFN γ Produktion der Leber-infiltrierenden LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen an Tag 15 dargestellt.

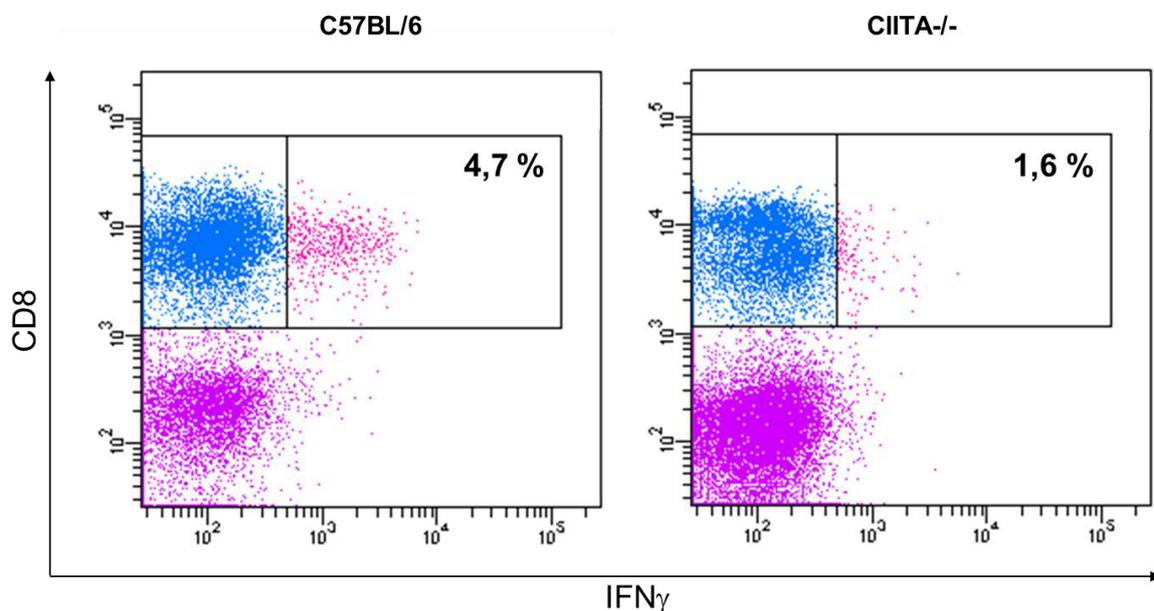


Abb. 30: Repräsentativer Dotplot der IFN γ Produktion in der Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA $^{-/-}$ Mäusen an Tag 15 nach Infektion.

CD8+ T Zellen aus CIITA $^{-/-}$ Mäusen bildeten weniger IFN γ nach LCMV-spezifischer Restimulation mit dem immundominantem gp33-Peptid als CD8+ T Zellen aus C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

Die TNF α Produktion wurde bisher nur an Tag 12 überprüft. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Milz, aber ein tendentieller Unterschied in der Leber, mit weniger TNF α produzierenden Zellen in den CIITA $^{-/-}$ Mäusen (Milz $p=1,0000$; Leber $p=0,1905$) (s. Abb. 31). Dabei ist einer von fünf Werten in der Leber ungewöhnlich hoch (21,3 %), während die anderen Werte deutlich unter der Anzahl TNF α produzierender Zellen aus C57BL/6 Wildtyp Mäusen lagen. Die fehlende Signifikanz des Expressionsunterschieds in der Leber ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen.

Abb. 32 zeigt einen repräsentativen Dotplot der TNF α Färbung in CD8 $^{+}$ T Zellen. Diese Daten sind konsistent mit dem Befund, dass CIITA $^{-/-}$ Mäuse nach Infektion weniger LCMV-spezifische CD8 $^{+}$ T Zellen besaßen. So konnten sie nach LCMV-spezifischer Restimulation auch weniger antivirale Zytokine produzieren, was bei der beeinträchtigten Viruselimination in CIITA $^{-/-}$ Mäusen eine Rolle spielen könnte.

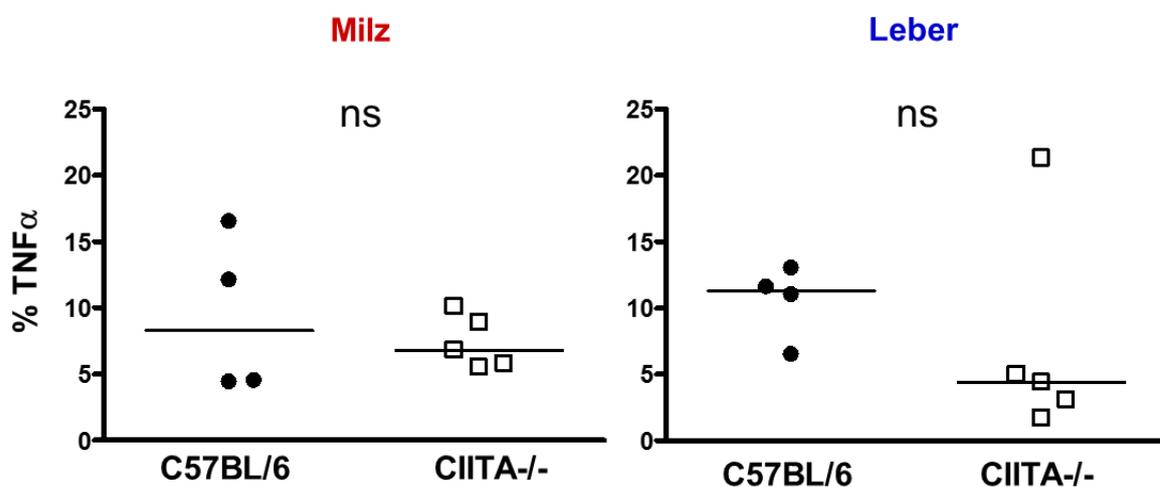


Abb. 31: TNF α Produktion CD8 $^{+}$ T Zellen in Milz und Leber in C57BL/6 Wildtyp im Vergleich zu CIITA $^{-/-}$ Mäusen an Tag 12 nach Infektion.

Gesamtmilzzellen und mononukleäre Leberzellen wurden isoliert und Antigen-spezifisch mit gp33-Peptid restimuliert. Es wurde eine CD8 Oberflächenfärbung sowie eine intrazelluläre TNF α Färbung durchgeführt. In der Milz gab es keinen Unterschied im TNF α Gehalt zwischen beiden Gruppen. In der Leber wiesen die CIITA $^{-/-}$ Mäuse weniger TNF α positive Zellen auf, wenn der Unterschied auch nicht signifikant war ($p=0,1905$).

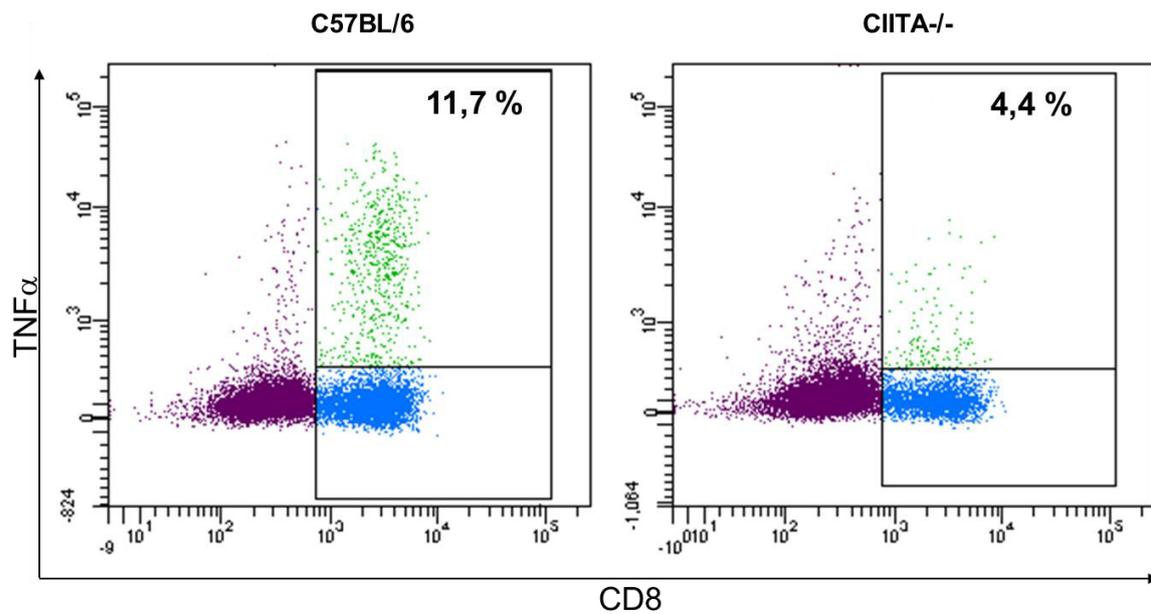


Abb. 32: Repräsentativer Dotplot der TNF α Färbung CD8+ T Zellen in der Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen an Tag 12 nach Infektion.

CIITA^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen weniger TNF α positive CD8+ T Zellen in der Leber auf.

3.7.4 Degranulation der CD8+ T Zellen

Außer der antiviralen Zytokinproduktion trägt vor allem die Fähigkeit zur Degranulation zum zytotoxischen Potential von CD8+ T Zellen bei. Die Degranulationsfähigkeit einer Zelle bestimmt über ihre Fähigkeit, virusbefallene Zellen im direkten Zell-Zell-Kontakt durch die Ausschüttung zytotoxischer Granula zu eliminieren und auf diese Weise die Verbreitung des Virus einzudämmen.

Zur Bestimmung dieser Degranulationsfähigkeit wurde die extrazelluläre Lokalisation von CD107a auf CD8+ T Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. CD107a befindet sich auf der Membran der Granula. Degranuliert die Zelle, verschmelzen die Membranen von Granula und Zelle und CD107a transloziert auf die Oberfläche der CD8+ T Zellen. Milzzellen und mononukleäre Leberzellen wurden an Tag 12 und 15 antigenspezifisch mit immundominantem gp33 LCMV Peptid restimuliert. Als Positiv-Kontrolle diente die Restimulation mit Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) und Ionomycin (Daten nicht gezeigt).

