



Technische Universität München  
Fakultät für Medizin  
Institut für Molekulare Immunologie & Experimentelle Onkologie

**Molekulare Mechanismen zur Entstehung des Leberschadens durch  
CD8<sup>+</sup> T-Zellen in nicht-alkoholisch induzierter Fettleber**

Michael Dudek

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Korn

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Prof. Dr. Dirk Haller
3. Prof. Dr. Veit Hornung

Die Dissertation wurde am 30.06.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.02.2021 angenommen.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Leber .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.1 Leber als zentrales Organ für den Körperstoffwechsel.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.2 Leber als immunologisches Organ.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Geweberesidente Lymphozyten.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Entstehung und Regulation von $T_{rm}$ .....	13
1.2.2 $T_{rm}$ in der Leber.....	15
1.2.3 $T_{rm}$ bei autoimmunen Erkrankungen.....	16
<b>1.3 Regulation der Effektorfunktion von <math>CD8^+</math> T-Zellen .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Molekularer Mechanismus der Interaktion von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen mit dem Gewebe.....	17
1.3.3 Transkriptionelle und metabolische Regulation der Effektorfunktion von $CD8^+$ T-Zellen	19
1.4.1 NAFLD .....	22
1.4.3 Adaptives Immunsystem in NASH .....	24
1.4.4 Behandlungsstrategien von NASH .....	25
<b>2. WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Maushaltung.....	28
3.1.2 Mauslinien.....	28
3.1.3 Geräte.....	29
3.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	30
3.1.5 Software .....	31
3.1.6 Reagenzien.....	32
3.1.7 Antikörper .....	36
3.1.8 Zytokine.....	38
3.1.9 Primer.....	39
3.1.10 Puffer.....	39
3.1.11 Zellkulturmedien.....	40
3.1.12 Kits .....	41
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>42</b>
3.2.1 Isolation primärer Zellen aus der Maus.....	42

## Inhaltsverzeichnis

3.2.1.1	Isolation von primären Zellen durch magnetische Separation (MACS)	42
3.2.1.2	Isolation von primären Zellen durch FACS-basierten Sortieren	42
3.2.1.3	Isolation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz	43
3.2.1.4	Isolation von Lymphozyten aus der Leber	43
3.2.1.5	Isolation von Lymphozyten aus der Lunge	44
3.2.1.6	Isolation von Lymphozyten aus der Haut	44
3.2.1.7	Isolation von Lymphozyten aus dem Darm	45
3.2.1.8	Isolation von Lymphozyten aus der Niere	45
3.2.1.9	Isolation von primären Hepatozyten	46
3.2.1.10	Isolation humaner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut	47
3.2.1.11	Separation von vitalen Lymphozyten aus Zellsuspensionen	47
3.2.1.12	Bestimmung von Zellzahlen	48
3.2.1.13	Zellkultur	48
3.2.2	CD8 <sup>+</sup> T-Zelldifferenzierung	48
3.2.2.1	Differenzierung zu SIINFEKL-spezifischen Effektor OT-1 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	48
3.2.2.2	Differenzierung zu CD8 <sup>+</sup> Effektor-T-Zellen	49
3.2.2.3	Differenzierung zu geweberesidenten CD8 <sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen	49
3.2.3	Immunologische Methoden	49
3.2.3.1	Durchflusszytometrie (FACS)	49
3.2.3.1.1	Oberflächenfärbung	50
3.2.3.1.2	Intrazelluläre Färbung	50
3.2.3.1.3	Färbung von phosphorylierten Proteinen	51
3.2.3.2	Konfokale Mikroskopie	51
3.2.3.3	Bildgebende Durchflusszytometrie – Imagestream®	52
3.2.3.4	Retrovirale Transduktion von aktivierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	52
3.2.3.5	Immunhistochemie (IHC)	53
3.2.3.6	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	53
3.2.3.7	Fluorescent-linked Immunospot Assay (FluoroSpot)	54
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	55
3.2.4.1	RNA Isolierung und quantitative real-time PCR (qPCR)	55
3.2.5	Metabolische Methoden	56
3.2.5.1	Analyse des Metabolismus der T-Zellen mittels Seahorse XF Bioanalyzer	56
3.2.5.2	Acetat-Konzentration in der Leber	56
3.2.5.3	Acetataufnahme	56
3.2.5.4	Histon-Acetyltransferasen-Aktivität	57
3.2.6	Funktionelle Analysen	57
3.2.6.1	Zytotoxizitätsassays	57
3.2.6.1.1	xCelligence®	57



# Inhaltsverzeichnis

3.2.6.1.2	Durchflusszytometrische Analyse von CFSE-gefärbten Milzzellen als Zielzellen .....	58
3.2.6.2	Adoptiver Transfer von SIINFEKL-spezifischen OT-1 CD8 <sup>+</sup> Effektor T-Zellen .....	58
3.2.7	Bioinformatische Methoden .....	59
3.2.7.1	mRNA-Sequenzierung (Illumina) .....	59
3.2.7.2	Netzwerkanalyse der Transkriptionsfaktoren .....	60
3.2.7.3	<i>Gene set enrichment analysis</i> (GSEA) .....	61
3.2.8	Statistik .....	62
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen .....</b>	<b>64</b>
4.1.1	CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen sind spezifisch in der Leber erhöht und zeigen einen gewebeständigen, erschöpften und zytotoxischen Phänotyp .....	64
4.1.2	Klonale Expansion ist nicht für die erhöhte Anzahl an CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen verantwortlich .....	69
4.1.3	Expression des Transkriptionsfaktors Foxo1 ist in leber-spezifischen CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen deutlich reduziert .....	73
<b>4.2</b>	<b>Regulation von Foxo1 und CXCR6 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber .....</b>	<b>77</b>
4.2.1	Inhibierung der Foxo1 Aktivität erhöht CXCR6 Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	77
4.2.2	IL-15R $\alpha$ /IL-15 und IL-21 regulieren die Expression von Foxo1 in CD44 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen herunter .....	78
4.2.3	Rezeptoren für IL-15 und IL-21 sind auf CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlich exprimiert	81
4.2.4	Anti-CD122 Therapie in CD-HFD Mäusen reduziert den Leberschaden .....	82
<b>4.3</b>	<b>Regulation der Effektorfunktion von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber .....</b>	<b>83</b>
4.3.1	Erhöhte GzmB Level in CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber hängen von der kurzkettigen Fettsäure Acetat ab .....	84
4.3.2	Acetat erhöht die Expression von GzmB und TNF spezifisch in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit niedriger Foxo1 Aktivität .....	86
<b>4.4</b>	<b>Antigen-unabhängige Eliminierung von Hepatozyten durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ....</b>	<b>89</b>
4.4.1	Keine gesteigerte antigen-spezifische Eliminierung von Hepatozyten durch Acetat-behandelte CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	90
4.4.2	Die antigen-unabhängige Eliminierung von Hepatozyten durch Acetat-exponierte CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen ist abhängig von TNF und LFA-1 .....	93
4.4.3	Extrazelluläres ATP (eATP) aktiviert autoaggressive CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	96
4.4.4	Acetat-exponierte CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen eliminieren Hepatozyten über Fas-FasL Interaktion .....	100
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1</b>	<b>Differenzierung der immunpathogenen CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei NASH .....</b>	<b>104</b>
5.1.1	Herunterregulierung von Foxo1 in CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen bewirkt die Ausprägung eines geweberesidenten, erschöpften aber auch zytotoxischen Phänotyps .....	104

## Inhaltsverzeichnis

5.1.2	IL-15 und IL-21 regulieren über die Expression von Foxo1 die Anzahl an CXCR6 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber, die für den Leberschaden bei NASH verantwortlich sind .....	108
5.1.3	Acetat verstärkt die Produktion von Effektormolekülen spezifisch in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität.....	113
<b>5.2</b>	<b>Mechanismus des Leberschadens durch autoaggressive CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei NASH .....</b>	<b>116</b>
5.2.1	Unter erhöhten Konzentrationen an Acetat eliminieren CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität Hepatozyten antigen-unabhängig .....	116
5.2.2	Antigen-unabhängige Zytotoxizität von Hepatozyten durch CXCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen ist abhängig vom Einstrom extrazellulären Calciums und von Fas/FasL Interaktion.....	119
5.2.3	Immuntherapeutische Behandlungsstrategien für den Leberschaden bei NASH .....	122
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>146</b>
7.1	Tabellen .....	146
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	160
7.3	Abkürzungen .....	161
7.4	Vorveröffentlichungen .....	165

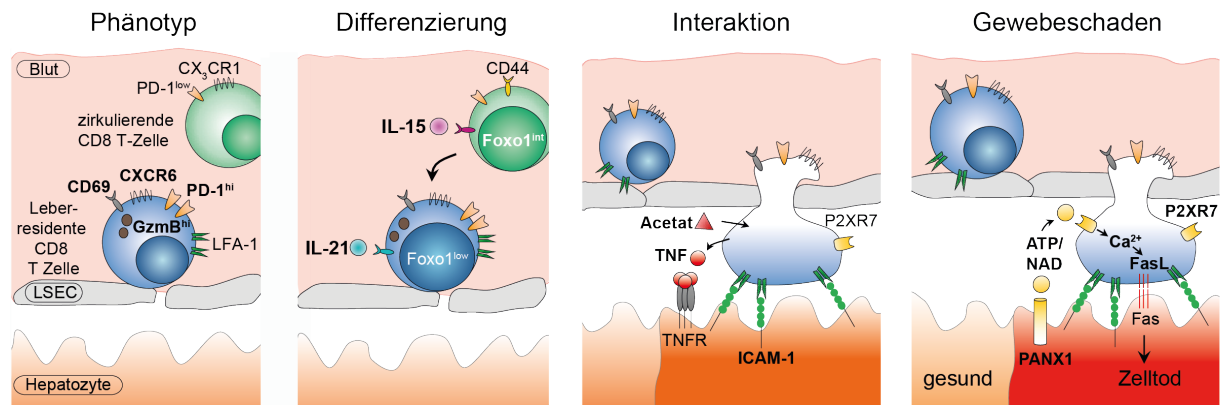
## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der molekulare Mechanismus der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der nicht-alkoholischen Fettleber (NASH<sup>1</sup>) untersucht. NASH ist eine sterile chronische Entzündung, in der Leberzellen durch übermäßige Einlagerung von Fettsäuren metabolischem Stress ausgesetzt sind. Durch das geschädigte Lebergewebe werden eine Vielzahl von Immunzellen angelockt, aber welche der Immunzellen einen direkten Einfluss auf den Leberschaden bei NASH haben, ist bisher unklar. Diese Arbeit zeigt, dass CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der entzündeten Leber stark verbreitet sind und neben zytotoxischen auch immunsupprimierte Eigenschaften aufweisen. Eine IL-15 und IL-21-bedingte Herunterregulation des Transkriptionsfaktors Foxo1 ist für den besonderen Phänotyp der CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich. Diese Differenzierung hat zur Folge, dass die in der Leber vorkommende kurzkettige Fettsäure Acetat die Effektorfunktion der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer Weise verstärkt, dass Hepatozyten ohne die Präsentation eines immunogenen Antigens eliminiert werden. Diese neuartige Form des Gewebes Schadens wird als Autoaggression bezeichnet. Der entscheidende Auslöser für die Effektorfunktion dieser autoaggressiven CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die Aktivierung des purinergen Rezeptors P2XR7 und der damit verbundene Calcium-Einstrom. Diese Form der metabolischen Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheidet sich von denjenigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die über den T-Zellrezeptor aktiviert werden. Jene CD8<sup>+</sup> T-Zellen gewährleisten, dass nur infizierte Zellen eliminiert werden und nicht-infiziertes Gewebe verschont bleibt. Diese Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse darüber, wie das adaptive Immunsystem Gewebeschäden in Entzündungen, die durch metabolischen Stress entstehen, verursacht.

---

<sup>1</sup> Engl.: Non-alcoholic steatohepatitis

## Zusammenfassung



**Abb. 1: Entstehung des Leberschadens durch autoaggressive CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei NASH.**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von NASH differenzieren sich durch Reduktion der transkriptionellen Aktivität von Foxo1 in eine Zellpopulation, die sowohl durch zytotoxische als auch durch immunsupprimierte Eigenschaften geprägt ist. Die Interaktion der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hepatozyten findet über die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 statt, dessen Expression durch eine gesteigerte TNF-Freisetzung in Anwesenheit von erhöhten Acetatkonzentrationen in der Leber von NASH gefördert ist. Durch extrazelluläres ATP und NAD<sup>+</sup> werden CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen über den purinergen P2XR7-Rezeptor aktiviert und eliminieren Hepatozyten über Fas/FasL-Interaktion. Dadurch kommt es zum Gewebeschaden bei NASH. Abkürzungen: Ca<sup>2+</sup> - Calcium; LSEC - Sinusoidale Leberendothelzellen; TNFR - Tumornekrosefaktor-Rezeptor; PANN1 - Pannexin 1.

## Summary

This doctoral thesis addresses the question how hepatic CD8<sup>+</sup> T cells cause liver damage during non-alcoholic steatohepatitis. NASH is a sterile, chronic inflammation in which hepatocytes excessively store free fatty acids leading to metabolic stress. These metabolic disturbances attract a plethora of immune cells to the liver and initiate an inflammatory cascade. But it remained unknown which immune cell subset is mainly responsible for directly damaging the liver. This study shows that during NASH CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells are specifically increased in the liver and are characterized by concomitant effector and exhaustion traits. IL-15- and IL-21-driven downregulation of the transcription factor Foxo1 regulates the pathogenic molecular program of this unique subset. As a consequence of the deregulated differentiation of CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, the short-chain fatty acid acetate augments the effector function of these cells. As a consequence, they are licensed to kill hepatocytes in an antigen-independent manner. This new form of tissue damage is called autoaggression. Critical for triggering the effector response of CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells is the activation of the purinergic receptor P2XR7 by extracellular DAMPs like ATP or NAD<sup>+</sup> which facilitates an TCR-independent influx of extracellular calcium. The predominant expression of P2XR7 on CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells enable these cells to respond faster to tissue damage than other T cell subsets. This mode of action discriminates metabolically activated CD8<sup>+</sup> T cells from antigen-activated CD8<sup>+</sup> T cells as the latter only eliminate pathogen-infected target cells and spare uninfected tissue. This work provides essential mechanistic insights into the causes of tissue damage during sterile inflammation in metabolic diseases.