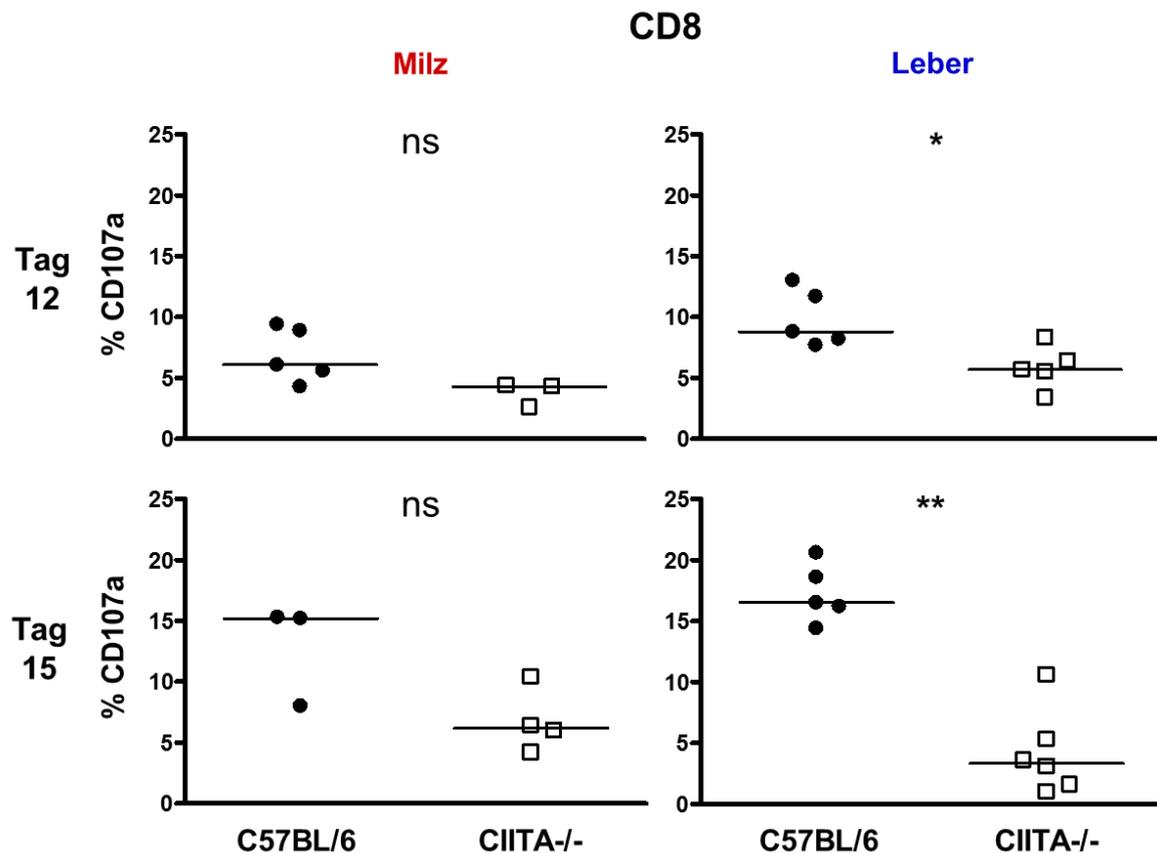


Abb. 33: Expression von CD107a auf CD8+ T Zellen in Milz und Leber an Tag 12 und 15 nach LCMV Infektion.

In der Milz zeigte sich kein signifikanter Unterschied an Tag 12 und 15 nach Infektion (Tag 12 $p=0,0660$; Tag 15 $p=0,0624$), doch die mononukleären Zellen der Leber aus CIITA^{-/-} Mäusen waren zu beiden Zeitpunkten signifikant weniger fähig zu degranulieren (Tag 12 $p=0,0317$; Tag 15 $p=0,0043$). Für die statistische Auswertung der CD107a-Färbung in der Milz wurde der ungepaarte t-Test verwendet.

Es wurde sowohl die gesamte CD8+ T Zell-Population (s. Abb. 33), als auch die Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zell-Population auf ihre Degranulationsfähigkeit überprüft (s. Abb. 34). Innerhalb der Gesamt-CD8+ T Zellen zeigten sich in der Milz zu beiden Zeitpunkten zwar tendentiell, aber nicht signifikant weniger CD107a+ degranulierte Zellen in den CIITA^{-/-} Mäusen (Tag 12 $p=0,0660$; Tag 15 $p=0,0624$). Der Unterschied in der Leber hingegen war signifikant (Tag 12 $p=0,0317$; Tag 15 $p=0,0043$).

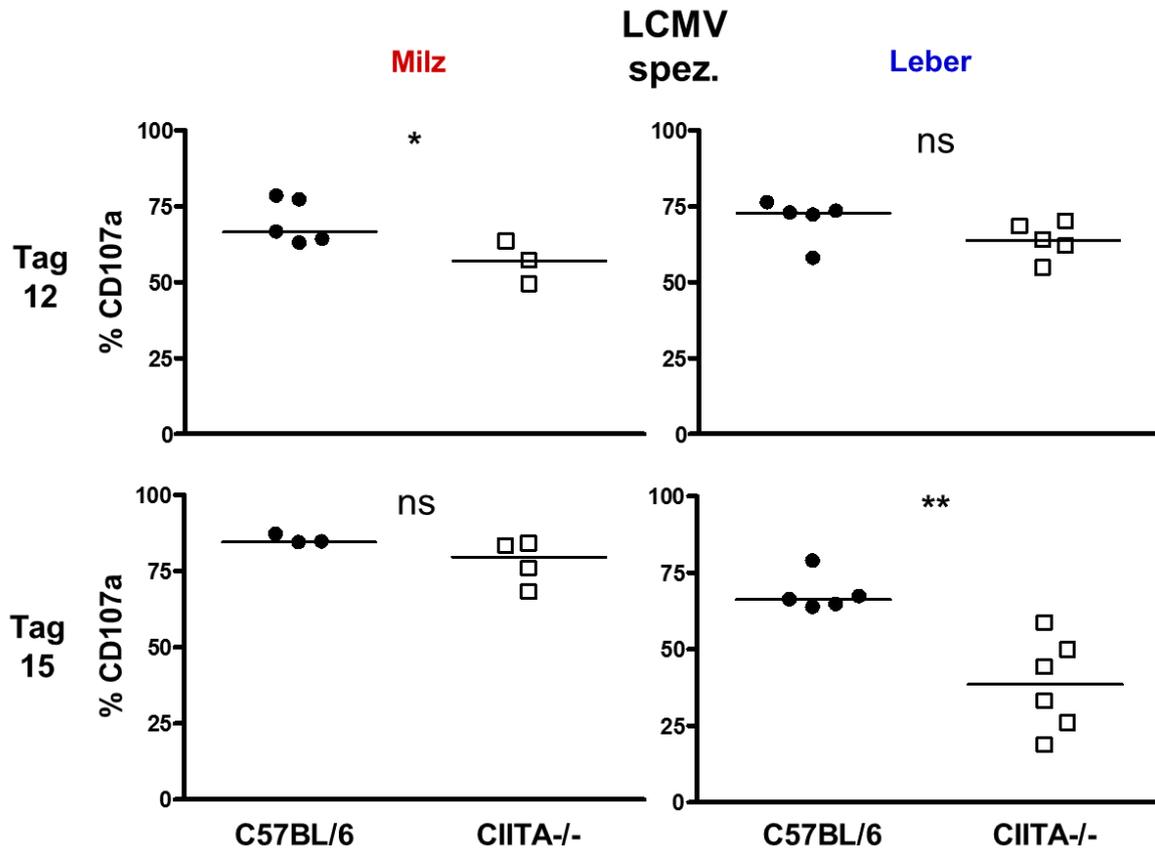


Abb. 34: Expression von CD107a auf LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen in Milz und Leber an Tag 12 und 15 nach LCMV Infektion.

An Tag 12 waren weniger Dextramer+ LCMV-spezifische Milzzellen der CIITA^{-/-} Mäuse in der Lage zu degranulieren ($p=0,0472$). An Tag 15 zeigte sich kein solcher Unterschied ($p=0,1520$). An Tag 12 konnten im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen tendenziell weniger mononukleäre Leberzellen der CIITA^{-/-} Mäuse degranulieren ($p=0,0952$). An Tag 15 nach Infektion war der Unterschied in der Leber signifikant ausgeprägt ($p=0,0043$). Für die statistische Auswertung der CD107a-Färbung in der Milz wurde der ungepaarte t-Test verwendet.

Unter den Dextramer+ LCMV-spezifischen Milz-CD8+ T Zellen gab es an Tag 12 in CIITA^{-/-} Mäusen signifikant weniger degranulierte Zellen ($p=0,0472$). An Tag 15 bestand dieser Unterschied nicht mehr ($p=0,1520$) (s. Abb. 34). An Tag 12 befanden sich mit einem p-Wert von 0,0952 tendenziell weniger degranulierte Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen unter den mononukleären Leberzellen der CIITA^{-/-} Mäuse. An Tag 15 war dieser Unterschied signifikant ausgeprägt ($p=0,0043$) und es befanden sich weniger CD107a positive Zellen in der Leber der CIITA^{-/-} Mäuse (s. Abb. 34).

Abb. 35 zeigt einen repräsentativen Dotplot der LCMV-spezifischen Dextramerfärbung und der CD107a Färbung dieser Zellen in den mononukleären Leberzellen beider Mauslinien an Tag 15 nach Infektion.

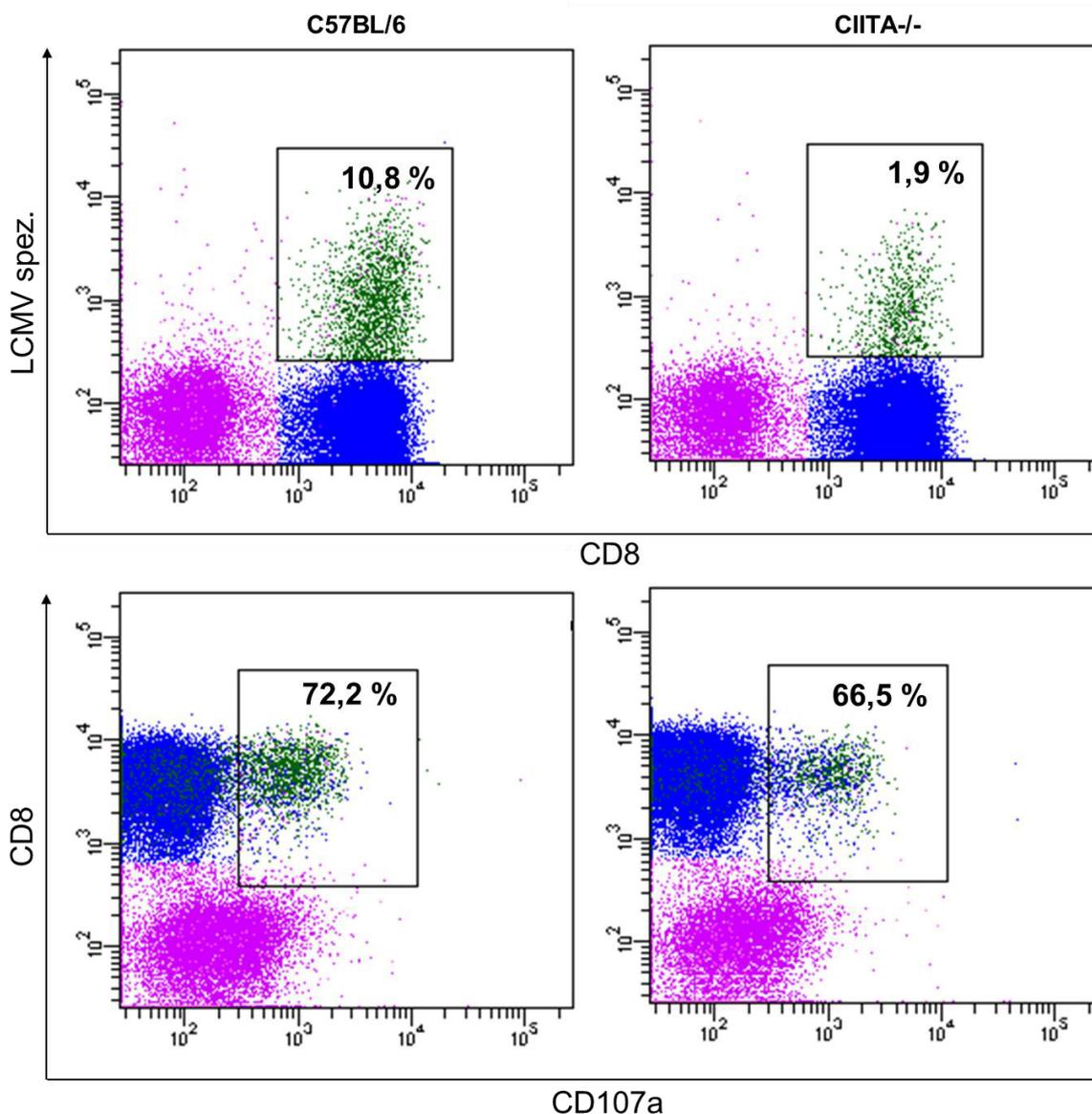


Abb. 35: Repräsentativer Dotplot einer LCMV-spezifischen Dextramerfärbung von CD8+ T Zellen (oben) und einer CD107a Färbung dieser Zellen (unten) in C57BL/6 Wildtyp Mäusen (links) und CIITA^{-/-} Mäusen (rechts) (Leber, Tag 15).