## 1. Einleitung

### 1. Einleitung

#### 1.1 Leber

##### 1.1.1 Leber als zentrales Organ für den Körperstoffwechsel

Die Leber ist ein wichtiges metabolisches Organ, das in wenigen, aber repetitiven funktionellen Einheiten, den Sinusoiden, aufgebaut ist und eine zentrale Schaltstelle im Körper darstellt. Durch die Versorgung mit sauerstoffarmem, aber nährstoffreichem Blut, das aus dem Darm über die Portalvene in die Leber gelangt, können nicht nur Makromoleküle wie Kohlenhydrate, Proteine oder Fett aufgenommen werden und in kleinere Bausteine umgesetzt werden, sondern auch schädliche Abfallprodukte und Toxine abgebaut werden (Robinson et al., 2016).

##### 1.1.2 Leber als immunologisches Organ

Durch die erhöhte Konzentration an Endotoxinen, die aus dem Darm über die Portalvene in die Leber gelangen, hat sich in diesem Organ ein immuntolerantes Milieu entwickelt, um eine konstante Aktivierung des Immunsystems vorzubeugen. Die Ausbildung dieser immunsuppressiven Umgebung entsteht durch die Anwesenheit von antigen-präsentierenden Zellen (APC<sup>2</sup>) wie den dendritischen Zellen (DC<sup>3</sup>), den Kupffer-Zellen (KC<sup>4</sup>) und den sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC<sup>5</sup>), die T-Zellen zu toleranten Zellen programmieren (Abb. 2). Während DCs in der Leber in einem unreifen Differenzierungszustand vorkommen und damit T-Zellen unzureichend programmieren, bewirken LSECs durch das Fehlen der Kostimulation über CD80 und CD86 und der Anwesenheit des inhibitorischen Liganden PD-L1<sup>6</sup>, eine ähnlich unvollständige Aktivierung von naiven T-Zellen (Thomson & Knolle, 2010). Immunsuppressive Immunzellpopulation wie

---

<sup>2</sup> Engl.: antigen-presenting cells

<sup>3</sup> Engl.: dendritic cells

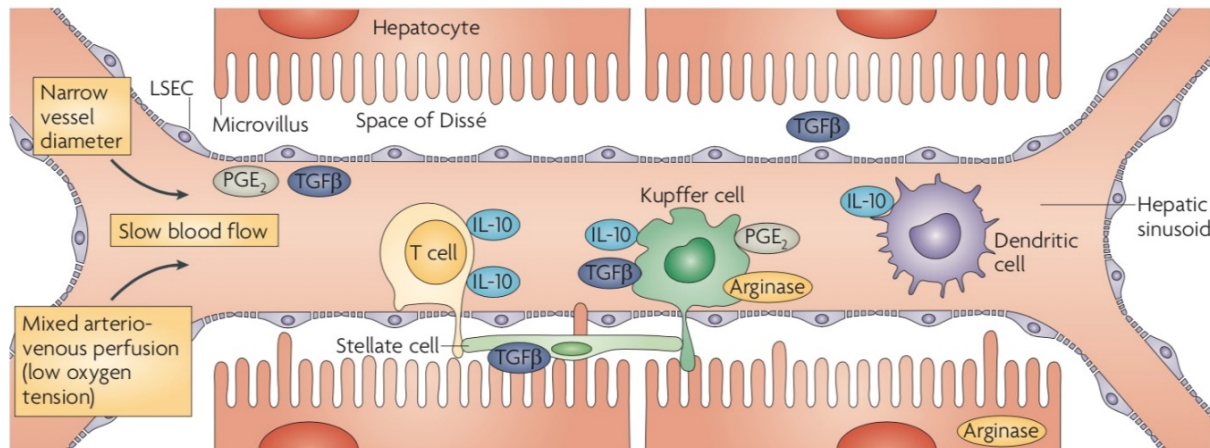
<sup>4</sup> Engl.: Kupffer cells

<sup>5</sup> Engl.: liver sinusoidal endothelial cells

<sup>6</sup> Engl.: programmed death ligand 1

## 1. Einleitung

regulatorische T-Zellen oder sogenannte “myeloid-derived suppressor cells” (MDSC<sup>7</sup>) tragen auch zu diesem Milieu bei. Sie hemmen die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder von Enzymen wie Arginase, welche die für CD8<sup>+</sup> T-Zellen wichtige Aminosäure Arginin abbaut (Pallett et al., 2015).



**Abb. 2: Überblick über die immuntoleranten Mechanismen in der Leber.**

Langsamer Blutfluss und schmale Durchmesser der Blutgefäße sorgen für eine effiziente Kommunikation der Immunzellen untereinander und mit den Hepatozyten. Die anatomische Besonderheit der Leber hat den Vorteil, dass T-Zellen effizienter infizierte Zellen finden können, aber auch unter homöostatischen Bedingungen effektiver gehemmt werden. Neben direktem Zell-Zell Kontakt wird die Hemmung auch durch erhöhte Konzentrationen an immunsuppressiven Botenstoffen wie Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), TGFβ<sup>8</sup> und IL-10 aufrecht gehalten, die von toleranten DCs, Kupfer-Zellen, regulatorischen T-Zellen und Ito-Zellen produziert werden (Thomson & Knolle, 2010).

Trotz dieser immuntoleranten Umgebung besitzt das Immunsystem der Leber effektive Mechanismen, um Infektionen von hepatotropen Viren, wie Hepatitis B Virus (HBV), effektiv zu beseitigen. Dafür sind vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen zuständig, die HBV-Antigene auf MHC Klasse I Molekülen (MHC I<sup>9</sup>) der Hepatozyten erkennen und diese gezielt eliminieren. Neben CD8<sup>+</sup> T-Zellen und anderen Lymphozyten des adaptiven Immunsystems gibt es eine Vielzahl an Lymphozyten vom angeborenen Immunsystem, die in der Leber vorkommen. Sie halten sich primär im Gewebe auf und einer ihrer Hauptaufgaben ist es, eine

<sup>7</sup> Engl.: myeloid-derived suppressor cells

<sup>8</sup> Engl.: Transforming-growth factor beta

<sup>9</sup> Engl.: major histocompatibility class I

## 1. Einleitung

überschießende antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zu unterbinden (Mikulak et al., 2019).

### 1.1 Geweberesidente Lymphozyten

Die dauerhafte Präsenz im Gewebe hat bei antigen-präsentierenden Zellen in der Leber dazu geführt, immuntolerante Eigenschaften auszubilden. Durch molekulare und metabolische Anpassungen an die Umgebung gelingt es diesen Zellen trotz der Anforderungen, die die Leber stellt, im Organ zu überleben, und an der Homöostase des Gewebes beteiligt zu sein. Darüberhinaus gehören neben den Lymphozyten des angeborenen Immunsystems u.a. NK Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen oder NKT Zellen, auch geweberesidente T-Gedächtniszellen ( $T_{rm}$ ) zu denjenigen Zellen, die sich an die Gegebenheiten des Gewebes angepasst haben (X. Wang et al., 2020). Ihre Aufgabe ist es, das Gewebe auf infizierte oder geschädigte Zellen zu überprüfen und gegebenenfalls frühzeitig eine Immunreaktion einzuleiten. Geweberesidente T-Gedächtniszellen sind die einzigen Zellen aus dem adaptiven Immunsystem, die nur in der Peripherie verbleiben. Sie bilden sich nach der erfolgreichen Eliminierung eines Pathogens, aber, anders als die langlebigen zentralen ( $T_{cm}$ ) und Effektor T-Gedächtniszellen ( $T_{em}$ ), zirkulieren sie nicht zwischen Blut, Lymphorganen und den peripheren Organen. Die Unterscheidung dieser T-Gedächtniszellen erfolgt anhand der unterschiedlichen Expression der Oberflächenmoleküle CD62L (nur  $T_{cm}$ ) und CX3CR1 (nur  $T_{em}$ ) (Bottcher et al., 2015).  $T_{rm}$  exprimieren letzteren Rezeptor nicht, stattdessen CD69 und CD103 (Gebhardt et al., 2009). Zur näheren Charakterisierung von  $T_{rm}$  werden auch Chemokinrezeptoren wie CCR5, CXCR3 oder CXCR6 herangezogen (Takamura, 2018). Während  $T_{cm}$  nur in den Lymphorganen vorkommen, wandern  $T_{em}$  dagegen zwischen Lymphknoten, Blut und Organen umher. Aus diesem Grund besitzen sie im Gegensatz zu  $T_{rm}$  erhöhte Expressionen an Rezeptoren und Liganden, die für das Wandern in die Lymphknoten verantwortlich sind, wie S1PR1, IL-7 oder CCR7 (Rosato et al., 2017). Für ihre Aufgabe erste Verteidigungslinie zu sein, besitzen sie im Vergleich zu anderen Gedächtniszellen erhöhte Mengen an zytotoxischen Molekülen wie Granzym B (GzmB) oder Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ). Dadurch ähneln sie in ihrem Phänotyp dem von



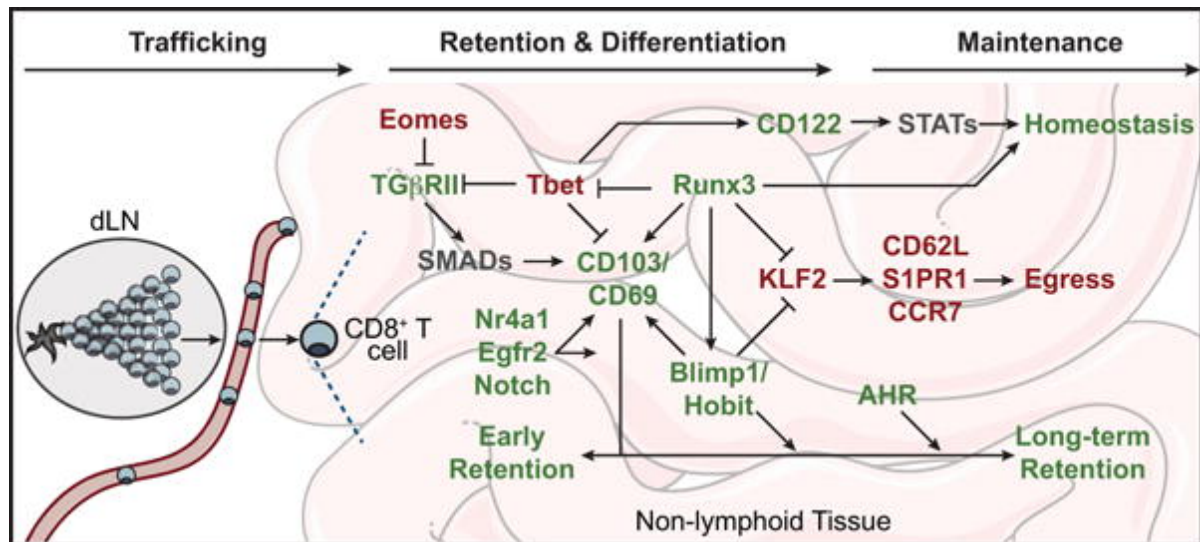
## 1. Einleitung

angeborenen Lymphozyten und gelten als Lymphozytenpopulation, die die Brücke zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem im Gewebe bilden.

### 1.2.1 Entstehung und Regulation von $T_{rm}$

Die Besonderheit von  $T_{rm}$  ist ihre Präsenz im Gewebe, in der die Zellen zahlreichen Faktoren ausgesetzt sind, wie z.B. geringem Sauerstoffgehalt, erhöhter Konzentration an Nährstoffen oder der permanenten Interaktion mit dem Gewebe (Buck et al., 2017). Dennoch gleicht die Ausbildung von  $T_{rm}$  den anderen Gedächtniszellen (Mackay et al., 2013). Ob Gedächtniszellen nach erfolgreicher Beseitigung des Pathogens im Gewebe zurückbleiben oder in die benachbarten Lymphknoten wandern, hängt vom genetischen Programm der Zellen ab, das durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Milner & Goldrath, 2018). Ein entscheidender Faktor ist die Herunterregulierung der beiden Transkriptionsfaktoren Eomes und T-bet, die nicht nur die Expression der Rezeptoren, die von TGF $\beta$  und IL-15 aktiviert werden können, bewirken, sondern auch die Expression der Adhäsionsmoleküle CD69 und CD103 (Abb. 3). So stellen TGF $\beta$  und IL-15 wichtige Zytokine für die Ausprägung der Zellpopulation und für den Erhalt der Zellen im Gewebe dar (Mackay et al., 2013; Mackay et al., 2015).

## 1. Einleitung



**Abb. 3: Transkriptionelle Regulation der T<sub>m</sub> Differenzierung.**

Die Differenzierung zu gewebeständigen Gedächtniszellen verläuft schrittweise, in der die Herunterregulierung von EOMES<sup>10</sup> und Tbet<sup>11</sup> eine wichtige Rolle spielt. In der Phase, in der die T<sub>m</sub> im Gewebe verbleiben, sorgen Runx3<sup>12</sup> und Blimp1<sup>13</sup>/Hobit<sup>14</sup> durch die Repression von KLF2<sup>15</sup> dafür, dass die T<sub>m</sub> keine Rezeptoren bilden, die die Zellen in die Lymphknoten zurückführen könnten (Milner & Goldrath, 2018).