In den oberen beiden Abbildungen sind die LCMV-spezifischen (grün) CD8+ T Zellen (blau) eingegrenzt und ihr prozentualer Anteil abhängig von der CD8+ T Zell-Population angegeben. Ungefärbte Zellen sind in pink dargestellt. In den unteren beiden Abbildungen ist der CD107a positive Anteil der CD8+ T Zellen eingegrenzt und der prozentuale Anteil abhängig von den Dextramer+ LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen angegeben. CIITA^{-/-} Mäuse besaßen signifikant weniger CD107a positive Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen.

3.7.5 Exhaustion der CD8+ T Zellen

Bei der Entwicklung einer chronischen LCMV Infektion ist vor allem die Erschöpfung der Zellen, die sogenannte „Exhaustion“, also der Funktionsverlust der CD8+ T Zellen ein Problem. Durch die anhaltende Stimulation durch Virusantigen erschöpfen die aktivierten Zellen und sind nicht mehr in der Lage, virusbefallene Zellen zu eliminieren. Solche Zellen sind durch die Expression inhibitorischer Moleküle, vor allem PD-1 gekennzeichnet. Um zu überprüfen, ob die beeinträchtigte Viruselimination durch eine Erschöpfung der LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen begründet war, wie es in einer chronischen Infektion normalerweise der Fall ist, wurden diese auf die Expression von PD-1 an Tag 15 nach Infektion getestet.

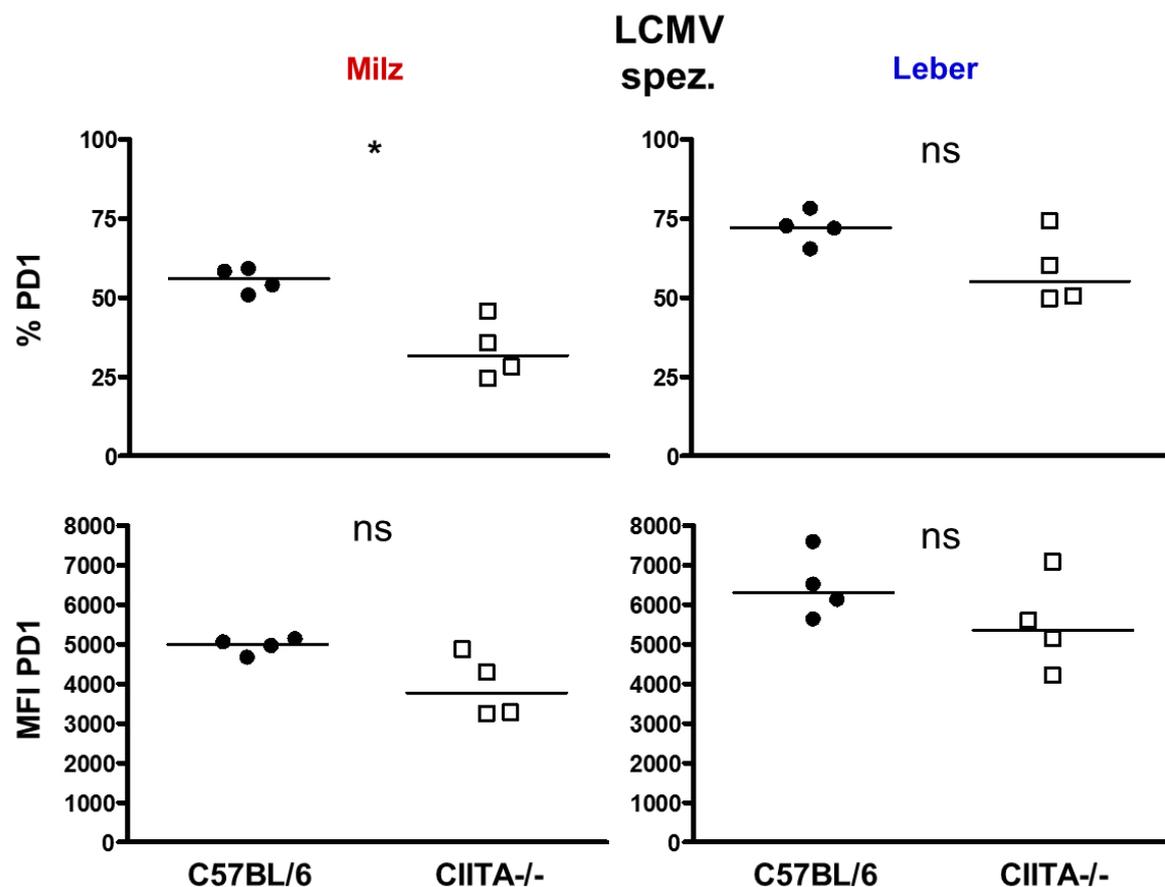


Abb. 36: Prozentualer Anteil und Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) von PD-1+ Zellen in Dextramer+ LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen aus Milz und Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA-/- Mäusen.

Dextramer+ LCMV-spezifische CD8+ T Zellen aus CIITA-/- Mäusen wiesen tendentiell, in der Milz prozentual sogar eine signifikant geringere PD-1 Expression auf ($p=0,0286$).

Hierbei wurde sowohl der prozentuale Anteil PD-1 exprimierender Zellen, als auch die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des PD-1 Signals der virusspezifischen Zellen überprüft. Die MFI gibt die durchschnittliche Fluoreszenzstärke, also die durchschnittliche Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff, der einzelnen Zellen einer gemessenen Zellpopulation an. Überraschenderweise wiesen die LCMV-spezifischen Dextramer+ CD8+ T Zellen der CIITA^{-/-} Mäuse tendentiell niedrigere MFI für PD-1 auf. Auch der prozentuale Anteil der PD-1+ Zellen in CIITA^{-/-} Mäusen war erniedrigt, in der Milz sogar in signifikantem Maße ($p=0,0286$) (s. Abb. 36). Die Persistenz der LCMV-WE Infektion in den CD4+ T Zell-lymphopenischen CIITA^{-/-} Mäusen ist also nicht auf eine Erschöpfung der LCMV-spezifischen Zellen zurückzuführen.

3.8 MHC II Expression auf Hepatozyten von C57BL/6 Wildtyp Mäusen nach LCMV-WE Infektion

Da es im Verlauf einer klinischen Hepatitis zu einer MHC II Expression auf Hepatozyten kommt, stellte sich die Frage, ob es nach einer LCMV-WE Infektion von C57BL/6 Wildtyp Mäusen, in der die Tiere auch eine Hepatitis entwickeln, ebenfalls zu einer hepatozellulären MHC II Expression kommt.

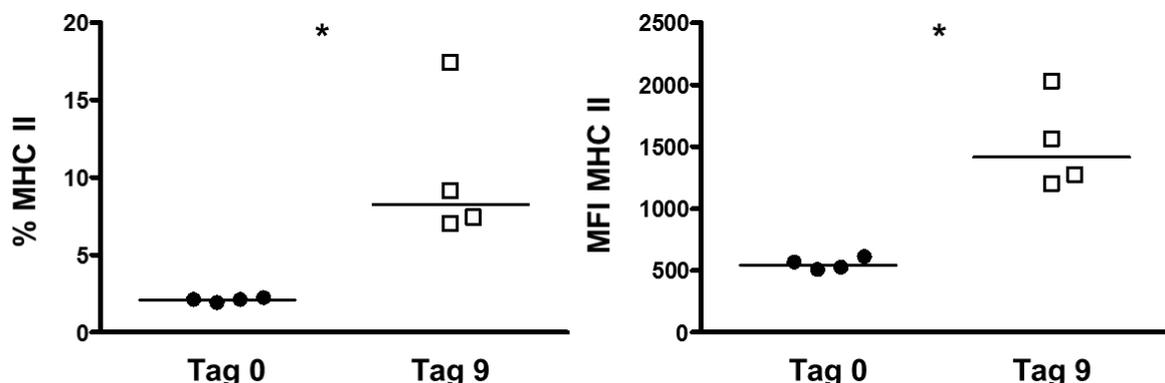


Abb. 37: Prozentualer Anteil und Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der MHC II Expression auf Hepatozyten von C57BL/6 Wildtyp Mäusen an Tag 9 nach LCMV Infektion.

Aus LCMV-infizierten Mäusen wurden an Tag 9 nach Infektion Hepatozyten isoliert und eine Oberflächenfärbung von MHC II durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MHC II Expression nach LCMV Infektion (in beiden Fällen $p=0,0286$).

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Hepatozyten aus LCMV-WE infizierten C57BL/6 Wildtyp Mäusen an Tag 9 nach Infektion isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre MHC II Expression hin getestet. Als Kontrolle dienten Hepatozyten aus nicht infizierten Mäusen. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MHC II Expression in den infizierten Mäusen (s. Abb. 37), sowohl im prozentualen Anteil der MHC II exprimierenden Hepatozyten, als auch in der MFI der Zellen (in beiden Fällen $p=0,0286$).

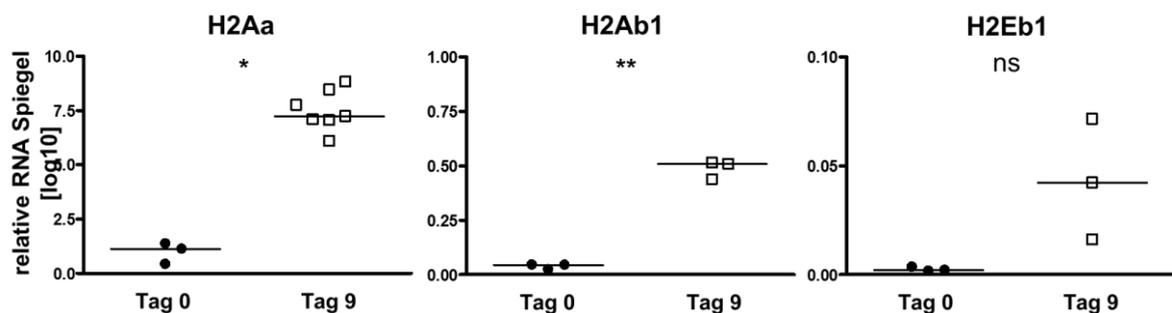


Abb. 38: MHC II mRNA Spiegel in uninfizierten und infizierten Mäusen an Tag 9 nach Infektion. Infizierte Mäuse wiesen einen erhöhten MHC II Spiegel auf mRNA Ebene auf. (H2Aa $p=0,0268$; H2Ab1 $p=0,0060$; H2Eb1 $p=0,0637$). Für die Berechnung der p-Werte wurde der ungepaarte t-Test verwendet.

Darüber hinaus wurde der mRNA Spiegel der drei verschiedenen MHC II Ketten von C57BL/6 Wildtyp Mäusen im Lebergewebe mittels qRT-PCR an Tag 9 nach LCMV Infektion bestimmt. Hier zeigten sich im Fall von H2Aa ($p=0,0268$) und H2Ab1 ($p=0,0060$) eine signifikante und im Fall von H2Eb1 ($p=0,0637$) eine tendentielle Erhöhung des mRNA Gehalts im Lebergewebe (s. Abb. 38). Die Infektion mit LCMV-WE führte also zur Induktion der Expression von MHC II auf Hepatozyten.

3.9 Einfluss von hepatozellulär aktivierten CD4+ T Zellen auf die Gedächtnis-CD8+ T Zell-Antwort

Der Einfluss von CD4+ T Zellen auf die virale Hepatitis sollte in einem zweiten Modell untersucht werden: In der gesunden Leber exprimieren Hepatozyten keine MHC II Moleküle auf ihrer Oberfläche. Jedoch bei einer Hepatitis im Menschen [134, 135] und auch in der Maus [131] wurde die Expression von MHC II Molekülen auf Hepatozyten beobachtet. Die Arbeitsgruppe hat daher eine Maus generiert, die den Klasse II Transaktivator (CIITA), den Hauptregulator der MHC II Expression, spezifisch in Hepatozyten überexprimiert und es so zu einer konstitutiven MHC II Expression auf diesen Zellen kommt. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass CD4+ T Zellen über die MHC II-Expression auf Hepatozyten aktiviert werden können [136] und es in diesen Mäusen zu einer weniger entzündlichen CD4+ T Zell-Differenzierung und so zu einer verlängerten Viruspersistenz kommt [133], die hepatozelluläre MHC II Expression also möglicherweise einen Beitrag zur Chronifizierung der Infektion leistet.

In der vorliegenden Arbeit sollte auch der Einfluss von hepatozellulär aktivierten CD4+ T Zellen auf die Gedächtnis T Zell-Antwort untersucht werden. Dazu wurden CIITA transgene Mäuse (hCRP-CIITA-AF) mit konstitutiver hepatozellulärer MHC II Expression, zunächst von ihrem ursprünglichen Hintergrundstamm (FVB) auf einen C57BL/6 Hintergrundstamm zurückgekreuzt, um einen adoptiven Transfer LCMV-spezifischer CD4+ T Zellen aus T Zell-Rezeptor (TCR)-transgenen C57BL/6 Smarta Mäusen [143] zu ermöglichen. Mittels PCR wurden die Mäuse auf ihren transgenen Status getestet.

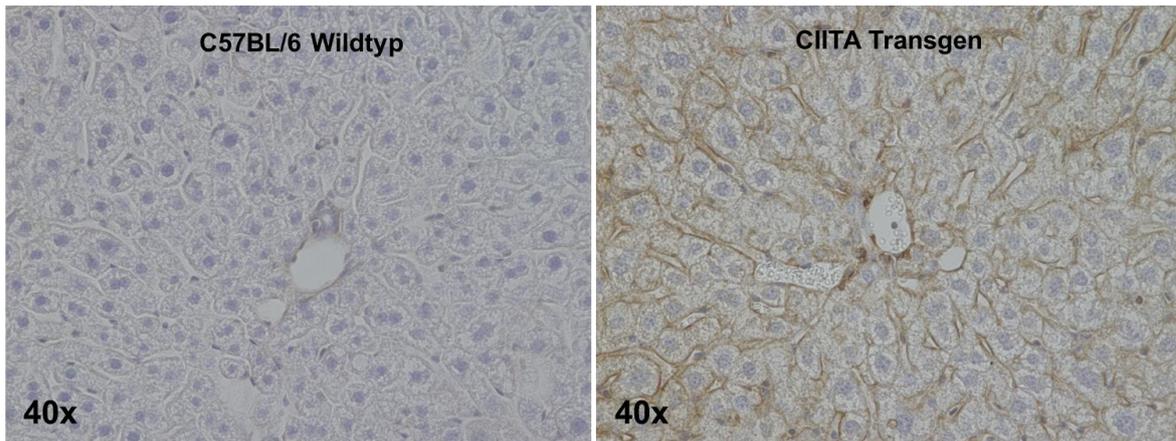


Abb. 39: MHC II Färbung im Paraffinschnitt der Leber in C57BL/6 Wildtyp Maus im Vergleich zu CIITA tg Maus.

Deutlich zu erkennen ist die Lokalisation von MHC II auf der Oberfläche der Hepatozyten.

Zur Überprüfung der MHC II Expression in heterozygoten CIITA transgenen Mäusen nach Rückkreuzung auf C57BL/6 Hintergrund (CIITA tT), wurden die Hepatozyten isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre MHC II Expression getestet. Alternativ wurde die MHC II Expression immunhistochemisch im Paraffinschnitt der Leber überprüft. Als Kontrolle dienten jeweils Wildtyp Mäuse. Ein Beispiel für eine positive MHC II Färbung im Paraffinschnitt ist in Abb. 39 dargestellt.

Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, stellte sich dabei heraus, dass die meisten weiblichen und auch einige männliche Tiere keine MHC II Moleküle auf ihrer Hepatozytenoberfläche exprimierten. Männchen dagegen exprimierten MHC II, jedoch auch nicht zuverlässig.

Tabelle 1: MHC II Expression auf Hepatozyten in den verschiedenen transgenen Mauslinien:

		CIITA tT	CIITA TT	hCRP-CIITA-AF	hCRP-CIITA-AF X C57BL/6
Männchen	positiv	18	13	1	2
	negativ	5	4	/	/
Weibchen	positiv	5	/	/	/
	negativ	28	2	2	2

Um die Kopienzahl des Transgens zu erhöhen, und auf diese Weise eine bessere Expression zu erreichen, wurden heterozygot transgene CIITA-B6 Mäuse (CIITA tT) miteinander verpaart und so homozygot transgene Mäuse generiert (CIITA TT).

Dies führte jedoch auch nicht zu einer zuverlässigen Expression von MHCII auf Hepatozyten. Da sich die MHC II Expression in den Tieren der FVB-Ursprungslinie zuvor immer als zuverlässig erwiesen hatte, und um den veränderten Hintergrundstamm der Mäuse als Grund für die unzuverlässige Expression auszuschließen, wurden sowohl transgene Mäuse der FVB Ursprungslinie (hCRP-CIITA-AF) als auch die F1 Generation aus der Verpaarung von hCRP-CIITA-AF x C57BL/6 Wildtyp Mäusen, stichprobenartig auf ihre MHC II Expression untersucht. Die Mäuse der F1 Generation hätten bei zuverlässiger MHC II Expression für die Zelltransfer-Experimente verwendet werden können. Jedoch zeigte sich auch hier in beiden Mauslinien eine Expression von MHC II in männlichen, nicht jedoch in weiblichen Mäusen.

Keine der verwendeten Mauslinien exprimierte zuverlässig MHC II auf Hepatozyten und sie konnten daher nicht für die ursprünglich geplanten Versuche verwendet werden.

4 Diskussion

Das Thema dieser Arbeit war der Einfluss von CD4+ T Zell-Hilfe auf die zytotoxische CD8+ T Zell- (CTL)-Antwort und die Klärung einer akuten Virushepatitis nach LCMV-WE Infektion. Hierzu wurde die Auswirkung einer fehlenden CD4+ T Zell-Hilfe auf den Infektionsverlauf, die Leberschädigung und die zelluläre Immunantwort untersucht. Außerdem wurde überprüft, ob die Infektion mit LCMV-WE die Expression von MHC II auf Hepatozyten von Wildtyp-Mäusen induziert. Zudem sollte der Einfluss einer hepatozellulären MHC II Expression auf die Bildung von Gedächtnis-CD8+ T Zellen nach LCMV-WE Infektion untersucht werden.

4.1 Der Einfluss fehlender CD4+ T Zell-Hilfe auf den Verlauf der LCMV Infektion und die Etablierung einer zytotoxischen CD8+ T Zell-Antwort

In der vorliegenden Arbeit wurde die CD4+ T Zell-Abhängigkeit der zytotoxischen CD8+ T Zell-Antwort für die Klärung einer akuten viralen Hepatitis belegt: In CD4+ T Zell-lymphopenischen Mäusen kommt es nach Infektion mit einer hohen Dosis (10^6 FFU) LCMV-WE aufgrund einer eingeschränkten CTL-Antwort zu einer stärkeren Virämie und einer persistierenden Infektion in der viralen Hepatitis (s. Kapitel 3.2). In Übereinstimmung damit zeigt eine frühere Studie von Battegay et al. [23], dass es durch die Infektion von CD4^{-/-} Mäusen mit einer hohen Dosis LCMV-WE (2×10^6 FFU) zu einer persistierenden Infektion in Milz, Blut und Thymus kommt. Die Leber wurde in diesem Zusammenhang jedoch nicht untersucht.

Interessanterweise zeigte der Vergleich der Serumspiegel des Leberenzym Alanin-Aminotransferase, welches bei einer Hepatozytenschädigung freigesetzt wird, dass es in MHC II-defizienten CIITA^{-/-} und CD4+ T Zell-depletierten Mäusen nicht nur zu einer höheren Viruslast und einer verlängerten Viruspersistenz, sondern auch zu einer

stärkeren Leberschädigung kam (s. Abb. 19 und Abb. 20). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass Anzahl und Funktion der CTL-Antwort in CIITA^{-/-} Mäusen stark eingeschränkt war, der Leberschaden während einer viralen Hepatitis aber stark mit der CTL-Antwort assoziiert ist [144]. Zytotoxische CTL töten virusbefallene Hepatozyten und eliminieren auf diese Weise das Virus. Es könnte also vermutet werden, dass die Infektion durch einen größeren Leberschaden auch besser eliminiert werden würde. In CIITA^{-/-} Mäusen dagegen kommt es nahezu über den gesamten Infektionsverlauf trotz geringerer CTL-Antwort zu einem verstärkten Schaden der Hepatozyten. Die signifikante Differenz des Leberschadens ab Tag 15 ist dabei der Tatsache geschuldet, dass das Virus in den C57BL/6 Wildtyp Mäusen schon eliminiert war, während die Infektion in CD4⁺ T Zell-lymphopenischen Mäusen persistierte.

Während einer viralen Hepatitis können auch nicht-viruspezifische Zellen in die Leber rekrutiert werden und den Schaden verstärken, ohne zur Eliminierung des Virus beizutragen [8]. Tatsächlich war die Gesamtzahl mononukleärer Leberzellen an Tag 15 nach Infektion in der Leber von CIITA^{-/-} Mäusen im Gegensatz zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen stark erhöht (s. Abb. 22).

Sowohl NK-Zellen, die ebenfalls nach Infektion mit LCMV aktiviert werden [145], als auch NKT-Zellen können große Mengen des inflammatorischen Zytokins IFN γ produzieren [40] und zu einem Leberschaden beitragen. Möglicherweise könnten sie auch in CD4⁺ T Zell-lymphopenischen Mäusen in einer größeren Anzahl in der Lage sein, den Leberschaden zu verstärken. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch kein Unterschied in der Anzahl von NK- und NKT-Zellen in der Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen festgestellt werden (s. Abb. 23). In der Milz von CIITA^{-/-} Mäusen dagegen zeigte sich eine signifikant niedrigere Anzahl NK- und NKT-Zellen an Tag 15 nach Infektion (s. Abb. 23). Daher spielen NK- und NKT-Zellen vermutlich keine

große Rolle für die verstärkte Leberschädigung von CIITA-/- Mäusen. Um beurteilen zu können, ob NK- oder NKT-Zellen tatsächlich keinen Beitrag zum Leberschaden leisten, müssten die Zellen auch auf funktionelle Unterschiede, wie die Produktion von IFN γ und Zytotoxizität, untersucht werden.

Makrophagen, so auch die Kupffer-Zellen der Leber, können u. a. inflammatorische Zytokine produzieren und ebenfalls zum Leberschaden beitragen [40]. Kupffer-Zellen in der Leber spielen eine entscheidende Rolle in der frühen Infektion und sind die Zellen, die hauptsächlich auf IFN I reagieren [146]. Beim Vergleich der Makrophagenzahl in Milz und Leber von C57BL/6 Wildtyp und CIITA-/- Mäusen wurde jedoch kein Unterschied in der Anzahl detektiert (s. Abb. 23). Sie scheinen also nicht für die verstärkte Leberschädigung in den Lebern von CIITA-/- Mäusen verantwortlich zu sein. Funktionelle Unterschiede oder die Infektion von Kupffer-Zellen selbst wurden hierbei jedoch nicht untersucht.