Im weiteren Verlauf der Differenzierung zu T<sub>m</sub> spielen die Transkriptionsfaktoren Runx3 und Blimp1/Hobit eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Population und der Lokalisation im Gewebe (Milner et al., 2017; Zundler et al., 2019). Dabei regulieren sie den Transkriptionsfaktor KLF2 herunter, der wichtig für die Expression von Liganden und Rezeptoren wie CD62L, S1PR1 und CCR7 ist. Diese Moleküle sind relevant für das Einwandern in die Lymphknoten und den dortigen Verbleib (Mackay et al., 2015). Hinsichtlich gewebeständigen Gedächtniszellen in der Lunge von Menschen ist bekannt, dass Nr4a1, Egfr2 und Notch kritisch für die Erhaltung dieser Zellen sind (Hombrink et al., 2016). Neben der transkriptionellen Regulation ist auch die metabolische Fitness dieser Zellen an die Situation im Gewebe angepasst. Über die Transporter FABP4<sup>16</sup> und FABP5<sup>17</sup> importieren T<sub>m</sub> exogenen Fettsäuren, um den Energiebedarf zu decken (Pan et al., 2017). Damit unterscheiden sie sich von anderen Gedächtniszellen, die zwar ihre Energie auch über

<sup>10</sup> Engl.: Eomesodermin

<sup>11</sup> Engl.: T-box transcription factor

<sup>12</sup> Engl.: Runt-related transcription factor

<sup>13</sup> Engl.: PR domain zinc finger protein 1

<sup>14</sup> Engl.: Homolog of Blimp1 in T cells

<sup>15</sup> Engl.: Krüppel-like factor 2

<sup>16</sup> Engl.: Fatty acid binding protein 4

<sup>17</sup> Engl.: Fatty acid binding protein 5

## 1. Einleitung

Fettsäureoxidation generieren, aber diesen durch die Aufnahme von Glukose erzielen (O'Sullivan et al., 2014). Eine weitere Anpassung der  $T_{rm}$  an die Lokalisation im Gewebe stellt die hohe Expression des purinergen Rezeptors P2XR7<sup>18</sup> dar (Borges da Silva et al., 2018; Stark et al., 2018). Dieser Rezeptor wird durch extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) oder Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) aktiviert und unterstützt die metabolische Fitness von  $T_{rm}$  durch Stimulierung der AMP<sup>19</sup>-aktivierten Kinase (Borges da Silva et al., 2018). Der Rezeptor wird durch die Aktivierung des T-Zellrezeptors herunterreguliert, sodass antigen-spezifische  $T_{rm}$  während einer Entzündung gegenüber unspezifischen  $T_{rm}$  überleben (Stark et al., 2018). Durch die zusätzliche Aktivierung des Calcium-Signalwegs über P2XR7 wird angenommen, dass diese schwache T-Zellaktivierungen verstärken kann (Trebak & Kinet, 2019).

### 1.2.2 $T_{rm}$ in der Leber

In der Leber ist die Expression von CXCR6 auf  $T_{rm}$  unverzichtbar für den Erhalt der Population nach erfolgreicher Beseitigung einer Malariainfektion (Tse et al., 2014). In der Leber exprimieren LSECs und Hepatozyten den Liganden CXCL16, der wie der Rezeptor bei entzündlichen Prozessen in der Leber nochmals verstärkt hochreguliert wird (Heydtmann et al., 2005). Leichte Entzündungsreaktionen und antigen-spezifisches Programmieren durch dendritische Zellen in der Leber wird auch als Strategie verwendet, um durch therapeutische Vakzinierung die Abwehrreaktion bei Malaria-Infektion durch verstärkte Infiltration und Erhalt der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber zu verbessern (Fernandez-Ruiz et al., 2016). Nicht nur die Expression von CXCR6 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist wichtig, um  $T_{rm}$  in der Leber zurückzuhalten, sondern auch die Stimulierung durch IL-15 ist essentiell (Holz et al., 2018). IL-15 gehört wie IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-21 zur Familie der  $\gamma_c$ -Zytokine. Das Besondere am IL-15 Signalweg ist, dass dieser im trimeren Rezeptorkomplex mit IL-2 $\gamma$  und IL-15 Rezeptor funktioniert (Rochman et al., 2009). In der Leber können neben den Kupffer-Zellen und inflammatorischen Monozyten auch Hepatozyten und Ito-Zellen

---

<sup>18</sup> P2XR purinoreceptor 7

<sup>19</sup> Adenosinmonophosphat

## 1. Einleitung

den IL-15 Rezeptor tragen (Golden-Mason et al., 2004; Suzuki et al., 2006) Über den PI3K<sup>20</sup>/Akt und STAT5<sup>21</sup> Signalweg wird das IL-15 Signal in die T-Zelle weitergeleitet (Rochman et al., 2009). Neben IL-15 ist auch die initiale Aktivierung des T-Zellrezeptors wichtig für die Ausprägung von T<sub>rm</sub> in der Leber, deren ursprüngliche Aktivierung nicht notwendigerweise in der Leber stattgefunden haben muss (Holz et al., 2018). Ähnliche Charakteristika wie Phänotyp und Abhängigkeit von IL-15 werden auch den T<sub>rm</sub> in der humanen Leber zugeschrieben. Der einzige Unterschied ist die zusätzliche Expression von CD103 und die geringen GzmB Level (Pallett et al., 2017).

### 1.2.3 T<sub>rm</sub> bei autoimmunen Erkrankungen

Die permanente Präsenz von T<sub>rm</sub> im Gewebe und ihr erhöhtes zytotoxische Potenzial rückt diese Population nicht nur bei Impfstrategien immer stärker in den Fokus der Forschung, sondern auch bei autoimmunen Erkrankungen (Clark, 2015). Autoreaktive T<sub>rm</sub> wurden bisher für Psoriasis, Vitiligo, Asthma und Kontaktdermatitis in experimentellen Mausmodellen sowie in der Klinik bei Patienten beschrieben. Für andere Entzündungskrankheiten, die die Gelenke, Gehirn, Darm oder Niere betreffen, gibt es bisher nur eine Assoziation (Wu et al., 2018). Interessanterweise wird eine Beteiligung von T<sub>rm</sub> bei der autoimmunen Hepatitis bisher noch nicht vermutet, vielmehr wird die Krankheit durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Th17 Zellen und Autoantikörper, die initial durch ein körpereigenes Antigen fälschlicherweise programmiert worden sind, verursacht (Mieli-Vergani et al., 2018). Leberschäden können auch durch einen antigen-unabhängigen Mechanismus entstehen, indem NKG2D-exprimierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch IL-15 aktiviert worden sind, gestresste Hepatozyten erkennen und sie eliminieren (J. Kim et al., 2018). Bei Multipler Sklerose können Gedächtniszellen, die nur durch erhöhte Zytokinkonzentrationen und nicht durch ein Antigen aktiviert worden sind, Schäden im Hirngewebe verursachen (Lee et al., 2019). Die eigentliche Aufgabe solcher Gedächtniszellen ist es, die antigen-spezifischen Gedächtniszellen in ihrer Immunantwort gegenüber einer viralen Infektion zu

---

<sup>20</sup> Engl.: Phosphoinositid-3-Kinase

<sup>21</sup> Engl.: Signal transducer and activator of transcription 5

## 1. Einleitung

unterstützen (Chu et al., 2013). Zu den Zytokinen, die in der Lage sind, am Infektionsherd Gedächtniszellen antigen-unabhängig zu aktivieren, gehören IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 und TNF (Freeman et al., 2012). Für autoimmune Erkrankungen wie Vitiligo, bei der es zu einem erhöhten Level an IL-15 kommt, kann eine therapeutische Blockade von Zytokinen erfolgreich sein (Richmond et al., 2018). Ob es auch für weitere autoimmune Erkrankungen umsetzbar ist, muss noch geklärt werden (Wu et al., 2018).

### 1.3 Regulation der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Ein fundamentales Grundprinzip des adaptiven Immunsystems ist es, nur infizierte Zellen zu eliminieren und das restliche Gewebe verschont zu lassen (Bluestone et al., 2015). Die Grundlage für die Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Antigenen wird in frühen Jahren im Thymus mit Hilfe der positiven und negativen Selektion sichergestellt, was als zentrale Toleranz bezeichnet wird. Demgegenüber steht die periphere Toleranz, bei der T-Zellen durch nicht zureichende Programmierung entweder anerg oder eliminiert werden (Klein et al., 2014). Trotz dieser zentralen Regulation kommt es in seltenen Fällen zur Ausbildung von autoimmunen Erkrankungen, bei welchen das adaptive Immunsystem das eigene Gewebe angreift. Ein bekanntes Beispiel für eine autoimmune Erkrankung, die durch T<sub>rm</sub> verursacht wird, ist Psoriasis und Vitiligo (Cheuk et al., 2017). Bei allen autoimmunen Erkrankungen, die durch T-Zellen verursacht werden, wird angenommen, dass die Erkennung eines Autoantigens zugrunde liegen muss (Clark, 2015).

#### 1.3.1 Molekularer Mechanismus der Interaktion von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Gewebe

Ein elementarer Bestandteil der Interaktion von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer infizierten Zielzelle ist, dass eine stabile Synapse über den T-Zellrezeptor mit dem MHC-I:Peptidkomplex aufgebaut wird (Gaud et al., 2018). Diese immunologische Synapse sorgt für eine Reorientierung der T-Zelle in Richtung Zielzelle, in der sie das Zytoskelett, die zytotoxischen Vesikel und die Oberflächenproteine entsprechend polarisiert ausrichtet.

## 1. Einleitung

Dadurch wird sichergestellt, dass nur die infizierte Zelle eliminiert wird und umliegendes Gewebe verschont bleibt (Huppa & Davis, 2003). Eine stabile immunologische Synapse wird nicht nur über das Clustering von T-Zellrezeptor Molekülen aufgebaut, sondern wird durch Integration von Adhäsionsmolekülen in diesen supramolekularen Komplex verstärkt. Das wesentliche Adhäsionsmolekül auf T Zelle Seite ist LFA-1<sup>22</sup>, das mit ICAM-1<sup>23</sup> auf der Zielzelle interagiert. Bei der Ausbildung der Synapse kommt es in der T-Zelle zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die die Sekretion zytotoxischer Vesikel zur Folge hat (Voskoboinik et al., 2015). Über eine komplexe Phosphorylierungskaskade, indem LAT<sup>24</sup> als Gerüstprotein für verschiedene Kinasen dient, werden neben den Signalwegen wie MAPK<sup>25</sup> oder NF- $\kappa$ B<sup>26</sup> auch die Öffnung von Calcium-(Ca<sup>2+</sup>)kanälen induziert (Gaud et al., 2018). Steigende Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in der T-Zelle aktiviert die Phosphatase Calcineurin, die durch die Dephosphorylierung von NFAT<sup>27</sup> den Eintritt des Transkriptionsfaktors in den Zellkern ermöglicht. NFAT unterstützt die Transkription von Effektormolekülen und damit eine effiziente Eliminierung der infizierten Zelle (Vaeth & Feske, 2018). Bei unvollständiger Aktivierung, entweder durch Fehlen von Kostimulation oder von Zytokinen, wird die T-Zelle in einen anergen oder erschöpften Zustand gebracht (Martinez et al., 2015). Die zusätzliche Stimulierung findet über STAT Signalwege für Zytokine und über den PI3K/Akt/mTOR Signalweg für CD28 Aktivierung statt (L. Chen & Flies, 2013; O'Shea & Paul, 2010). Inhibitorische Signalwege, die wichtig für eine überschießende Immunreaktion sind bzw. in einer immunsuppressiven Umgebung wie beim Tumor vorherrschen, werden über inhibitorische Rezeptor wie PD-1 oder CTLA-4<sup>28</sup> induziert (Sharpe & Pauken, 2018). Gegenregulierende Signalwege sind entscheidend, um Gewebeschäden und Autoimmunität durch unverhältnismäßige Ausschüttung von Effektormolekülen der zytotoxischen CD8+ T-Zellen zu zuverhindern ().

---

<sup>22</sup> Engl.: leucocyte function associated molecule-1

<sup>23</sup> Engl.: Intercellular adhesion molecule 1

<sup>24</sup> Engl.: Linker of Activation of T cells

<sup>25</sup> Engl.: Mitogen-activated protein kinase

<sup>26</sup> Engl.: Nuclear factor kappa B

<sup>27</sup> Engl.: Nuclear factor of activated T cells

<sup>28</sup> Engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4

## 1. Einleitung

### 1.3.2 Effektormechanismen von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Unabhängig davon, ob zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen fremde oder körpereigene Antigene erkennen, verfügen sie nach entsprechender Aktivierung über verschiedene Effektor-Mechanismen zur Elimination von Zielzellen (Kaech & Cui, 2012). Eine wichtige zytotoxische Funktion ist die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) durch Perforin und Granzyme. Perforin ist ein Protein, das Poren in der Plasmamembran der Zielzelle formt, sodass die ausgeschütteten zytotoxischen Granula, sog. Serinproteasen, in die Zelle gelangen können und die Apoptose einleiten. Neben den Effektor CD8<sup>+</sup> T-Zellen nutzen auch die NK und NKT Zellen diesen Weg, um Zielzellen zu eliminieren (Voskoboinik et al., 2015). Perforin/Granzyme, TNF<sup>29</sup> und die membranständigen Liganden FasL<sup>30</sup> und TRAIL<sup>31</sup> können Apoptose in den Zielzellen induzieren (Strasser et al., 2009). TNF ist ein pleiotropes Zytokin, das sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkung hat und sogar Adhäsion sowie Proliferation von Gewebe bewirken kann (Mehta et al., 2018). Ähnlich wie TNF ist auch IFN $\gamma$  in der Lage, z.B. MHC Klasse I Moleküle auf Zielzellen zu erhöhen sowie die Differenzierung von Th1 Zellen zu unterstützen (L. Chen & Flies, 2013; O'Shea & Paul, 2010). Ist eine Immunantwort erfolgreich abgeschlossen, folgt die Kontraktionsphase, in der die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen über Fas-FasL Interaktionen in die Apoptose getrieben werden, um keinen weiteren Gewebeschaden zu verursachen (Strasser et al., 2009). Aufgrund der Vielzahl verschiedener Effektorstrategien ist eine strenge Regulation sehr wichtig, um die Koordination einer Immunantwort sowie die Spezifität der Eliminierung von infizierten Zellen zu gewährleisten (Kaech & Cui, 2012).