Laut Literatur spielen B-Zellen bzw. antivirale Antikörper in immunkompetenten Mäusen keine Rolle bei der Eliminierung von LCMV in der akuten Infektion (s. Kapitel 1.3). Da die fehlende CD4⁺ T Zell-Hilfe in CIITA-/- Mäusen aber möglicherweise auch schon in der frühen Phase der Infektion einen Einfluss auf die B-Zellzahl haben könnte, wurde ihre Anzahl trotzdem im Zuge der Zellanalyse an Tag 15 nach Infektion überprüft. Konsistent mit den Literaturangaben zeigten sich weder in der Milz noch in der Leber Unterschiede in der B-Zellzahl zwischen den beiden Versuchsgruppen (s. Abb. 23). Die defekte Eliminierung von LCMV in CD4⁺ T Zell-lymphopenischen CIITA-/- Mäusen ist also wahrscheinlich nicht auf eine fehlende CD4⁺ T Zell-Hilfe für B-Zellen zurückzuführen. Nach dieser ersten Analyse scheinen sich die Zellen des angeborenen Immunsystems und B-Zellen in CIITA-/- Mäusen nicht von immunkompetenten Mäusen zu unterscheiden. In zukünftigen Versuchen soll ihre Funktion und auch neutrophile Granulozyten auf ihre

Anzahl und Funktion überprüft werden. Eine vorläufige Analyse an Tag 12 nach Infektion (Daten nicht gezeigt) wies jedoch auch hier keinen Unterschied auf.

Da die beobachteten Unterschiede zwischen C57BL/6 Wildtyp und CIITA^{-/-} Mäusen bzgl. Viruspersistenz, Leberschaden und Zellzahl, anscheinend nicht auf Effekte von nicht-CD4⁺ und nicht-CD8⁺ T Zellen zurückzuführen waren, wurde im Folgenden die Anzahl, Funktion und Spezifität von CD8⁺ T Zellen analysiert. Dabei sind zytotoxische CD8⁺ T Zellen (CTL) die Schlüsselfaktoren in der viralen Immunität gegen LCMV [50, 52, 53]. Während die Gesamt-CD8⁺ T Zellzahlen in den Milzen beider Versuchsgruppen vergleichbar gut expandierten, zeigte sich in den Lebern CD4⁺ T Zell-defizienter CIITA^{-/-} Mäuse an Tag 12 nach Infektion eine erniedrigte CD8⁺ T Zellzahl (s. Abb. 24). Die starke Expansion der Gesamt-CD8⁺ T Zellen in den Milzen beider Versuchsgruppen spricht dafür, dass die Proliferation der CD8⁺ T Zellen in Abwesenheit von CD4⁺ T Zell-Hilfe nicht grundsätzlich eingeschränkt war. Somit scheint eher eine beeinträchtigte Rekrutierung der Zellen in die Leber als eine eingeschränkte Expansion der Grund für eine niedrigere CD8⁺ T Zellzahl in den Lebern von CIITA^{-/-} Mäusen an Tag 12 zu sein.

Anders als für die Gesamt-CD8⁺ T Zellzahl beobachtet, gab es, wie in Abb. 25 dargestellt, an Tag 12 und 15 sowohl in der Leber als auch in der Milz von CIITA^{-/-} Mäusen weniger LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen. Ohne CD4⁺ T Zell-Hilfe konnten LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen also anscheinend weder gut expandieren, noch effizient in die Leber rekrutiert werden. Die für die Eliminierung des Virus essentielle LCMV-spezifische CD8⁺ T Zell-Antwort ist also bei fehlender CD4⁺ T Zell-Hilfe beeinträchtigt und führt zur Persistenz der Infektion.

Durch die fehlende CD4⁺ T Zell-Hilfe könnte nicht nur die Anzahl, sondern auch die Aktivierung der CD8⁺ T Zellen vermindert sein und so zu einer Beeinträchtigung der Viruselimination führen. Die in Abb. 27 dargestellten Daten zur Aktivierung der

Gesamt-CD8⁺ T Zellen zeigen, dass die fehlende CD4⁺ T Zell-Hilfe nicht zu einer geringeren Aktivierung des Gesamt-CD8⁺ T Zell-Kompartimentes an Tag 15 nach Infektion führte, obwohl CIITA^{-/-} Mäuse weniger LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen besaßen. Durch die geringe Anzahl LCMV-spezifischer CD8⁺ T Zellen in CIITA^{-/-} Mäusen jedoch ist konsequenterweise auch die Zahl aktivierter LCMV-spezifischer Zellen verringert (s. Abb. 28). Da die hier untersuchten Zeitpunkte (Tag 12 und Tag 15) zeitlich hinter dem Höhepunkt der Virämie liegen (Tag 9) (s. Abb. 10 und Abb. 11), sollte die Aktivierung der Zellen auch noch zu früheren Zeitpunkten in der Infektion bestimmt werden, um so eine Aussage über die initiale Aktivierung der Effektor-CTL treffen zu können.

Zusätzlich zu Anzahl und Aktivierung der Effektor-CTL wurde auch ihre Funktionalität bei fehlender CD4⁺ T Zell-Hilfe anhand der Zytokinproduktion von IFN γ und TNF α und der Degranulation der Zellen überprüft. Der Anteil IFN γ positiver CD8⁺ T Zellen war sowohl in der Milz als auch in der Leber von virusinfizierten CIITA^{-/-} Mäusen nach LCMV-spezifischer *in vitro* Restimulation niedriger, verglichen mit C57BL/6 Wildtyp Mäusen (s. Abb. 29). Dies ist konsistent mit der geringeren Anzahl LCMV-spezifischer CD8⁺ T Zellen in CIITA^{-/-} Mäusen.

Keine signifikante Verringerung zeigte sich in der TNF α Produktion von CIITA^{-/-} Mäusen (s. Abb. 31). Allerdings könnte die fehlende Signifikanz in der Leber durch den ungewöhnlich hohen Wert einer einzelnen von insgesamt fünf Proben begründet sein. Um eine genauere Aussage über die TNF α Produktion in CIITA^{-/-} Mäusen treffen zu können, soll in zukünftigen Versuchen die TNF α Produktion an Tag 12 wiederholt analysiert und zusätzlich an Tag 15 nach Infektion bestimmt werden. Durch die geringere Anzahl LCMV-spezifischer CD8⁺ T Zellen kam es konsequenterweise auch zu einer verringerten Anzahl aktivierter und funktionaler LCMV-spezifischer CD8⁺ T Zellen, während die

Aktivierung des Gesamt-CD8+ T Zell-Kompartimentes dadurch nicht beeinflusst war. Um die Fähigkeit der Gesamt-CD8+ T Zellen zur Zytokinproduktion und den Anteil LCMV-spezifischer Zellen daran zu bestimmen, müssten die Zellen unspezifisch restimuliert und der Anteil Zytokin-produzierender Virus-spezifischer und nicht-spezifischer CD8+ T Zellen bestimmt werden. Eine zeitgleiche Färbung von Zytokinen und LCMV-spezifischen Zellen war jedoch methodisch bisher nicht möglich, soll aber für zukünftige Versuche etabliert werden.

Neben der Freisetzung von Effektorzytokinen spielt auch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen eine essentielle Rolle für die Virusbekämpfung. So führt eine LCMV Infektion von Mäusen ohne Perforin-Expression zum Tod [147]. Dies zeigt die physiologische Relevanz des Granula Signalwegs zur Virusbekämpfung und die essentielle Rolle von Perforin in diesem Prozess. Bei Überprüfung der Degranulation nach LCMV-spezifischer Restimulation *in vitro* fiel auf, dass CD8+ T Zellen von CIITA-/- Mäusen im Vergleich weniger degranulierten (s. Abb. 33). Dies ist konsistent mit einer geringeren Anzahl LCMV-spezifischer Zellen in CIITA-/- Mäusen. Doch nicht nur die Degranulation der Gesamt-CD8+ T Zellen war eingeschränkt: Von Tag 12 zu Tag 15 nahm die Degranulationsfähigkeit LCMV-spezifischer CD8+ T Zellen in der Leber von CIITA-/- Mäusen ab, während sie in C57BL/6 Wildtyp Mäusen annähernd gleich blieb (s. Abb. 34). Die Degranulation der Milz-CD8+ T Zellen hingegen nahm im Verlauf der Infektion in beiden Gruppen sogar zu. Die Degranulationsfähigkeit in CIITA-/- Mäusen scheint also nicht prinzipiell eingeschränkt zu sein. Vielmehr scheint es im Laufe der Infektion zu einem Funktionsverlust der CD8+ T Zellen von CIITA-/- Mäusen in der Leber zu kommen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Erschöpfung der CD8+ T Zellen in der Leber von CIITA-/- Mäusen sein, welche daraufhin ebenfalls überprüft wurde.

Die Erschöpfung von CD8+ T Zellen ist, wie in Abb. 5 dargestellt, u. a. durch die Expression des inhibitorischen Moleküls PD-1 gekennzeichnet. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen jedoch kam es trotz der persistierenden Infektion zu keiner erhöhten Expression des Erschöpfungsmarkers PD-1 auf LCMV-spezifischen CD8+ T Zellen (s. Abb. 36).

Ähnlich wie für humane Hepatitiden, gibt es auch für die Infektion mit LCMV unterschiedliche Angaben darüber, welche Rolle die CD4+ T Zellen für die Klärung der Infektion spielen [106, 107, 110, 148]. Unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei der Infektion von Mäusen mit schnell replizierenden LCMV Stämmen wie Clone-13 oder Docile, wurden CD4+ T Zellen als wichtig für die Virusklärung identifiziert [23]. Eine Rolle in der Etablierung der CD8+ T Zell-Antwort wurde den CD4+ T Zellen in einer Studie von Bategay et al. jedoch abgesprochen [23]. Stattdessen schien in dieser Studie die Erschöpfung der CTL für das Scheitern der Viruseliminierung verantwortlich zu sein. Hier dagegen sprechen die dargelegten Resultate eher dafür, dass vor allem die initiale Etablierung der CTL-Antwort und nicht die Erschöpfung der Zellen für das Scheitern der Viruseliminierung verantwortlich ist.

Für die HBV Infektion von Schimpansen wurde postuliert, dass CD4+ T Zellen keinen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Infektion haben [129]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse für die virale Hepatitis nach LCMV Infektion stehen scheinbar im Widerspruch zu diesem Befund. Doch in der Studie von Thimme et al. wurden die CD4+ T Zellen erst an Tag 6 nach HBV Infektion depletiert, also nachdem die initiale Aktivierung der CD8+ T Zellen schon stattgefunden hatte. Im Gegensatz dazu waren die CD4+ T Zellen in den hier beschriebenen Versuchen schon zu Beginn der Infektion und der initialen Etablierung der CD8+ T Zell-Antwort abwesend. Dabei wird die Kinetik der

CD8+ T Zell-Antwort - wie anhand der Infektion mit Listerien gezeigt wurde - am ersten Tag nach der Infektion festgelegt [149, 150].

Matloubian et al. [90] haben gezeigt, dass die akute Infektion mit dem LCMV Stamm Armstrong CD4+ T Zell-unabhängig ist. Auf den ersten Blick scheint dies den hier gezeigten Ergebnissen zu widersprechen. Im Gegensatz zu LCMV-WE jedoch verursacht LCMV-Armstrong keine virale Hepatitis, was ein Grund für den veränderten Bedarf an CD4+ T Zell-Hilfe darstellen könnte. CD4+ T Zellen sind also nicht in allen LCMV Infektionen wichtig für die Eliminierung des Virus. Im Fall der Leberinfektion mit einer hohen Dosis (10^6) LCMV-WE und der im Zuge entstehenden viralen Hepatitis sind sie aber anscheinend essentiell.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Übereinstimmung mit den Resultaten von Zhou et al. [151], die kürzlich gezeigt haben, dass die Kontrolle einer Hepatitis-A-Virus Infektion in Schimpansen sehr eng mit der CD4+ T Zell-Antwort assoziiert ist.