### 1.3.3 Transkriptionelle und metabolische Regulation der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Eine entscheidende Rolle für die molekulare Regulation der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen die Transkriptionsfaktoren T-bet, BLIMP1, IRF4/BATF und NFATc1 (Klein-

---

<sup>29</sup> Engl.: tumor necrosis factor alpha

<sup>30</sup> Engl.: Fas ligand

<sup>31</sup> Engl.: TNF-related apoptosis-inducing ligand

## 1. Einleitung

Hessling et al., 2017; Man & Kallies, 2015). Zusammen sind sie für die Differenzierung von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu Effektorzellen und für die Koordination der Expression von IFN $\gamma$ , Perforin und GzmB verantwortlich (Kaech & Cui, 2012). Obwohl die Regulation der Effektorfunktion bei kurzlebigen Effektorzellen mittlerweile gut bekannt ist, ist sie bei T<sub>rm</sub> schlechter erforscht (Amsen et al., 2018). Da T-bet in dieser Population herunterreguliert ist, übernehmen RUNX3 und BLIMP1/Hobit teilweise die Induktion von IFN $\gamma$  und GzmB (Kragten et al., 2018; Milner et al., 2017). Ein weiterer potenzieller Kandidat wäre Foxo1<sup>32</sup>, dessen Herunterregulierung notwendig für die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und bei T<sub>rm</sub> entscheidend für die fehlende Aktivität von KLF2 ist (Rao et al., 2012; Skon et al., 2013). Neben der transkriptionellen Regulation spielt der Metabolismus der CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Effektorfunktion eine wichtige Rolle. Effektorzellen besitzen einen auf Glykolyse ausgelegten Metabolismus, wohingegen Gedächtniszellen ihre Energie eher aus der Fettsäureoxidation beziehen (Klein-Hessling et al., 2017; Man & Kallies, 2015). Durch den glykolytischen Metabolismus und die damit verbundene Verwendung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein wichtiges Enzym der Glykolyse, wird die inhibitorische Funktion von GAPDH an der untranslatierten Region am 3' Ende (3-UTR) der mRNA<sup>33</sup> von IFN $\gamma$  aufgehoben und für die Translation zugänglich gemacht (Chang et al., 2013)(Abb. 4). Durch eine erhöhte Glykolyse ist auch die Laktatdehydrogenase (LDHA) stärker aktiv und moduliert damit den Fluss des Citratzyklus, der seinerseits Acetyl-CoA in ausreichender Menge bereitstellt. Dieses metabolische Zwischenprodukt ist für die Acetylierung von Histonen verantwortlich, u.a. für IFN $\gamma$ , sodass dieser Genabschnitt zugänglicher für die Transkription wird (Peng et al., 2016). Die metabolische Umsetzung in Acetyl-CoA und die damit verbundene erhöhte Acetylierung von Histonen oder Enzymen kann einerseits durch erhöhte Acetate-Konzentrationen während einer bakteriellen Infektion im Blut begünstigt werden oder durch exogene Zugabe in den Blutkreislauf gelangen, um die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in nährstoffarmen Umgebungen wie im Tumor zu erhöhen (Balmer et al., 2016; Qiu et al., 2019). Es wird vermutet, dass sich

---

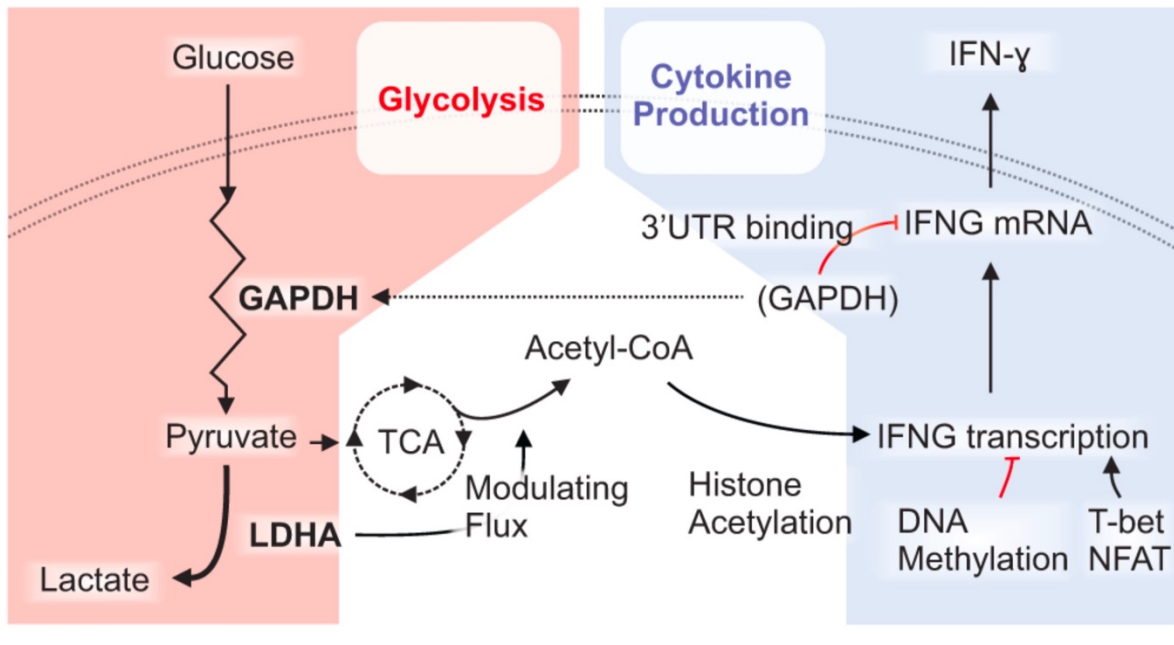
<sup>32</sup> Engl.: Forkhead box protein O1

<sup>33</sup> Engl.: messenger RNA



## 1. Einleitung

$T_{rm}$  ähnlichen Mechanismen für die Regulation der Effektorfunktion bedienen (Amsen et al., 2018).



### Activated Effector T cell

**Abb. 4: Metabolische Regulation von Zytokinen in Effektor T-Zellen.**

Durch den glykolytischen Stoffwechsel von Effektor T-Zellen kommt es zur stärkeren Verwendung der Enzyme GAPDH und LDHA. Dadurch wird zum einen die Translation der mRNA von IFN $\gamma$  ermöglicht und zum anderen können ausreichende Mengen an Acetyl-CoA für die Acetylierung von Histonen verwendet werden. Das führt zur effizienteren Transkription von IFN $\gamma$ . Die metabolische Regulation findet zusätzlich zur transkriptionellen Regulation durch T-bet und NFAT statt (Siska & Rathmell, 2016).

## 1.4 Chronische Entzündungen in der Leber

Entzündungen in der Leber sind meistens der Ursprung für Leberschädigungen, die ohne Intervention zu Fibrose, Zirrhose und schließlich zu Leberkrebs führen können. Auslöser für chronische Entzündungen in der Leber können vielfältig sein: chronische Infektion durch Hepatitis C Virus (HCV) oder HBV, Schäden der Gallenblase, exzessiver Alkoholkonsum oder übermäßige Einlagerung von Fett in der Leber (Ringelhan et al., 2018). Vor allem die weltweite Inzidenz der nicht-alkoholinduzierten Fettleber-Erkrankungen (NAFLD) nimmt dramatisch zu, die mit der ungesunden fett- und zuckerreichen Ernährung in den westlichen Ländern zu erklären ist.

## 1. Einleitung

### 1.4.1 NAFLD<sup>34</sup>

Unter NAFLD werden verschiedene Abnormalitäten der Leber verstanden, beginnend mit vereinzelter Steatose (übermäßige Fetteinlagerung in den Hepatozyten) (NAFL) bis hin zur entzündeten Leber mit stärkerer Steatose und Leberschaden (Sanyal et al., 2010). Für nicht-alkoholinduzierte Hepatitis (NASH<sup>35</sup>) sind ballonartige Hepatozyten mit unterschiedlich ausgeprägter Fibrose charakteristisch (Schuster et al., 2018). NAFLD ist stark mit Übergewicht, Adipositas und dem metabolischen Syndrom, das Diabetes Typ II einschließt, assoziiert (Younossi et al., 2018). Über eine fett- und fruktoselastige Ernährung kommt es zum Anstieg an freien Fettsäuren im Blut und in den Hepatozyten. In den Hepatozyten werden freie Fettsäuren normalerweise über mitochondriale und peroxisomale  $\beta$ -Oxidation und über die Reesterifizierung zu Triglyzeride umgesetzt. Ist die Leber aber nicht mehr in der Lage, die Fettsäuren über die beiden Stoffwechselwege zu verarbeiten, kommt es zur Bildung von lipotoxischen Fetten wie Ceramide und Diacylglycerole, die oxidativen Stress, Aktivierung des Inflammasoms und Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER Stress) verursachen und die Leber damit schädigen (Friedman et al., 2018). Durch den anhaltenden Leberschaden, der durch Freisetzung von DAMPs<sup>36</sup> und pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TGF $\beta$  oder TNF gekennzeichnet ist, werden nicht nur Makrophagen in der Leber aktiviert, sondern auch Ito-Zellen<sup>37</sup>, die sich zu Myofibroblasten differenzieren können und Matrixproteine freisetzen (Tsuchida & Friedman, 2017). Der Prozess, bei dem die Matrix schneller auf- als abgebaut wird, wird als Fibrose bezeichnet. Bei verstärkter Fibrose und gleichzeitiger Vernarbung des geschädigten Lebergewebes wird die Leber zirrhotisch. Ist die Überwachung des Immunsystems von aberranten Leberzellen in diesem Prozess fehlerhaft, steigt die Wahrscheinlichkeit, an hepatozellulärem Karzinom zu erkranken (Ringelhan et al., 2018).

---

<sup>34</sup> Engl.: non-alcoholic fatty liver diseases

<sup>35</sup> Engl.: non-alcoholic steatohepatitis

<sup>36</sup> Engl.: danger-associated molecular patterns

<sup>37</sup> Engl.: hepatic stellate cells

## 1. Einleitung

### 1.4.2 Sterile Entzündung in NASH

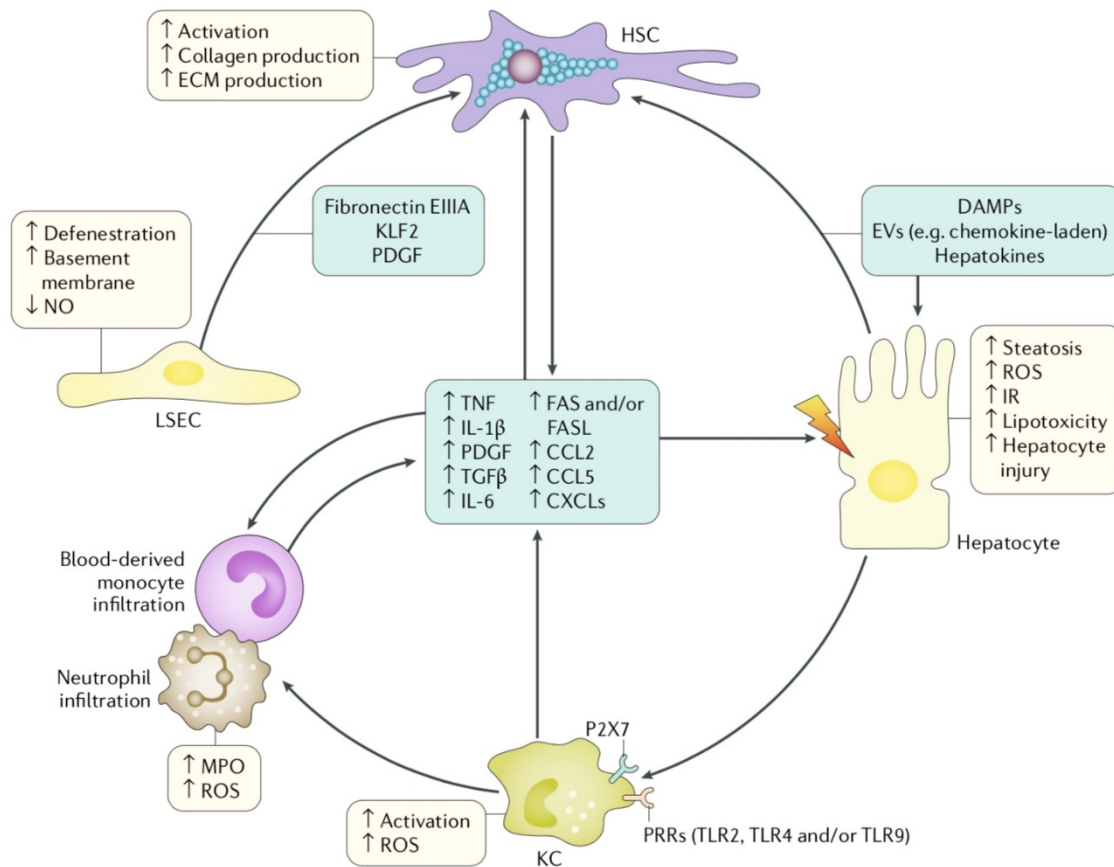
Im Krankheitsverlauf der nicht-alkoholisch induzierten Fettleber kommt es bei unveränderter, übermäßiger Einlagerung von freien Fettsäuren in Hepatozyten zum Übergang der Steatose (NAFL) zu Entzündungsreaktionen (Sanyal et al., 2010). Hepatozyten, die durch oxidativen Stress oder ER Stress einem nekrotischen Zelltod sterben, setzen zelluläre Bestandteile in die Umgebung frei, die das Immunsystem aktivieren. Dies wird als sterile Entzündung bezeichnet. Über 20 verschiedene DAMPS sind bisher identifiziert worden. Die bekanntesten unter ihnen sind *High-mobility-group-box* Proteine (z.B. HMGB1), Hitzeschockproteine (z.B. HSP60), DNA und ATP (Kubes & Mehal, 2012). Neben den Kupferzellen, als wichtigste Population bei der Erkennung von DAMPS, reagieren weitere Zellen wie Hepatozyten, LSECs, Monozyten und Ito-Zellen auf DAMPS mit der Bildung eines proinflammatorischen Milieus (Schuster et al., 2018)(Abb. 5). Ähnlich wie PAMPS<sup>38</sup> werden DAMPS über Toll-like Rezeptoren und Inflammasome erkannt. Inflammasome können auch über reaktive Sauerstoffspezies (ROS<sup>39</sup>) und über extrazelluläres ATP aktiviert werden (G. Y. Chen & Nunez, 2010). Dabei werden nicht nur proinflammatorische Zytokine sezerniert, sondern auch Chemokine, die die Infiltration von Neutrophilen und inflammatorischen Monozyten begünstigt (Schuster et al., 2018). Eine Konsequenz der erhöhten Level an TNF und IL-1 $\beta$  ist die Hochregulierung von ICAM-1 auf Endothelzellen in der Leber (LSEC), sodass Neutrophile leichter ins Gewebe einwandern können (Benedicto et al., 2017; Xu et al., 2014). Neutrophile sind phagozytische Leukozyten, die nicht nur leberschädigende Wirkung durch die Freisetzung von ROS und Myeloperoxidase (MPO) haben, sondern auch bei der Leberregeneration beteiligt sind (Yang et al., 2019). Genauso wie Neutrophile sind auch Kupfer-Zellen in der Lage, ROS zu produzieren und spielen für den Verlauf von NAFL zu NASH eine zentrale Rolle. Inwieweit die beiden Zelltypen einen leberschädigenden Einfluss haben, ist nicht bekannt (Krenkel & Tacke, 2017).

---

<sup>38</sup> Engl.: Pathogen-associated molecular patterns

<sup>39</sup> Engl.: reactive oxygen species

## 1. Einleitung



**Abb. 5: Kommunikation zwischen Immunzellen und Lebergewebe in NASH.**

Ausgangspunkt für die Kaskade der Immunreaktionen in der Leber bilden geschädigte Hepatozyten, die DAMPs in die Umgebung freisetzen. Extrazelluläres ATP, das als DAMP fungiert, wird über den P2X7 Rezeptor der Kupfer-Zellen erkannt und zusammen mit Liganden für diverse Toll-like Rezeptoren sezernieren sie Zytokine und Chemokine, der inflammatorischen Monozyten und Neutrophile in die Leber rekrutieren. Zusätzlich zu den Immunzellen können auch LSECs über PDGF<sup>40</sup>, KLF2 oder Fibronectin Ito-Zellen aktivieren und die Pathogenese von NASH vorantreiben (Schuster et al., 2018).

### 1.4.3 Adaptives Immunsystem in NASH

In NASH findet ein konstantes Wechselspiel aus Schädigung und Regeneration des Gewebes statt, bei dem die Wahrscheinlichkeit der Bildung von prämaligen Hepatozyten zunimmt (Ringelhan et al., 2018). Die aberranten Hepatozyten werden unter normalen Umständen vom adaptiven Immunsystem, insbesondere den CD8<sup>+</sup> T-Zellen, erkannt und eliminiert (Reading et al., 2018). CD8<sup>+</sup> T<sub>rm</sub> nehmen dafür eine besondere Rolle ein, wie es bereits für andere Tumore beschrieben worden ist (Amsen et al., 2018). Dies ist konsistent mit Studien, die gezeigt haben, dass die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch der

<sup>40</sup> Engl.: platelet derived growth factor

## 1. Einleitung

selektive Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen die HCC<sup>41</sup> Inzidenz erhöht (Ma et al., 2016; Shalapour et al., 2017). Erfolgt die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer frühen Phase von NASH, in der sich noch kein prämaligener Zustand ausgebildet hat, kann der Leberschaden aufgehoben werden. Dies unterstützt die Annahme, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen abhängig vom Milieu auch gewebeschädigend sein können (Wolf et al., 2014). Ob die Erhöhung der HCC Inzidenz bei CD8<sup>+</sup> T-Zelldepletion während der chronischen Entzündung abhängig vom Zeitpunkt oder von der richtigen CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation ist, ist noch unklar (Ringelhan et al., 2018). Während es für die Beteiligung von B-Zellen bei der Pathogenese von NASH bisher keine eindeutigen Daten gibt, ist für NKT-Zellen bekannt, dass sie das Lymphotoxin LIGHT sezernieren. Dies veranlasst die Hepatozyten, verstärkt Fettsäuren aufzunehmen (Wolf et al., 2014). Darüber hinaus haben NKT Zellen die Möglichkeit über Osteopontin Ito-Zellen zu aktivieren, wodurch die Fibrose vorangetrieben wird (Syn et al., 2012). Direkter gewebeschädigender Einfluss ist von NKT Zellen noch nicht beschrieben worden. Im Gegensatz zu NKT Zellen können NK Zellen aktivierte Ito-Zellen eliminieren und haben einen eher positiven Einfluss auf die Pathogenese von NASH (Gur et al., 2012). Es ist mittlerweile unbestritten, dass das adaptive Immunsystem an der Pathogenese von NASH beteiligt ist. Welche spezifischen T-Zellen den Leberschaden in NASH jedoch verursachen, ist noch unklar.

### 1.4.4 Behandlungstrategien von NASH

Die Pathogenese von NASH zeigt, dass sie durch mehrere Faktoren verursacht wird, Begleiterkrankungen wie Diabetes zur Folge hat und progressiv ist (Anstee et al., 2019). Deswegen ist der Ausgangspunkt jeder Behandlung, das Ernährungs- und Bewegungsverhalten zu ändern, um die Symptome von NASH ohne medikamentöse Intervention zu reduzieren (Vilar-Gomez et al., 2015). Die bisher verwendeten pharmakologischen Interventionen zielen auf verschiedene leberschädigende Prozesse bei NASH ab: metabolische Fehlfunktion, Zellstress und Apoptose sowie das fehlgeleitete Immunsystem (Friedman

---

<sup>41</sup> Engl.: Hepatocellular carcinoma

## 1. Einleitung

et al., 2018). Die Behandlung mit PPAR $\gamma$ <sup>42</sup> Liganden wie Pioglitazone sorgt dafür, dass die Produktion lipotoxischer Lipide in der Leber reduziert wird, da die Speicherung von überschüssigem Fett ins Fettgewebe oder in die Skelettmuskeln verlagert wird (Sanyal et al., 2010). Eine andere Behandlungsstrategie stellt die Aktivierung vom Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) durch Agonisten wie z.B. Obeticholsäure dar, die eine verstärkte Lipolyse und geringe Produktion von Gallensäure bewirkt (Connolly et al., 2018). Der positive Einfluss von Antioxidantien wie Vitamin E oder von Zelltodhemmern wie Emricasan werden gegenwärtig in klinischen Studien getestet (Barreyro et al., 2015; Sanyal et al., 2010). Die meisten Behandlungsansätze, die die am fehlgeleiteten Immunsystem ansetzen, betreffen nur das angeborene Immunsystem. Dazu zählen Inhibitoren für den NF $\kappa$ B-, JNK- und MAPK-Signalweg (Narayanan et al., 2016). Derzeit werden auch Inhibitoren gegen die CCR2-CXCR5 Achse getestet, die wichtig für die Infiltration von Immunzellen in die entzündete Leber sind und die Entzündung verstärken. Obwohl dem adaptiven Immunsystem eine immer größere Bedeutung bei der Pathogenese von NASH zugeschrieben wird, stehen bisher keine Behandlungsoptionen hierfür zur Verfügung (Friedman et al., 2018). Im Hinblick auf die teilweise beträchtlichen Nebenwirkungen bei den derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten lohnt es sich, den Fokus der Forschung vermehrt auf die Analyse des adaptiven Immunsystems zu richten, um NASH gezielter behandeln zu können.

---

<sup>42</sup> Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

## 2. Wissenschaftliche Fragestellung

### **2. Wissenschaftliche Fragestellung**

Die Prävalenz von NAFLD in den westlichen Ländern nimmt stetig zu. Insbesondere das fortgeschrittene Stadium von NAFLD, in dem die Leber stark entzündet ist, stellt eine ernstzunehmende gesundheitliche Bedrohung dar, da diese oft die Ursache für die schwerwiegenderen Verläufe Zirrhose und HCC ist (Younossi et al., 2018). Ein Grund, warum es trotz der Vielzahl an potenziellen Therapieansätzen derzeit keine erfolgsversprechende Behandlung für Patienten mit NASH gibt, ist das fehlende Wissen über den genauen Krankheitsverlauf (Friedman et al., 2018). Dies liegt größtenteils daran, dass das adaptive Immunsystem mit NASH bisher nicht in Verbindung gebracht wurde, da davon ausgegangen wurde, dass der Leberschaden nur vom angeborenen Immunsystem verursacht wird. In der vorliegenden Dissertation gilt es herauszufinden, welche Rolle T-Zellen in der Pathophysiologie von NASH spielen. Die Charakterisierung des genauen Phänotyps der T-Zellen soll Hinweise auf eine mögliche Fehlregulation liefern. Im Detail soll es um die Frage gehen, wie die transkriptionelle und metabolische Regulation der Effektorfunktion von T-Zellen im Gewebe von Mäusen unter normaler bzw. fetthaltiger Ernährung abläuft. Ein entscheidender Aspekt wird dabei sein, welche Faktoren in der entzündeten Leber Einfluss auf die Effektorfunktion der T-Zellen und deren Phänotyp haben. Die neuen Erkenntnisse über die Regulation der Effektorfunktion der T-Zellen bei NASH sollen dabei helfen zu klären, wie T-Zellen in einer sterilen Entzündung Leberschäden verursachen können. Es ist bisher nicht geklärt, ob der Leberschaden durch die Aktivierung der T-Zellen über die Erkennung von Autoantigenen in der Leber induziert wird oder die gestresste, entzündliche Umgebung eine antigen-unabhängige Aktivierung bewirkt. Erkenntnisse aus dieser Arbeit könnten bedeutende Einblicke in die allgemeine Regulation von T-Zellen im Gewebe geben und wichtig für neue Behandlungsansätze bei NASH sein.

### 3. Material und Methoden

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Maushaltung

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden bei Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bestellt und im Alter zwischen sechs und zwölf Wochen für die Experimente verwendet. Die Mäuse wurden unter pathogen-freien Hygienebedingungen und nach FELASA<sup>43</sup>-Richtlinien gehalten.

#### 3.1.2 Mauslinien

Mauslinie	Beschreibung	Hersteller
C57BL/6	Wildtyp	Janvier
OT-1	C57BL/6, transgener T-Zellrezeptor spezifisch für Ovalbumin-Antigen SIINFEKL 257-264	Eigene Zucht
OT-1xCD45.1	C57BL/6, exprimiert den kongenen Marker CD45.1, transgener T-Zellrezeptor spezifisch für Ovalbumin-Antigen SIINFEKL 257-264	Eigene Zucht
$\beta_2m^{-/-}$	C57BL/6, Fehlen von MHC Klasse I Molekülen	Prof. Mathias Heikenwälder
keimfrei	C57BL/6, Fehlen von bakteriellen Mikroorganismen	Prof. Dirk Haller
Nur77-GFP <sup>44</sup>	C57BL/6, GFP Expression aktiv unter dem Nur77-Promoter	Prof. Dietmar Zehn

#### 3.1.2.1 Cholindefiziente-hochfettige Diät (CD-HFD<sup>45</sup>)

Im Gegensatz zu einer normalen Diät (ND) wird in der cholindefizienten-hochfettigen Diät (*Research Diets*, #D05010402) der Anteil an Kohlenhydraten und Fetten erhöht, sowie

<sup>43</sup> Engl.: Federation of European Laboratory Animal Science Associations

<sup>44</sup> Engl.: green-fluorescent protein

<sup>45</sup> Engl.: choline-deficient high fat diet



### 3. Material und Methoden

Cholin entfernt. Dies hat zur Folge, dass die Mäuse ein sogenanntes metabolisches Syndrom entwickeln, das sich durch systemisches Übergewicht, Insulin- und Glucosetoleranz auszeichnet. Mit hoher Wahrscheinlichkeit entwickeln diese Mäuse eine Steatose, die unter bestimmten Umständen fibrotisch wird und die Entstehung von HCC begünstigt (Wolf et al., 2014).

#### 3.1.2.2 *Western Diet* (WD-HTF<sup>46</sup>)

Die *Western Diet* enthält neben einem erhöhten Anteil an Fett auch Cholesterol, sowie einen erhöhten Anteil an Fruktose innerhalb der Kohlenhydrate. (*Research Diets*, #D09100301; 40 kcal % Fett, 20 kcal % Fruktose, 2% Cholesterol). Die Symptomatik dieser Diät ähnelt der der CD-HFD mit der Ausnahme, dass die Pathogenese von NAFLD aggressiver und schneller voranschreitet.