Die CD4+ T Zell-Unabhängigkeit von Infektionen ist vor allem durch die Fähigkeit von APC begründet nach direkter Aktivierung über Pattern-Recognition-Receptors (PRR), welche charakteristische Strukturen von Pathogenen erkennen, eine robuste IFN I Antwort auszulösen [87, 105]. In der LCMV Infektion wird IFN I u. a. benötigt, um die initiale Virusverbreitung zu verhindern [104]. Obwohl die Klärung der akuten Infektion mit LCMV zuvor in der Regel als unabhängig von CD4+ T Zell-Hilfe erachtet wurde, scheint sie dies nicht im Zusammenhang einer durch LCMV-WE ausgelösten viralen Hepatitis zu sein. Daher könnte angenommen werden, dass die Menge an ausgeschüttetem IFN I nicht ausreichend war für die Etablierung einer effizienten CTL-Antwort. Dies soll in zukünftigen Versuchen ebenfalls überprüft werden.

In dem hier verwendeten Modell ist die CD4+ T Zell-Hilfe in der akuten viralen Hepatitis wichtig für die Expansion funktionaler LCMV-spezifischer CD8+ T Zellen mit der

Fähigkeit zur starken antiviralen Zytokinproduktion und dauerhaften Degranulationsfähigkeit, die in der Lage sind, das Virus effizient zu eliminieren. Dabei ist nicht die Erschöpfung der CD8+ T Zellen der Grund für die aberrante Viruselimination, sondern anscheinend spielt die CD4+ T Zell-Hilfe schon während der initialen Etablierung der zytotoxischen CD8+ T Zellen eine entscheidende Rolle.

4.2 Die hepatozelluläre MHC II Expression in C57BL/6 Mäusen nach LCMV Infektion und in CIITA transgenen Mäusen

Neben der hier gezeigten Abhängigkeit der initialen antiviralen CD8+ T Zell-Antwort von effizienter CD4+ T Zell-Hilfe wurde ferner der Einfluss der LCMV Infektion auf die MHC II Expression von Hepatozyten überprüft, wie sie aus humanen Hepatitiden bekannt ist. Darüber hinaus sollte der Einfluss hepatozellulär über MHC II aktivierter CD4+ T Zellen auf die Bildung von Gedächtnis-CD8+ T Zellen untersucht werden. Beim Vergleich der hepatozellulären MHC II-Expression in nicht-infizierten und LCMV-infizierten C57Bl/6 Wildtyp Mäusen zeigte sich in der durchflusszytometrischen Messung eine Induktion der MHC II-Expression in LCMV-infizierten Mäusen (s. Abb. 37). Durch den entzündlichen Kontext kommt es also in der viralen Hepatitis der Maus nach LCMV Infektion, ähnlich wie in humanen Hepatitiden, zu einer Induktion der MHC II Expression auf Hepatozyten. Diese MHC II Expression auf Hepatozyten kann, wie Vorarbeiten in hepatozellulär MHC II überexprimierenden Mäusen gezeigt haben, zu einer Verringerung der entzündlichen Th1-Antwort und einer verlängerten LCMV Virämie führen [133]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun der Einfluss von hepatozellulär über MHC II aktivierten CD4+ T Zellen auf die Generierung von Gedächtnis-CD8+ T Zellen untersucht werden, da die CD4+ T Zell-Hilfe auch für die Generierung effizienter Gedächtnis-CD8+ T Zellen von großer Bedeutung ist [98]. Jedoch zeigte keine der zu diesem Zweck generierten Mauslinien eine zuverlässige hepatozelluläre

MHC II-Expression (s. Tabelle 1), so dass die Untersuchung des Einflusses hepatozellulär aktivierter CD4+ T Zellen auf die Gedächtnis-CD8+ T Zell-Antwort nicht untersucht werden konnte.

Bei der Analyse der hepatozellulären MHC II Expression transgener Mäuse stellte sich heraus, dass mehr männliche als weibliche Tiere MHC II exprimierten. Die Durchsicht der Literatur ergab keinen Hinweis auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der CRP-Promotor abhängigen Genexpression, und die Ursache wurde hier nicht näher untersucht. Darüberhinaus zeigten sich unter den MHC II positiven immunhistochemischen Färbungen gravierende Unterschiede in der Ausprägung der MHC II-Expression. Es ist daher zweifelhaft, dass die Versuchsergebnisse bezüglich der Gedächtnis-CD8+ T Zell-Bildung unter den MHC II exprimierenden Tieren vergleichbar gewesen wären. Da die zuvor beobachtete zuverlässige MHC II Expression der transgenen Linie in einer anderen Tierhaltung (Universität Mainz) erfolgte, in der hiesigen Tierhaltung jedoch nicht, ist anzunehmen, dass haltungsbedingte Umwelteinflüsse für die Transgenexpression entscheidend sind.

Der humane CRP-Promotor, unter dessen Kontrolle CIITA in den transgenen Mäusen stand, hat eine basale Aktivität, die jedoch vor allem in einem entzündlichen Kontext zur verstärkten Expression der von ihm abhängigen Gene führt [152]. So sollte auch die LCMV Infektion in CIITA transgenen Mäusen zu einer verbesserten hepatozellulären MHC II Expression führen. Doch obwohl die LCMV Infektion zu einer Induktion der MHC II Expression auf Hepatozyten führte, kam es in transgenen CIITA Mäusen nicht zu einer merklich gesteigerten Expression im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp Mäusen, so dass die Versuche zum Einfluss der hepatozellulären MHC II Expression auf die Gedächtnis-CD8+ T Zell-Antwort nicht durchgeführt werden konnten.

4.3 Ausblick

a) **Der Einfluss fehlender CD4+ T Zell-Hilfe auf den Verlauf der LCMV Infektion und auf die Etablierung einer CTL-Antwort**

Um zu untersuchen, ob Virusspezifität für die CD4+ T Zell-Hilfe entscheidend ist, sollen LCMV-spezifische CD4+ T Zellen (Smarta Zellen [143]) und zum Vergleich unspezifische CD4+ T Zellen aus C57BL/6 Wildtyp Mäusen in LCMV-infizierte CD4+ T Zell-depletierte Mäuse adoptiv transferiert werden, um so die CTL Funktion und damit die Fähigkeit zur Viruselimination wiederherzustellen. Da CD4+ T Zellen anscheinend schon während der initialen Aktivierung der CD8+ T Zellen eine Rolle für den Ausgang der Infektion spielen, sollen Aktivierung und Effektorfunktionen von CD8+ T Zellen auch zu früheren Zeitpunkten nach LCMV Infektion bestimmt werden, um genaueren Aufschluss über die initialen Eigenschaften der Zellen zu erhalten. Außerdem soll die Produktion von IFN I in den beiden Mausgruppen miteinander verglichen werden. Die Ursache des stärkeren Leberschadens in CIITA^{-/-} Mäusen (s. Abb. 19) und die Zellpopulation, die für eine gesteigerte Leber-Infiltration an Tag 15 nach LCMV Infektion verantwortlich war (s. Abb. 22), konnten noch nicht identifiziert werden. Daher sollen zukünftig weitere Zellkompartimente, wie neutrophile Granulozyten, auf ihr Vorkommen und ihre Funktion innerhalb der Leber-infiltrierenden Zell-Population getestet werden.

Bisher stand keine Methode zur gleichzeitigen Färbung von Zytokinen und LCMV-spezifischen Zellen zur Verfügung. Diese soll in Zukunft etabliert werden, um so direkt die Effektorfunktion der LCMV-spezifischen Zellen untersuchen zu können. Die gute Expansion von Gesamt-CD8+ T Zellen in der Milz mit gleichzeitig verringerter CD8+ T Zellzahl in der Leber von CIITA^{-/-} Mäusen deutete auf eine verringerte Rekrutierung der Zellen in die Leber hin. Um dies genauer zu überprüfen, sollen kongene (CD45.1+) LCMV-spezifische CD8+ T Zellen (P14 Zellen [153]) adoptiv in die Mäuse

transferiert, nach LCMV Infektion reisoliert und ihre Anzahl in den verschiedenen Organen bestimmt werden. Nach Stimulierung durch pro-inflammatorische Zytokine von residenten und infiltrierenden Zellen werden inflammatorische Chemokine in entzündetem Gewebe exprimiert [154]. Sie sind für das Einwandern weiterer Zellen verantwortlich. Unterschiede in der Chemokinexpression könnten in CIITA^{-/-} Mäusen zu einer veränderten Rekrutierung der Zellen beitragen und sollen in künftigen Versuchen ebenfalls überprüft werden.

b) Einfluss der MHC II Expression auf die Gedächtnis-CD8⁺ T Zell-Antwort

Um eine zuverlässige Expression von MHC II auf Hepatozyten zu erreichen, und die ursprünglich geplanten Versuche zum Einfluss einer hepatozellulären MHC II Expression auf die Gedächtnis-CD8⁺ T Zell-Antwort durchführen zu können, wird derzeit eine C57BL/6 Mauslinie generiert, in der CIITA unter der Kontrolle des Albuminpromotors steht. Die CIITA Expression unter der Kontrolle eines anderen Hepatozyten-spezifischen Promotors führt möglicherweise zu einer zuverlässigen Expression von MHC II auf Hepatozyten, so dass die ursprünglich vorgesehenen Experimente dann in dieser Mauslinie durchgeführt werden können.

5 Zusammenfassung

Die CD4+ T Zell-Abhängigkeit der Klärung einer akuten viralen Hepatitis durch zytotoxische CD8+ T Zellen wurde in der Literatur bisher nicht vollständig geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Einfluss der CD4+ T Zell-Hilfe auf die akute virale Hepatitis im Mausmodell untersucht. Zu diesem Zweck wurden auf zwei unterschiedliche Weisen erzeugte CD4+ T Zell-lymphopenische Mäuse mit LCMV-WE infiziert: MHC II defizitäre CIITA^{-/-} Mäuse und mit CD4+ T Zell-depletierendem Antikörper behandelte C57BL/6 Wildtyp Mäuse. Dabei führte das CD4+ T Zell-lymphopenische Milieu in beiden Fällen zu einer verstärkten Virämie und einer verlängerten Viruspersistenz. Darüber hinaus kam es zu einem stärkeren Leberschaden, der mit einer verstärkten Entzündung der Leber assoziiert war und vermutlich hierdurch verursacht wurde.

Während keine Hinweise auf eine Einschränkung der Expansion oder der Aktivierung der Gesamt-CD8+ T Zellen durch die fehlende CD4+ T Zell-Hilfe vorlagen, kam es in CIITA^{-/-} Mäusen anscheinend zu einer stark verringerten Rekrutierung der CD8+ T Zellen in die Leber. Darüber hinaus schienen CD4+ T Zellen für die Generierung effizienter LCMV-spezifischer CD8+ T Zellen essentiell zu sein. So kam es in CIITA^{-/-} Mäusen zu einer eingeschränkten Expansion LCMV-spezifischer CD8+ T Zellen und im Zuge dessen zu verringerter Expression des antiviralen Zytokins IFN γ . Außerdem führte die LCMV-spezifische Restimulation *in vitro* nicht nur unter den Gesamt-CD8+ T Zellen zu einer verringerten Degranulation: LCMV-spezifische CD8+ T Zellen verloren bei CD4+ T Zell-Mangel im Laufe der Infektion ihre Degranulationsfähigkeit. Eine Erschöpfung der CD8+ T Zellen war jedoch nicht der Grund für den Funktionsverlust. Durch mangelnde CD4+ T Zell-Hilfe nach LCMV Infektion konnten anscheinend nicht ausreichend funktionale LCMV-spezifische zytotoxische CD8+ T Zellen generiert werden. Da diese für die effiziente Eliminierung des Virus und die Klärung der viralen Hepatitis

essentiell sind, konnte die Infektion bei CD4+ T Zell-Mangel nicht wirkungsvoll bekämpft werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es in der viralen Hepatitis nach LCMV Infektion von C57BL/6 Wildtyp Mäusen zu einer Expression von MHC II auf Hepatozyten kommt. Das entzündliche Milieu der Leber führte also, wie in humanen Hepatitiden, zur Induktion der hepatozellulären MHC II Expression.