#### 3.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
AutoMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
BioPlex Pro II Microplate Wash Station	Bio-Rad, Hercules, USA
Bond Max <sup>®</sup>	Leica, Wetzlar, Deutschland
EasyPet pipet controller	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Amnis <sup>®</sup> ImageStream <sup>®</sup> XMk II	Luminex, Austin, Deutschland
Flüssig-Szintillationszähler (Tri-Carb <sup>®</sup> 4810 TR)	PerkinElmer, Waltham, USA
Immunospots <sup>®</sup> S6 ULTIMATE	CTL, Shaker Heights, USA
Incubator Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Infinite M1 1000 PRO	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
IVIS <sup>®</sup> Lumina	PerkinElmer, Waltham, USA
LightCycler <sup>®</sup> 480 II	Roche, Basel, Schweiz

<sup>46</sup> Engl.: western-style diet with trans fats

### 3. Material und Methoden

Microscope Axio Vert A1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Implen P330 Nanophotometer	SERVA, Heidelberg, Deutschland
PCR Cycler (ProFlex PCR System)	Applied Biosystems, Foster City, CA/USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Perfusionspumpe (Masterflex® L/S® Digital Standard Drive)	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
pH-Meter (inoLab® pH 7110)	WTW (Xylem Analytics), Weilheim
Reflotron Reflovet Plus	Roche, Basel, Schweiz
SCN400®	Leica, Wetzlar, Deutschland
SH800 Sorter	SONY Biotech, Tokyo, Japan
Shaker Max Q400	Thermo Scientific, Waltham, USA
SP8 Lightning	Leica, Wetzlar, Deutschland
SP6800 Spectral Analyzer	SONY Biotech, Tokyo, Japan
Sterile Werkbank Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermostat	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Tischzentrifuge Hereus Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham, USA
Waage	Kern 572, Balingen-Frommingen, Deutschland
xCelligence RTCA Multiplate	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Hermann-Herenz, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Multifuge X3R	Thermo Scientific, Waltham, USA

#### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CellBIND Multiple Well Plate	Corning, New York, USA
12-Kammer Objektträger	Ibidi, Martinried, Deutschland
384-Mikrotiterplatte für qPCR	Roche, Basel, Schweiz
96-Well Mikrotiterplatte (V-Form)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
E-Platte View 96	ACEA Biosciences, San Diego, USA
FACS Röhrchen	Bio-Rad, Hercules, USA

### 3. Material und Methoden

Falconröhrchen (15, 50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kanüle	Braun, Melsungen, Deutschland
MACS Separationssäule	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatten (6, 12, 24, 96 (F, U))	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischale (100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Reflotron ALT-Streifen	Roche, Basel, Schweiz
Seahorse Xf96 96-Well Mikrotiterplatte	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse Xf96 Sensorkartusche	Agilent, Santa Clara, USA
Spritzen (2, 5, 20 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Reservoir	Corning, New York, USA
unbeschichte 24-Well Zellkulturplatte	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen (25, 75, 150cm <sup>2</sup> )	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb (40, 70, 100µm)	Corning, New York, USA

#### 3.1.5 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
FlowJo™	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
IDEAS® Software	Luminex, Austin, USA
Immunospot® Software	CTL, Shaker Heights, USA
LightCycler® 480 Software	Roche, Basel, Schweiz
Living Image Software (IVIS®)	PerkinElmer, Waltham, USA
Magellan™ (Tecan Reader)	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
Imaris software 9.5	Bitplane, Zürich, Schweiz
Tissue IA Image Analysis	Leica, Hamburg, Deutschland
Xcelligence® RTCA Software Pro	ACEA Biosciences, San Diego, USA

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.6 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Deoxyglucose	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
2-NBDG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
A-438079 hydrochloride	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
ACLY Inhibitor	Bio-Techne, Wiesbaden, Deutschland
ACSS2 Inhibitor	Merck, Darmstadt, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Anakardinsäure	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Antimycin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
AS1842856	Merck, Darmstadt, Deutschland
BATPA-AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brefeldin A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BSA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
C <sup>14</sup> -Acetat	PerkinElmer, Waltham, USA
Calcium Sensor Dye eFluor® 514	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
CD8a Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CCCP	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
CFSE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Citrullin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Curcumin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DNase	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Edelfosin	Bio-Techne, Wiesbaden, Deutschland
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

### 3. Material und Methoden

EGTA (C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> )	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
fetales Kälberserum (FCS <sup>47</sup> )	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
Gallein	Bio-Techne, Wiesbaden, Deutschland
Gentamycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gey's Balanced Salzlösung (GBSS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glucose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glucose Monohydrat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hank's balanced Salzlösung (HBSS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heparin-Natrium (5000 I.E./ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Hydrocortison	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Insulin	Novo Nordisk, Kopenhagen, Dänemark
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaliumhydrogenphosphat (NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ketamin (10%)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Kollagen R Lösung 0,2%	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Kollagenase	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, New York, USA
Kollagenase Typ IV	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Alanin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Glutamin 200 mM	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
L-GlutaMinutensäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Glycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Histidin Monohydrochlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

<sup>47</sup> Engl.: fetal calf serum

### 3. Material und Methoden

L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Leucin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Lysin Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Methionin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Ornithin Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Prolin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Serin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Threonin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Valin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Linoleinsäure (C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Lipofectamine <sup>®</sup> 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lipopolysaccharides from E. coli 055:B5	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Luziferin-K-Salz	PJK, Kleinblittersdorf
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Meerrettich Peroxidase markiertes Streptavidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Monensin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mowiol <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium-Acetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium-Butyrat (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COONa)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium-Citrat (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium-Lactat (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium-Propionat (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COONa)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium-Pyruvat (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumhydrogenphosphat (NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

### 3. Material und Methoden

Nycodenz	Axis-Shield Diagnostics, Oslo, Norway
Oleinsäure (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Oligomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
OptimMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ovalbumin 257-264 (SIINFEKL)	Invivogen, San Diego, USA
Ovalbumin 257-264 (SIIQFEKL)	Invivogen, San Diego, USA
Ovalbumin 257-264 (SIITFEKL)	Invivogen, San Diego, USA
Ovalbumin 257-264 (SIIVFEKL)	Invivogen, San Diego, USA
Palmitinsäure (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Pancoll human	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Penicillin/streptomycin 10 000 U/ml	Biochrome GmbH, Berlin, Germany
Percoll®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PMA	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Probenecid	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Radioaktiv-markiertes Acetat	PerkinElmer, Waltham, USA
Retronectin	Takara, Kusatsu, Japan
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rotenon	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Seahorse Kalibrierungslösung	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XF Medium	Agilent, Santa Clara, USA
Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™)	PerkinElmer, Waltham, USA
Tetramethylbenzidine (TMB)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau	Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
UltraComp eBeads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
U0126	Invivogen, San Diego, USA

### 3. Material und Methoden

William's Medium E	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Wortmannin	Invivogen, San Diego, USA
Xylazin Rompun®	Bayer, Leverkusen, Deutschland
β-Mercaptoethanol 50mM	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

#### 3.1.7 Antikörper

Marker	Fluorochrom	Klon	Verd./Konz.	Hersteller
<b>Maus</b>				
CD3	PE-Dazzle, APC	17A2	1:250	Thermo
CD4	BV570, PerCP-Cy5.5	PM4-5	1:250	BioLegend
CD8	PB, eF450, BV510, AF488, PE, PE-Cy7, APC	53-6.7	1:250	BioLegend
CD11a	PE-Cy7	I217	1:250	Thermo
CD25	eF450, PerCP-Cy5.5, APC	PC61.5	1:250	BioLegend
CD28	APC	37.51	1:250	BioLegend
CD44	BV570, BV650, PerCP-Cy5.5, APC	IM7	1:250	BioLegend
CD45.1	eF450, APC	A20	1:250	Thermo
CD49a	APC	HMa1	1:100	Thermo
CD54 (ICAM)	PE	YN1/1.7.4	1:250	Thermo
CD62L	eF450, BV570, FITC <sup>48</sup> , PerCP-Cy5.5, APC	MEL-14	1:250	Thermo
CD69	FITC, PE-Cy7, BV605	H1.2F3	1:250	BioLegend
CD95	PE		1:200	BioLegend
CD107a (LAMP1)	eF450, eF660	eBioD4B	1:250	Thermo
CD122 (IL-2Rb)	PE	5H4	1:100	Thermo
CD127 (IL-7R)	PE	A7R34	1:100	BioLegend

<sup>48</sup> Engl.: Fluorescein isothiocyanate



### 3. Material und Methoden

CD137 (41BB)	FITC	17B5	1:250	Thermo
CD178 (FasL)	APC	MFL3	1:100	BioLegend
CD183 (CXCR3)	PerCP-Cy5.5	CXCR3-173	1:250	Thermo
CD186 (CXCR6)	BV421, FITC, PE, PE-Dazz	SA051D1	1:250	BioLegend
CD223 (LAG3)	PE	eBioC98B7W	1:100	Thermo
CD253 (TRAIL)	PE-Cy7		1:200	BioLegend
CD279 (PD-1)	BV421, PerCP- eF710	29F.1A12	1:250	BioLegend
CD314 (NKG2D)	APC	CX5	1:100	Thermo
CD360 (IL-21R)	APC	4H9	1:100	Thermo
CX3CR1	PE-Cy7, AF647	SA011F11	1:250	BioLegend
NK1.1	BV421	PK136	1:250	BioLegend
P2X7	PE	1F11	1:100	BioLegend
pAkt (S473)	PE-Cy7, APC	SDRNR	1:100	Thermo
pLck (Y505)	PerCP-eF710	SRRCHA	1:100	Thermo
pZAP70	PE	h3kobu5	1:100	Thermo
pERK1/2	FITC	MILAN8R	1:100	Thermo
p-S6	PE-Cy7	cupk43k	1:100	Thermo
Blimp1	PE	5E7	1:100	Thermo
Bcl-6	APC	BCL-DWN	1:100	Thermo
Ki-67	PE	SolA15	1:100	BioLegend
Bcl-2	BV421	100	1:100	Thermo
EOMES	PerCP-eF710	Dan11mag	1:100	Thermo
GzmB	PE	GB11	1:150	Thermo
TOX	PE	TXRX10	1:100	Thermo
T-bet	PE-Cy7	eBio4B10	1:100	Thermo
Tcf7	PE	S33-966	1:100	BD
TNF	FITC, PE-Cy7, APC	MP6-XT22	1:100	Thermo
IFN $\gamma$	PE, APC	XM61.2	1:100	BioLegend
P2X7	APC	1F11	1:100	Thermo
IRF4	PE	3E5	1:100	Thermo
Foxo1	unkonjugiert	C29H4	1:200	Cell Signaling

### 3. Material und Methoden

<b>Human</b>				
CD3	PerCP-Cy5.5	SK7	1:250	BioLegend
CD8	FITC	HIT8a	1:250	Thermo
CD69	PE	FN50	1:250	BioLegend
CD186 (CXCR6)	APC	K041E5	1:100	BioLegend
TNF	eF450, PE-Cy7	Mab11	1:100	Thermo
IFN $\gamma$	eF450, PE	4S.B3	1:100	Thermo
GzmB	PE	GB11	1:150	Thermo
<b>Blockierend</b>				
anti-PD-1		RMP1-14	10 $\mu$ g/ml	BioXcell
anti-LFA-1		M17/4	10 $\mu$ g/ml	BioXcell
anti-MHC I		AF6-88.5.5.3	10 $\mu$ g/ml	BioXcell
anti-CD122		TM- $\beta$ 1	10 $\mu$ g/ml	BioXcell
Anti-CD178		MFL3	10 $\mu$ g/ml	BioXcell
anti-TNFR1		55R-593	10 $\mu$ g/ml	BioLegend
anti-TNFR2		TR75-32.4	10 $\mu$ g/ml	BioLegend
anti-IFN $\gamma$		H22	10 $\mu$ g/ml	BioLegend
<b>Aktivierend</b>				
anti-CD3		17A2		eigene Herstellung
anti-CD28		37.51		Thermo
<b>Sekundär</b>				
goat $\alpha$ -rabbit	AF488	IgG Fab2	1:500	Cell Signaling
goat $\alpha$ -rabbit	AF647	IgG Fab2	1:500	Cell Signaling

#### 3.1.8 Zytokine

<b>Name</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
IL-15	human	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-21	human	Peprotech, Hamburg, Deutschland
TGF $\beta$	human, Maus	Peprotech, Hamburg, Deutschland

### 3. Material und Methoden

IL-15R $\alpha$ /IL-15	Maus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proleukin <sup>®</sup> (IL-2)	human, Maus	Novartis, Basel, Schweiz
TNF	Maus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IFN $\gamma$	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-1 $\beta$	human, Maus	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-6	mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-7	human, mouse	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-21	mouse	Peprotech, Hamburg, Deutschland

#### 3.1.9 Primer

Gen	Spezies	Sequenz (5' -> 3')	Hersteller
GzmB	Maus	fw: ACC CAA AGA CCA AAC GTG CT	Thermo Fisher Scientific
		rev: TGG ACT CAG CTC TAG GGA CG	
TNF	Maus	fw: CGA TGG GTT GTA CCT TGT C	Eurofins
		rev: CGG ACT CCG CAA AGT CTA AG	

#### 3.1.10 Puffer

Name	Inhalt	finale Konz.
PBS	H <sub>2</sub> O	100 %
	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
MACS <sup>49</sup> -Puffer	PBS	100 %
	FCS	1 %
	EDTA	20 mM

<sup>49</sup> Engl.: magnetic activated cell sorting

### 3. Material und Methoden

ACK-Lyse Puffer	H <sub>2</sub> O	100 %
	NH <sub>4</sub> Cl	150 mM
	KHCO <sub>3</sub>	10 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 mM
<b>Hepatozyten-Isolierung</b>		
Puffer A (EGTA-Puffer)	Glukoselösung (9,9 g/L)	5,7 g/L
	KH Puffer	10 % (v/v)
	HEPES Puffer (pH 8,5)	10 % (v/v)
	Aminosäurelösung	15 % (v/v)
	L-Glutamin (200 mM)	0,5 mM
	EGTA (125 mM)	0,5 mM
Puffer B (Kollagenase-Puffer)	Glukoselösung (9,9 g/L)	5,7 g/L
	KH Puffer	10 % (v/v)
	HEPES Puffer (pH 8,5)	10 % (v/v)
	Aminosäurelösung	12 % (v/v)
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (130 mM)	2 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (130 mM)	3,5 mM
	L-Glutamin (200 mM)	0,5 mM
	Kollagenase NB 4G	0,46 mg/ml
Puffer C (Suspension-Puffer)	Glukoselösung (9,9 g/L)	5,7 g/L
	KH Puffer	10 % (v/v)
	HEPES Puffer (pH 7,6)	10 % (v/v)
	Aminosäurelösung	12 % (v/v)
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (130 mM)	1,1 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (100 mM)	0,41 mM
	BSA	0,17 % (w/v)

#### 3.1.11 Zellkulturmedien

Name	Inhalt	Finale Konz.
T-Zellmedium	RPMI 1640	100 %

### 3. Material und Methoden

	FCS	10 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	100 U/ml
	L-Glutamin	2 mM
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM
Hepatozytenmedium	William's Medium E (ohne Glc, Gln)	100 %
	L-Glutamin	2 mM
	Glukoselösung	0,5 g/L
	HEPES Puffer (pH 7.4)	20 mM
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	50 U/ml
	Gentamycin	89 µg/ml
	Hydrokortison	5,6 µg/ml
	Insulin	23 I.E/L
	DMSO	1,6 %

#### 3.1.12 Kits

Bezeichnung	Zweck	Hersteller
NucleoSpin® RNA XS	RNA-Isolierung	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SensiFAST® cDNA <sup>50</sup> Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Bioline,
Acetate Colorimetric Assay Kit	Bestimmung von Acetat-Konzentration	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
HAT <sup>51</sup> Activity Colorimetric Assay Kit	Bestimmung der HAT-Aktivität	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Färbung nukleärer Proteine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
StayBrite® Highly Stable ATP Bioluminescence Assay Kit	ATP-Konzentration	BioVision, Milpitas, USA

<sup>50</sup> Engl.: complementary DNA

<sup>51</sup> Engl.: Histone acetyl transferase

### 3. Material und Methoden

#### 3.2 Methoden

##### 3.2.1 Isolation primärer Zellen aus der Maus

Für die Aufreinigung primärer Zellen wurden Tiere im Alter von 6 - 16 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation mit vorheriger Isofluran-Narkotisierung getötet. Nach oberflächlicher Säuberung der Mäuse mit Ethanol (70 %) wurden die inneren Organe der Mäuse freigelegt und die entsprechenden Organe entnommen.

##### 3.2.1.1 Isolation von primären Zellen durch magnetische Separation (MACS)

Primäre murine Zellen wurden in einem definierten Volumen an MACS-Puffer ( $1 \times 10^7$  Zellen in  $40 \mu\text{l}^{52}$  MACS-Puffer) aufgenommen, mit der entsprechenden Menge an paramagnetischen MACS-Partikel (positive Selektion  $\text{CD8}^+$  T-Zellen:  $10 \mu\text{l}$  MACS-Partikel mit  $40 \mu\text{l}$  Zellsuspension) zusammengebracht und für 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden nicht-gebundene MACS-Partikel durch Waschen der Zell-Partikel-Suspension (5 min, 480 g) entfernt und durch einen Nylonsieb gefiltert. Mit dem Programm „POSSEL“ im AutoMACS konnten  $\text{CD8}^+$  T-Zellen positiv selektiert werden.

##### 3.2.1.2 Isolation von primären Zellen durch FACS<sup>53</sup>-basierten Sortieren

Die FACS-basierte Isolation von primären Zellen erfolgte mit dem SH800 (Sony). Im ersten Schritt wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt, um die Populationen zu markieren, die sortiert werden sollten. Nach erfolgreicher Kalibrierung des Geräts konnten die Populationen ausgewählt werden und bei normaler Reinheit und Druck von „5“ effizient gefiltert werden.

---

<sup>52</sup> Microliter

<sup>53</sup> Engl.: Fluorescence activated cell sorting

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.1.3 Isolation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz

Zur Isolierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz wurden CD45.1 C57Bl/6 (Wildtyp = WT), CD45.1 OT-1 oder CD90.1 OT-1 Mäuse verwendet. Im Vergleich zu WT Mäusen besitzen OT-1 Mäuse einen transgenen T-Zellrezeptor, der spezifisch für das Ovalbumin-Antigen SIINFEKL ist. Nach Entnahme der Milz aus der Maus wurde diese mit einem Spritzenstempel durch ein Metallsieb mit der Porengröße von 100 µM in ein 50 ml Falconröhrchen gedrückt. Die Gewebesuspension wurde auf 40 ml mit PBS<sup>54</sup> aufgefüllt und für 5 Minuten bei 480 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden die Erythrozyten mit einer ACK-Lyse für 2 Minuten eliminiert. Nachdem die Zellsuspension mit PBS auf 40 ml aufgefüllt worden war, wurde wieder bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Große Gewebestücke wurde mit einer Nylonwolle, deren Poren 100 µM groß sind, gefiltert. Danach wurden die Zellen mit 40 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert. Abschließend wurde die Zellzahl bestimmt, um mit der positiven Selektion auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen fortzufahren (MACS Aufreinigung).

#### 3.2.1.4 Isolation von Lymphozyten aus der Leber

Für die Entfernung der Zellen aus dem Blutkreislauf der Leber wurde eine Kanüle in die Pfortader eingeführt und gleichzeitig die *Vena cava* durchtrennt. Eine Pumpe spülte solange PBS mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/min in die Leber, bis das Blut entfernt wurde und sich die Leber hellbraun färbte. Im nächsten Schritt wurde die Gallenblase entfernt. Mit einem Spritzenstempel wurde die Leber durch einen Metallsieb in ein Falconröhrchen gedrückt, auf 40 ml mit PBS aufgefüllt und für 5 Minuten bei 480 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 8 ml einer GBSS<sup>55</sup> + Collagenase IV (1:400) Lösung resuspendiert und für 15 Minuten bei 37 °C schüttelnd (240 rpm<sup>56</sup>) verdaut. Danach wurde wieder 40 ml PBS zum Zellpellet hinzugefügt und für 5 Minuten bei 480 g zentrifugiert. Mit einer Dichtegradientenzentrifugation (3.2.1.11) wurden die Lymphozyten von

---

<sup>54</sup> Engl.: Phosphate buffered saline

<sup>55</sup> Engl.: Gey's balanced salt solution

<sup>56</sup> Engl.: rounds per minute

### 3. Material und Methoden

anderen Zellbestandteilen aus der Leber separiert. Dafür wurde das Zellpellet in 3 ml einer 40 %-iger Percoll-Lösung aufgenommen und vorsichtig auf 3 ml einer 80 %-iger Percoll-Lösung in einem 15 ml Falconröhrchen geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 1440 g (Beschleunigung 7, Bremse 1) für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Im Anschluss konnte die Schicht mit den Lymphozyten, die sich zwischen den beiden Phasen befand, entnommen werden.

#### 3.2.1.5 Isolation von Lymphozyten aus der Lunge

Nach dem Entfernen der Lunge aus der Maus wurde in beide Lungenflügel 1 ml einer Kollagenase-/DNase-Lösung (1 mg/ml Kollagenase IV und 50 U/ml DNase in PBS) gespritzt. Die Lungenflügel befanden sich in einer Vertiefung einer 24-Mikrotiterplatte und wurden in dieser Lösung für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden die Lungenflügel mit einer Pinzette auseinandergerissen. Mit einer Pipette, die für 1 ml Volumen geeignet ist, wurde die Luft im Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren freigesetzt. Im Anschluss wurde die Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und alle 5 Minuten durchmischt. Im letzten Schritt wurde die Gewebesuspension durch einen Metallsieb gedrückt und eine Dichtegradientenzentrifugation (3.2.1.11) durchgeführt, um die Lymphozyten spezifisch zu isolieren.

#### 3.2.1.6 Isolation von Lymphozyten aus der Haut

Beide Ohren der Maus wurden auf Höhe des Gehörgangs mit einer scharfen Schere entfernt und mit zwei Pinzetten die dorsale von der ventralen Hälfte getrennt. Beide Hälften wurden mit einer Schere in kleinere Stücke geschnitten und mit 3 ml einer Kollagenase-/DNase-Lösung (2 mg/ml Kollagenase IV und 50 U/ml DNase in PBS) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde der Verdau der Haut überprüft und bei unvollständigem Verdau für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension durch ein Metallsieb gedrückt und mit PBS+10 % FCS gewaschen (5 min, 480 g).



### 3. Material und Methoden

Danach wurden die Zellen im FACS-Puffer aufgenommen und für weitere Analysen verwendet.

#### 3.2.1.7 Isolation von Lymphozyten aus dem Darm

Bevor der Darm entfernt wurde, wurde er vorsichtig entwunden. Der Dünndarm wurde unterhalb des Magens sowie oberhalb vom Blinddarm abgetrennt. Fettgewebe und Pankreas wurden entfernt. Der Darm wurde in etwa 3-4 gleich große Stücke geteilt. Mit einer Pipettenspitze, die für ein Volumen von 1 ml geeignet ist, wurde der Inhalt des Dünndarms vorsichtig hinausgedrückt. Der leere Darm wurde danach mit PBS gespült und mit einer Schere längs aufgeschnitten. Anschließend wurde der Darm in 0,5 - 1 cm große Stücke geschnitten, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, mit 40 ml PBS befüllt und anschließend zentrifugiert (5 min, 480 g). Das Zellpellet wurde mit 20 ml Verdauopuffer (1xHBSS<sup>57</sup> mit Calcium und Magnesium, 10 mM EDTA, 5 % FCS) resuspendiert und für 20 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Falconröhrchen für 10 Sekunden mit einem Vortexer kräftig geschüttelt. Gewebestücke wurden durch einen Metallsieb gefiltert. Durchfluss, der die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) beinhaltete, wurde auf Eis gelagert, während die restlichen Gewebestücke nochmals für 20 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler verdaut wurden. Nach dem zweiten Verdau wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 480 g) und die IEL mittels Dichtegradientenzentrifugation (3.2.1.11) von den anderen Zellen getrennt.

#### 3.2.1.8 Isolation von Lymphozyten aus der Niere

Nach dem Entfernen beider Nieren aus der Maus wurde zuerst die Nierenkapsel mit zwei dünnen Pinzetten entfernt. 1 ml einer Kollagenase-/DNAse-Lösung (1 mg/ml Kollagenase IV und 50 U/ml DNAse in PBS) wurde jeweils in eine Niere gespritzt. Mit einer Schere wurden die Nieren in grobe Stücke zerteilt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde mit einem Spritzenstempel die großen Nierenstücke zerdrückt und für weitere 30

---

<sup>57</sup> Engl.: Hank's balanced salt solution

### 3. Material und Methoden

Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension durch einen Metallsieb gedrückt, mit 30 ml PBS aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 480 g). Mit der Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.2.1.3) wurden die Lymphozyten von anderen Zellen separiert und konnten anschließend für weitere Analysen verwendet werden.

#### 3.2.1.9 Isolation von primären Hepatozyten

5-15 Minuten vor dem Start der Isolierung der Hepatozyten wurde den Mäusen i.p.<sup>58</sup> 150 µl Heparin (10000 U/5 ml in einer Kochsalzlösung gelöst) gespritzt und daraufhin i.p. mit 150 µl einer Ketamin (5 % der Ausgangskonzentration) -Xylazin (20 mg/ml Ausgangskonzentration) -Lösung (Verhältnis 3:1) narkotisiert. Sobald die Reflexe ausblieben, wurde der Bauchraum der Maus fachmännisch freigelegt. Über die Portalvene wurde zuerst Puffer A für 8 Minuten in die Leber gepumpt, während die *Vena cava* durchtrennt wurde. Anschließend wurde Puffer B (40 ml) solange in die Leber gespült, bis die gesamte Lösung durchgelaufen war. Nach der Resektion der Leber, bei der die Gallenblase entfernt wurde, wurde die Leber durch ein Metallsieb mit einem Spritzenstempel in ein 50 ml Falconröhrchen gedrückt. Danach wurde auf 50 ml mit Puffer C aufgefüllt und für zwei Minuten bei 50 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Durch das Filtern der Suspension von Hepatozyten mit einem Zellsieb (100 µm<sup>59</sup>), konnten große Gewebestücke entfernt werden. Die Auftrennung der toten von den lebenden Hepatozyten erfolgte mit der Dichtegradientenzentrifugation. Das Pellet der Hepatozyten wurde mit 5 ml einer Percoll/PBS-Lösung (1:10) aufgenommen, die auf 5,5 ml einer 80 %-igen Percoll-Lösung geschichtet wurde. Die Zentrifugation erfolgte bei 600 g und 20 Minuten (Beschleunigung: 7, Bremse: 1). Nach Beseitigung der toten Zellen in der obersten Schicht wurde der Rest mit Puffer C aufgenommen und für 2 Minuten bei 50 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Das Zellpellet wurde mit 3 - 5 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und gezählt.