Als weiterer Aspekt der CD4+ T Zell-Hilfe in der viralen Hepatitis sollte der Einfluss der hepatozellulären MHC II Expression auf die Generierung von Gedächtnis-CD8+ T Zellen ermittelt werden. In unterschiedlichen Maus-Hintergrundstämmen jedoch zeigte sich die Expression von MHC II auf Hepatozyten CIITA transgener Mäuse beeinträchtigt und verschiedene Strategien zur Wiederherstellung einer zuverlässigen hepatozellulären MHC II Expression in CIITA transgenen Mäusen scheiterten. Dabei schienen geschlechtsspezifische Charakteristika der Mäuse und umweltbedingte Faktoren der Tierhaltung einen Einfluss genommen zu haben.[24]

6 Literatur

1. World Health Organisation (WHO). Hepatitis E. Fact sheet N°280 July 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/index.html>.
2. World Health Organisation (WHO), Hepatitis B vaccines. Weekly epidemiological record, 2009. 40: p. 405–420.
3. World Health Organisation (WHO). Hepatitis B. Fact sheet N°204 July 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>.
4. Crispe, I.N., The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 147-63.
5. World Health Organisation (WHO). Hepatitis C. Fact sheet N°164 July 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>.
6. Castello, G., et al., HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol*, 2009. 134(3): p. 237-50.
7. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*, 2006. 1: p. 23-61.
8. Herkel, J., et al., Immune-mediated liver injury. *J Hepatol*, 2005. 42(6): p. 920-3.
9. Pawlotsky, J.M., Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*, 2004. 12(2): p. 96-102.
10. El-Serag, H.B., Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2012. 142(6): p. 1264-1273 e1.
11. Chinnadurai, R., V. Velazquez, and A. Grakoui, Hepatic transplant and HCV: a new playground for an old virus. *Am J Transplant*, 2012. 12(2): p. 298-305.
12. Lang, K.S., Host mechanisms in viral hepatitis. *Dig Dis*, 2010. 28(1): p. 25-30.
13. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 1974. 248(450): p. 701-2.

14. von Herrath, M. and J.L. Whitton, Animal Models Using Lymphocytic Choriomeningitis Virus, in *Current Protocols in Immunology*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
15. Zhou, X., et al., Role of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) in Understanding Viral Immunology: Past, Present and Future. *Viruses*, 2012. 4(11): p. 2650-69.
16. Moskophidis, D., et al., Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J Virol*, 1994. 68(3): p. 1951-5.
17. Balkow, S., et al., Concerted action of the FasL/Fas and perforin/granzyme A and B pathways is mandatory for the development of early viral hepatitis but not for recovery from viral infection. *J Virol*, 2001. 75(18): p. 8781-91.
18. Leist, T., et al., Major histocompatibility complex-linked susceptibility or resistance to disease caused by a noncytopathic virus varies with the disease parameter evaluated. *J Exp Med*, 1989. 170(1): p. 269-77.
19. Zinkernagel, R.M., Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002. 263: p. 1-5.
20. Zinkernagel, R.M., et al., Susceptibility to murine lymphocytic choriomeningitis maps to class I MHC genes--a model for MHC/disease associations. *Nature*, 1985. 316(6031): p. 814-7.
21. Zinkernagel, R.M., et al., T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay? *J Exp Med*, 1986. 164(4): p. 1075-92.
22. Bergthaler, A., et al., Contributions of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein and polymerase to strain-specific differences in murine liver pathogenicity. *J Gen Virol*, 2007. 88(Pt 2): p. 592-603.
23. Battegay, M., et al., Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice. *J Virol*, 1994. 68(7): p. 4700-4.
24. ViralZone. *Arenaviridae Molecular Biology*. 2010. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/501.html#tab6.

25. Crotty, S., Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 29: p. 621-63.
26. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 2012. 30: p. 429-57.
27. Hangartner, L., et al., Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(22): p. 12883-8.
28. Ciurea, A., et al., Viral persistence in vivo through selection of neutralizing antibody-escape variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(6): p. 2749-54.
29. Cerny, A., et al., Clearance of lymphocytic choriomeningitis virus in antibody- and B-cell-deprived mice. *J Virol*, 1988. 62(5): p. 1803-7.
30. Planz, O., et al., A critical role for neutralizing-antibody-producing B cells, CD4(+) T cells, and interferons in persistent and acute infections of mice with lymphocytic choriomeningitis virus: implications for adoptive immunotherapy of virus carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(13): p. 6874-9.
31. Hangartner, L., R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner, Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(3): p. 231-43.
32. Bruns, M., et al., Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology*, 1983. 130(1): p. 247-51.
33. Brundler, M.A., et al., Immunity to viruses in B cell-deficient mice: influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory. *Eur J Immunol*, 1996. 26(9): p. 2257-62.
34. Semmo, N., et al., Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood*, 2006. 107(11): p. 4570-1.
35. Biron, C.A. and L. Brossay, NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol*, 2001. 13(4): p. 458-64.
36. Zeromski, J., et al., NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011. 59(6): p. 449-55.

37. Barry, M. and R.C. Bleackley, Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(6): p. 401-9.
38. Janeway, C., *Immunologie*. 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
39. Godfrey, D.I., D.G. Pellicci, and M.J. Smyth, Immunology. The elusive NKT cell antigen--is the search over? *Science*, 2004. 306(5702): p. 1687-9.
40. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 65-91.
41. Hobbs, J.A., et al., Selective loss of natural killer T cells by apoptosis following infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10746-54.
42. Tu, Z., et al., The activation state of human intrahepatic lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 2007. 149(1): p. 186-93.
43. Sitia, G., et al., Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): p. 13717-22.
44. Sitia, G., et al., MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J Clin Invest*, 2004. 113(8): p. 1158-67.
45. Bertoletti, A. and M.K. Maini, Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Microbiol*, 2000. 3(4): p. 387-92.
46. Bowen, D.G., et al., Cytokine-dependent bystander hepatitis due to intrahepatic murine CD8 T-cell activation by bone marrow-derived cells. *Gastroenterology*, 2002. 123(4): p. 1252-64.
47. Moss, P.A., W.M. Rosenberg, and J.I. Bell, The human T cell receptor in health and disease. *Annu Rev Immunol*, 1992. 10: p. 71-96.
48. Andersen, M.H., et al., Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*, 2006. 126(1): p. 32-41.

49. Ahmed, R., B.D. Jamieson, and D.D. Porter, Immune therapy of a persistent and disseminated viral infection. *J Virol*, 1987. 61(12): p. 3920-9.
50. Byrne, J.A. and M.B. Oldstone, Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J Virol*, 1984. 51(3): p. 682-6.
51. Jamieson, B.D., L.D. Butler, and R. Ahmed, Effective clearance of a persistent viral infection requires cooperation between virus-specific Lyt2+ T cells and nonspecific bone marrow-derived cells. *J Virol*, 1987. 61(12): p. 3930-7.
52. Lehmann-Grube, F., D. Moskophidis, and J. Lohler, Recovery from acute virus infection. Role of cytotoxic T lymphocytes in the elimination of lymphocytic choriomeningitis virus from spleens of mice. *Ann N Y Acad Sci*, 1988. 532: p. 238-56.
53. Moskophidis, D., et al., Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *J Virol*, 1987. 61(6): p. 1867-74.
54. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol*, 1979. 27: p. 51-177.
55. Zinkernagel, R.M., et al., Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J Exp Med*, 1985. 162(6): p. 2125-41.
56. Betts, M.R., et al., Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*, 2003. 281(1-2): p. 65-78.
57. Guidotti, L.G., et al., Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 1996. 4(1): p. 25-36.
58. Peters, P.J., et al., Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*, 1991. 173(5): p. 1099-109.

59. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(10): p. 735-47.
60. Chowdhury, D. and J. Lieberman, Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 389-420.
61. Keefe, D., et al., Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 2005. 23(3): p. 249-62.
62. Betts, M.R., R.A. Koup, and M.R.a.H.T. Zbigniew Darzynkiewicz, Detection of T-Cell Degranulation: CD107a and b, in *Methods in Cell Biology*. 2004, Academic Press. p. 497-512.
63. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, Cytokine-induced viral purging-role in viral pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 1999. 2(4): p. 388-91.
64. Wohlleber, D., et al., TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell Rep*, 2012. 2(3): p. 478-87.
65. Guidotti, L.G., et al., Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*, 1999. 284(5415): p. 825-9.
66. Jo, J., et al., Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology*, 2009. 136(4): p. 1391-401.
67. Weiner, A., et al., Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(7): p. 2755-9.
68. Losikoff, P.T., A.A. Self, and S.H. Gregory, Dendritic cells, regulatory T cells and the pathogenesis of chronic hepatitis C. *Virulence*, 2012. 3(7).
69. Thimme, R., et al., Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*, 2001. 194(10): p. 1395-406.
70. Cooper, S., et al., Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 1999. 10(4): p. 439-49.

71. Wherry, E.J., et al., Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*, 2003. 77(8): p. 4911-27.
72. Gallimore, A., et al., Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med*, 1998. 187(9): p. 1383-93.
73. Zajac, A.J., et al., Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*, 1998. 188(12): p. 2205-13.
74. Virgin, H.W., E.J. Wherry, and R. Ahmed, Redefining chronic viral infection. *Cell*, 2009. 138(1): p. 30-50.
75. Wherry, E.J. and R. Ahmed, Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*, 2004. 78(11): p. 5535-45.
76. Bachmann, M.F., R.M. Zinkernagel, and A. Oxenius, Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J Immunol*, 1998. 161(11): p. 5791-4.
77. Wherry, E.J., T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 2011. 12(6): p. 492-9.
78. Barber, D.L., et al., Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 2006. 439(7077): p. 682-7.
79. Iwai, Y., et al., PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med*, 2003. 198(1): p. 39-50.
80. Radziewicz, H., et al., Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol*, 2008. 82(20): p. 9808-22.
81. Trautmann, L., et al., Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*, 2006. 12(10): p. 1198-202.
82. Bevan, M.J., Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(8): p. 595-602.

83. Rehermann, B. and M. Nascimbeni, Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(3): p. 215-29.
84. Sant, A.J. and A. McMichael, Revealing the role of CD4(+) T cells in viral immunity. *J Exp Med*, 2012. 209(8): p. 1391-5.
85. Swain, S.L., K.K. McKinstry, and T.M. Strutt, Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(2): p. 136-48.
86. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989. 7: p. 145-73.
87. Wiesel, M. and A. Oxenius, From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help. *Eur J Immunol*, 2012. 42(5): p. 1080-8.
88. Frebel, H., K. Richter, and A. Oxenius, How chronic viral infections impact on antigen-specific T-cell responses. *Eur J Immunol*, 2010. 40(3): p. 654-63.
89. Klenerman, P. and A. Hill, T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol*, 2005. 6(9): p. 873-9.
90. Matloubian, M., R.J. Concepcion, and R. Ahmed, CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol*, 1994. 68(12): p. 8056-63.
91. Aubert, R.D., et al., Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(52): p. 21182-7.
92. Fahey, L.M., et al., Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med*, 2011. 208(5): p. 987-99.
93. Elsaesser, H., K. Sauer, and D.G. Brooks, IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science*, 2009. 324(5934): p. 1569-72.
94. Frohlich, A., et al., IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science*, 2009. 324(5934): p. 1576-80.

95. Yi, J.S., M. Du, and A.J. Zajac, A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science*, 2009. 324(5934): p. 1572-6.
96. Gerlach, J.T., et al., Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 1999. 117(4): p. 933-41.
97. Kalams, S.A. and B.D. Walker, The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*, 1998. 188(12): p. 2199-204.
98. Williams, M.A., et al., Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol Rev*, 2006. 211: p. 146-53.
99. Janssen, E.M., et al., CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*, 2003. 421(6925): p. 852-6.
100. Shedlock, D.J. and H. Shen, Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*, 2003. 300(5617): p. 337-9.
101. Sun, J.C. and M.J. Bevan, Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*, 2003. 300(5617): p. 339-42.
102. Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot, A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science*, 2002. 297(5589): p. 2060-3.
103. Williams, M.A., A.J. Tynzik, and M.J. Bevan, Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*, 2006. 441(7095): p. 890-3.
104. Cervantes-Barragan, L., et al., Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(8): p. 3012-7.
105. Wiesel, M., W. Kratky, and A. Oxenius, Type I IFN substitutes for T cell help during viral infections. *J Immunol*, 2011. 186(2): p. 754-63.
106. Ahmed, R., L.D. Butler, and L. Bhatti, T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol*, 1988. 62(6): p. 2102-6.

107. Rahemtulla, A., et al., Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature*, 1991. 353(6340): p. 180-4.
108. Christensen, J.P., O. Marker, and A.R. Thomsen, The role of CD4+ T cells in cell-mediated immunity to LCMV: studies in MHC class I and class II deficient mice. *Scand J Immunol*, 1994. 40(4): p. 373-82.
109. Kasaian, M.T., K.A. Leite-Morris, and C.A. Biron, The role of CD4+ cells in sustaining lymphocyte proliferation during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*, 1991. 146(6): p. 1955-63.
110. Leist, T.P., et al., Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J Immunol*, 1987. 138(7): p. 2278-81.
111. Lynch, F., P.C. Doherty, and R. Ceredig, Phenotypic and functional analysis of the cellular response in regional lymphoid tissue during an acute virus infection. *J Immunol*, 1989. 142(10): p. 3592-8.
112. Ganem, D. and A.M. Prince, Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004. 350(11): p. 1118-29.
113. Lauer, G.M. and B.D. Walker, Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2001. 345(1): p. 41-52.
114. Hughes, S.A., H. Wedemeyer, and P.M. Harrison, Hepatitis delta virus. *Lancet*, 2012. 378(9785): p. 73-85.
115. Kamar, N., et al., Hepatitis E. *Lancet*, 2012. 379(9835): p. 2477-88.
116. Bertoletti, A., et al., HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(23): p. 10445-9.
117. Bertoni, R., et al., Human class I supertypes and CTL repertoires extend to chimpanzees. *J Immunol*, 1998. 161(8): p. 4447-55.
118. Maini, M.K., et al., Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology*, 1999. 117(6): p. 1386-96.

119. Missale, G., et al., HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J Exp Med*, 1993. 177(3): p. 751-62.
120. Rehermann, B., et al., The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med*, 1995. 181(3): p. 1047-58.
121. Thimme, R., et al., Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J Virol*, 2001. 75(8): p. 3984-7.
122. Chisari, F.V., M. Isogawa, and S.F. Wieland, Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)*, 2010. 58(4): p. 258-66.
123. Bertoletti, A. and C. Ferrari, Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology*, 2003. 38(1): p. 4-13.
124. Lechner, F., et al., Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*, 2000. 191(9): p. 1499-512.
125. Urbani, S., et al., Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology*, 2006. 44(1): p. 126-39.
126. Rehermann, B., Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*, 2009. 119(7): p. 1745-54.
127. Nascimbeni, M., et al., Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *J Virol*, 2003. 77(8): p. 4781-93.
128. Grakoui, A., et al., HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*, 2003. 302(5645): p. 659-62.
129. Thimme, R., et al., CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*, 2003. 77(1): p. 68-76.
130. Schulze Zur Wiesch, J., et al., Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med*, 2012. 209(1): p. 61-75.

131. Toyonaga, T., et al., Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(2): p. 614-8.
132. Tiegs, G. and A.W. Lohse, Immune tolerance: what is unique about the liver. *J Autoimmun*, 2010. 34(1): p. 1-6.
133. Wiegard, C., et al., Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance. *Gastroenterology*, 2007. 133(6): p. 2010-8.
134. Dienes, H.P., et al., Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non-B. *Hepatology*, 1987. 7(6): p. 1317-25.
135. Franco, A., et al., Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology*, 1988. 8(3): p. 449-54.
136. Herkel, J., et al., MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology*, 2003. 37(5): p. 1079-85.
137. Warren, A., et al., T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 2006. 44(5): p. 1182-90.
138. Carambia, A., et al., Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol*, 2012.
139. Chang, C.H., et al., Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity*, 1996. 4(2): p. 167-78.
140. Murphy, C., J. Beckers, and U. Ruther, Regulation of the human C-reactive protein gene in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1995. 270(2): p. 704-8.
141. Battegay, M., et al., Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J Virol Methods*, 1991. 33(1-2): p. 191-8.
142. Immudex. MHC Dextramer. <http://www.immudex.com/technology/dextramer-technology.aspx>.

143. Oxenius, A., et al., Virus-specific MHC-class II-restricted TCR-transgenic mice: effects on humoral and cellular immune responses after viral infection. *Eur J Immunol*, 1998. 28(1): p. 390-400.
144. Chisari, F.V., Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*, 1997. 99(7): p. 1472-7.
145. Lang, P.A., et al., Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(4): p. 1210-5.
146. Lang, P.A., et al., Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice. *Hepatology*, 2010. 52(1): p. 25-32.
147. Kagi, D., et al., Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 1994. 369(6475): p. 31-7.
148. Leist, T.P., M. Kohler, and R.M. Zinkernagel, Impaired generation of anti-viral cytotoxicity against lymphocytic choriomeningitis and vaccinia virus in mice treated with CD4-specific monoclonal antibody. *Scand J Immunol*, 1989. 30(6): p. 679-86.
149. Prlic, M., M.A. Williams, and M.J. Bevan, Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol*, 2007. 19(3): p. 315-9.
150. Mercado, R., et al., Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol*, 2000. 165(12): p. 6833-9.
151. Zhou, Y., et al., Dominance of the CD4(+) T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. *J Exp Med*, 2012. 209(8): p. 1481-92.
152. Whitehead, A.S., et al., Mouse C-reactive protein. Generation of cDNA clones, structural analysis, and induction of mRNA during inflammation. *Biochem J*, 1990. 266(1): p. 283-90.
153. Pircher, H., et al., Molecular analysis of the antigen receptor of virus-specific cytotoxic T cells and identification of a new V alpha family. *Eur J Immunol*, 1987. 17(12): p. 1843-6.

154. Oo, Y.H., S. Shetty, and D.H. Adams, The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig Dis*, 2010. 28(1): p. 31-44.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACK	Erythrozyten Lyse Puffer (Ammoniumchlorid - Kaliumhydrogencarbonat)
AF488	Alexa Fluor 488
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (Antigen Presenting Cell)
Bp	Basenpaare
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of Differentiation)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary Desoxyribonucleic Acid)
CRP	C-Reaktives Protein
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes (Zytotoxische T Lymphozyten)
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (Dendritic Cell)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
FFA	Focus Forming Assay
FFU	Focus Forming Unit
GP	Glykoprotein
Granzym	Granule Enzyme
h	Stunden
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (Hepatocellular Carcinoma)
HCV	Hepatitis C Virus

HDV	Hepatitis D Virus
HE	Hämatoxylin - Eosin
HEV	Hepatitis E Virus
HRP	Meerrettich Peroxidase (Horse Raddish Peroxidase)
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVC	Individuell belüfteter Käfig (Individually Ventilated Cage)
LAMP	Lysosomal Assoziiertes Membranprotein
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LSEC	sinusoidale Leberendothelzellen (Liver Sinusoidal Epithelial Cells)
M	Mol
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
mM	Millimol
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger Ribonucleic Acid)
NK	Natürliche Killer Zellen (Natural Killer Cells)
NKT	Natürliche Killer T Zellen (Natural Killer T Cells)
NP	Nukleoprotein
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphat gepufferte Saline (Phosphate Buffered Saline)

PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PD-1	Programmed Death Receptor 1
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PRR	Pattern Recognition Receptor
PZ-U	“Wünsch-Einheit” - Eine Einheit katalysiert die Hydrolyse von 1 μ mol 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-L-prolyl-L-leucyl-glycyl-L-prolyl-D- arginine pro Minute bei 25°C, pH 7.1.
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RT	Raumtemperatur
RT - PCR	Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (Real Time - Polymerase Chain Reaction)
Sec	Sekunde
SPF	Spezifisch Pathogenfrei
TBS	Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline)
TCR	T Cell Receptor
Tg	Transgen
Th	T Helferzelle
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VE-H ₂ O	Voll Entsalztes Wasser
Wt	Wildtyp

8 Kongressbeiträge

EASL Monothematic Conference: Immune Mediated Liver Injury, Hamburg 2008

CD4 T Cells stimulated by Hepatocytes display impaired Th1 Response and induce defective anti-viral CD8 Response and Clearance of LCMV Virus Infection

Tanja Trautmann, Christian Frenzel, Petra Wolint, Edgar Schmitt, Annette Oxenius, Ansgar W. Lohse, Johannes Herkel, Christiane Wiegard

29. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber - GASL 2013

CD4+ T Zell-Hilfe ist entscheidend für die CD8+ T Zell-vermittelte Klärung einer akuten Virusinfektion in der Leber.

Tanja Trautmann, Jan-Hendrik Kozik, Antonella Carambia, Annette Oxenius, Ansgar W. Lohse, Christiane Wiegard, Johannes Herkel

9 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Lohse bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seinem Labor meine Doktorarbeit anzufertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Dobner danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit. Desweiteren möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Räume der Tierhaltung des Heinrich-Pette-Instituts für die Versuche mit LCMV nutzen zu dürfen.

Für die Betreuung meiner Arbeit danke ich Frau Dr. Christiane Wiegard. Vor allem aber möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Johannes Herkel für die sehr gute Betreuung der Arbeit, die stets offene Tür und das jederzeit „offene Ohr“ bedanken.

Dipl. Biol. Jan-Hendrik Kozik danke ich für die Zusammenarbeit bei der Immunfluoreszenz-Färbung und den qRT-PCRs. Bei Marko Hilken möchte ich mich bedanken für „Rettungen“ von Computern und Mäusen, bei Agnes Malotta für unkompliziertes Einspringen, wenn es mal eng wurde, und bei Birte Hanisch für ungefähr eine Mrd. FFAs und Färbungen. Auch bei allen anderen Kollegen möchte ich mich für die Zusammenarbeit, die schöne Arbeitsatmosphäre und für diverse Frust- und Freudenfeiern inner- und außerhalb des Labors bedanken.

Einen ganz besonderer Dank gilt Antonella Carambia, Denise Heim und Dorothee Schwinge. Für geteilte Freude und geteiltes Leid in den letzten Jahren und ihre Freundschaft. Es ist schön, dass es Euch gibt.

Auch meinen Freunden außerhalb des Labors möchte ich für ihre Unterstützung danken, hierbei besonders Susanne Helnerus, Martha Szczgyiel und Katharina Voigt.

Meinem Freund, Markus Fritsch, möchte ich ebenfalls von Herzen für seine Hilfe und Unterstützung danken, auch – nicht zu vergessen – in molekularbiologischer Hinsicht.

Ein abschließender und besonderer Dank gilt meiner Mutter, Elisabeth Trautmann, die mich schon immer bei allen meinen Unternehmungen vorbehaltlos unterstützt hat.