---

<sup>58</sup> intraperitoneal

<sup>59</sup> Micrometer

### 3. Material und Methoden

Für die Kultivierung der Zellen in einer 96-Well Mikrotiterplatte wurde die Platte vorher für 30 Minuten mit einer Kollagenlösung (*CollagenR*<sup>®</sup>-Lösung mit H<sub>2</sub>O, 1:10) beschichtet, um die Adhärenz der Hepatozyten auf der Mikrotiterplatte zu verbessern. Die Hepatozyten wurden im *Attachment*-Medium resuspendiert ( $1 \times 10^5$ /ml) und  $1 \times 10^4$  Zellen wurden in jede Vertiefung der Platte pipettiert.

#### 3.2.1.10 Isolation humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut

Die Gewinnung mononukleärer Zellen (PBMC<sup>60</sup>) fand aus dem Blut freiwilliger Spender statt. Dafür wurde 20 ml heparinisiertes, peripher-venöses Blut verwendet. Die Ethikkommission genehmigte die Blutabnahme von freiwilligen Spendern. Das Vollblut (12,5 - 15 ml) wurde mit vorgewärmtem PBS im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmäßig auf sterile 50 ml Falconröhrchen verteilt. Zehn Milliliter Pancoll (hydrophiles Polysaccharid) wurde unter das Blut-PBS Gemisch geschichtet. Nach der Zentrifugation (2200 rpm, 25 min, Beschleunigung 7, Bremse 1, RT) wurde die weiße Schicht, die die PBMCs enthielt, vorsichtig abgenommen, mit PBS auf 40 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Danach wurden die Zellen gezählt, in entsprechendem MACS-Puffer aufgenommen und mit der passenden Anzahl an MACS-Partikeln für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Aufreinigung mit dem AutoMACS konnten die humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

#### 3.2.1.11 Separation von vitalen Lymphozyten aus Zellsuspensionen

Die Präparation vitaler Lymphozyten von einer Zelldifferenzierungskultur *in vitro* erfolgte durch Resuspendieren des Zellpellets in 10 ml PBS. Die Zellsuspension wurde mit 2 ml Pancoll unterschichtet und mit einem spezifischen Programm (1440 g, 20 min, Beschleunigung 7, Bremse 1, 20 °C) zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen, mit PBS auf 40 ml aufgefüllt und abschließend zentrifugiert (480 g, 5 min).

---

<sup>60</sup> Engl.: *peripheral blood mononuclear cells*

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.1.12 Bestimmung von Zellzahlen

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Dafür wurde die Zellsuspension je nach Konzentration in einem Verhältnis von 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung gemischt und 10 µl davon in die Zählkammer pipettiert. Lebende Zellen, die nicht blau angefärbt waren, wurde in allen vier großen Eckquadraten gezählt. Die Zellzahl ergab sich durch folgende Formel:

$$GZ \left[ \frac{1}{ml} \right] = \frac{LZ}{4} \times VF \times 10^4 [KF]$$

GZ=Gesamtzahl, LZ=gezählte lebende Zellen, VF=Verdünnungsfaktor, KF=Kammerfaktor

#### 3.2.1.13 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter folgenden Bedingungen gehalten: 37 °C, relative Luftfeuchtigkeit 90 %, CO<sub>2</sub> – Gehalt 5 %.

### 3.2.2 CD8<sup>+</sup> T-Zelldifferenzierung

#### 3.2.2.1 Differenzierung zu SIINFEKL-spezifischen Effektor OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Nachdem die Splenozyten aus dem Organ aufbereitet worden waren, wurden sie (1x10<sup>7</sup> Splenozyten/ml) in Zellkulturflaschen mit 200 µg/ml OVA, 1000 U/ml IL-2 und 100 ng/ml LPS<sup>61</sup> für vier Tage bei 37 °C kultiviert. Bei gelblicher Färbung des Mediums wurde an Tag zwei dieselbe Menge an frischem Medium und 1000 U/ml IL-2 hinzugegeben. An Tag vier erfolgte die Separation der vitalen Effektor OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (3.2.1.11). Danach wurden die Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen für 24 Stunden kultiviert und anschließend für verschiedene Analysen verwendet.

---

<sup>61</sup> Lipopolysaccharid

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.2.2 Differenzierung zu CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen

Zur Generierung von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz (siehe 3.2.1.3) aufgereinigt und  $1 \times 10^6$  Zellen ( $1 \times 10^6/1$  ml) wurden in jede Vertiefung einer 24-Well-Mikrotiterplatte verteilt. Die Platte wurde vorher für zwei Stunden mit Antikörpern gegen CD3 (5 µg/ml) und CD28 (5 µg/ml) beschichtet. Zusätzlich wurde IL-2 (300 U/ml) in das Medium pipettiert. Nach Tag 2 konnten die T-Zellen von der Platte abgelöst und für weitere Analysen verwendet werden.

#### 3.2.2.3 Differenzierung zu geweberesidenten CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen

$1 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^6/1$  ml) aus der Milz wurden zu CD3- (2 µg/ml) beschichteten 24-Well-Mikrotiterplatten hinzugefügt und für zwei Tage zusammen mit 100 U/ml IL-2 bei 37 °C aktiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen vom Stimulus abgelöst, vereinigt und bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml entweder in einer 6-Well -Mikrotiterplatte oder in einer Petrischale (150 mm x 15 mm) für zwei bis drei Tage zusammen mit TGFβ (5 ng/ml) kultiviert. Danach wurden die vitalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Hinzugabe von IL-15Rα/IL-15 (10 ng/ml) sorgte für die Ausprägung eines Phänotyps, der dem gewebe-residenten CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen ähnelte.

### 3.2.3 Immunologische Methoden

#### 3.2.3.1 Durchflusszytometrie (FACS<sup>62</sup>)

Die Durchflusszytometrie ist eine essentielle Methode Immunzellen zu charakterisieren (Vembadi et al., 2019). Durch hydrodynamische Fokussierung werden Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Über unterschiedliche Fluorochrome, die an Antikörpern gekoppelt sind und an spezifische Strukturen binden, wird Licht emittiert, das durch bestimmte Detektoren erfasst werden kann.

---

<sup>62</sup> Engl.: fluorescence activated cell sorting

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.3.1.1 Oberflächenfärbung

Für die Färbung von Strukturen auf der Oberfläche, wurden die zu analysierenden Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten mit V-Boden transferiert und zentrifugiert (500 g, 2 min, 4 °C). Überstand wurde abgeworfen und Zellpellet mit 150 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach der Zentrifugation wurde der Schritt nochmals wiederholt. Danach wurden die Zellen mit 50 µl einer Lösung, die die entsprechenden Farbstoff-gekoppelten Antikörpern beinhaltet, resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden danach nochmals zweimal mit FACS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert, bis sie entweder direkt analysiert oder für die Färbung intrazellulärer Antigene fixiert wurden.

#### 3.2.3.1.2 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung für fünf Stunden mit Brefeldin (1000X) und Monensin (1000X) sowie mit PMA<sup>63</sup> (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) aktiviert. Nach der Oberflächenfärbung wurden die gefärbten Zellen mit 70 µl vom „IC Fixation Buffer“ (Thermo Fisher) für mindestens 30 Minuten bei RT fixiert. Für die Färbung von nukleären Bestandteilen wurden die Zellen nicht restimuliert und wurden nach der Oberflächenfärbung mit 70 µl Fixierungslösung aus dem „Foxp3<sup>64</sup>/ transcriptions factor staining kit“ (Thermo Fisher) für mindestens 30 Minuten bei RT fixiert. Anschließend erfolgte für beide Färbeprotokolle die Permeabilisierung der Zellen. Die Zellen wurden mit 100µl des Permeabilisierungspuffers aus dem „Foxp3/ transcriptions factor staining kit“ (Thermo Fisher) durchmischt und zentrifugiert (500 g, 2 min, 4 °C). Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Zellpellet nochmals mit 100 µl des Puffers resuspendiert und zentrifugiert (500 g, 2 min, 4 °C). Mit 50 µl einer Lösung, die mit Farbstoff-gekoppelten Antikörpern im

---

<sup>63</sup> Engl.: phorbol 12-myristate 13-acetate

<sup>64</sup> Engl.: Forkhead-Box-Protein P3

### 3. Material und Methoden

Permeabilisierungspuffers vermischt war, wurde das Zellpellet resuspendiert und für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C gefärbt. Bei Färbungen mit primären Antikörpern, die nicht mit einem Farbstoff gekoppelt waren, folgte die Färbung mit sekundären Antikörpern. Sie sind mit einem Farbstoff konjugiert und erkennen das Antigen des primären Antikörpers. Die Zellen wurden mit 50 µl dieser Lösung resuspendiert und für mindestens eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend konnten die Zellen nach zweimaligem Resuspendieren mit FACS-Puffer und Zentrifugieren analysiert werden.

#### 3.2.3.1.3 Färbung von phosphorylierten Proteinen

Im Vergleich zur Färbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen für die Färbung von phosphorylierten Proteinen mit eiskaltem Methanol (100 %) für eine Stunde bei 4 °C fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Nach dem Resuspendieren mit FACS-Puffer und der Zentrifugation, erfolgte die Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die gegen die phosphorylierten Proteine gerichtet waren, im FACS-Puffer für 30 Minuten bei 4 °C.

#### 3.2.3.2 Konfokale Mikroskopie

Sterile unbeschichtete Objektträger, die in 12 Kammern aufgeteilt waren, wurden mit einer Kollagenlösung (3.2.1.9) für 30 Minuten bei RT beschichtet und anschließend zweimal mit sterilem Wasser gewaschen.  $2 \times 10^4$  Hepatozyten ( $1 \times 10^5$ /ml) wurden ausgesät und am darauffolgenden Tag mit  $1 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup>T-Zellen kokultiviert. Nach Beendigung des Experiments wurden 100 µl abgenommen und die Zellen mit 200 µl einer 4 %-igen PFA<sup>65</sup>-Lösung für eine Stunde bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen, indem beim Abnehmen des Überstands 100 µl Volumen in der Kammer zurückgelassen wurde. 150 µl einer Lösung mit Antikörpern, die gegen ICAM (1:200) und CD3 (1:200) gerichtet und mit den Fluorochromen PE<sup>66</sup> bzw. AlexaFluor 488

---

<sup>65</sup> Paraformaldehyd

<sup>66</sup> Phycoerythrin

### 3. Material und Methoden

gekoppelt waren, und mit DAPI (1:2000) wurde jeweils in die Kammern pipettiert und für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Kammern zweimal mit PBS gewaschen worden waren (s.o.) und die Silikonkammern abgenommen worden waren, wurden die fixierten und gefärbten Zellen mit Mowiol überschichtet, damit die Zellen nicht dehydrierten und vor dem Deckglas geschützt waren.

#### 3.2.3.3 Bildgebende Durchflusszytometrie – Imagestream®

Die bildgebende Durchflusszytometrie stellt eine Kombination aus Mikroskopie und Durchflusszytometrie dar, die es erlaubt, auf Einzelzellebene die Lokalisation bestimmter Proteine oder Strukturen zu ermitteln (Zuba-Surma et al., 2007). Für die Analyse der Lokalisation von FOXO1 und dessen Menge im Zellkern von Lymphozyten, die aus der Leber und Milz aufgereinigt worden sind, wurden Oberflächenrezeptoren (CD44, CD62L, CXCR6, CD8) sowie nukleäres FOXO1 gefärbt. Durch die oben genannten Oberflächenproteine wurden bestimmte Populationen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen markiert und durch das überlagernde Signal von FOXO1 mit dem DNA-Farbstoff (Propidiumiodid) konnte FOXO1 dem Zellkern in den mikroskopischen Bildern zugeordnet werden. Durch die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität war es möglich, die Menge von FOXO1 im Zellkern in der jeweiligen Population zu bestimmen.

#### 3.2.3.4 Retrovirale Transduktion von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Für die retrovirale Transduktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einem Konstrukt, das FOXO1 überexprimiert, wurden PlatE<sup>67</sup> Zellen mit einem Plasmid pMP71 transfiziert, das für FOXO1 und GFP codiert. Für die Transfektion wurden PlatE Zellen in Poly-L-lysine (1:20 in PBS, 1 h, 37 °C) beschichteten 6-Well-Mikrotiterplatten so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion 70 bis 80 % konfluent waren. 4 µg Plasmid DNA und 5 µl Lipofectamine 2000 wurden jeweils mit 250 µl OptiMEM (RT) vermischt, für 5 Minuten bei RT inkubiert, danach vereinigt und nochmals für 30 Minuten inkubiert. 500 µl an Zellkulturmedium wurde

---

<sup>67</sup> PlatinumE



### 3. Material und Methoden

mit 500 µl der DNA-/Lipofectamine-Lösung vermischt und nach sechs Stunden Inkubation mit 2 ml T-Zellmedium ausgetauscht. Am Tag zwei nach Transfektion wurden unbeschichtete 24-Well-Mikrotiterplatten mit 500 µl Retronectin (1:50 in PBS) für zwei Stunden bei RT bedeckt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Platten mit 1 ml des retroviralen Überstandes (mit frischem T-Zellmedium ausgetauscht) für zwei Stunden bei 32 °C (1000 g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde 1 ml an aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (1x10<sup>6</sup>) zum retroviralen Überstand hinzugefügt und nochmals für zehn Minuten bei 32 °C (1000 g) zentrifugiert (siehe 3.2.2.2). Dieser Vorgang wurde am nächsten Tag wiederholt. Am Tag vier konnte der Erfolg der Transduktion mittels Durchflusszytometrie anhand GFP<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden. Effekte der Überexpression von FOXO1 auf die zu analysierenden Parameter in CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mit GFP<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen verglichen, die mit einem irrelevantem Plasmid transduziert worden sind.

#### 3.2.3.5 Immunhistochemie (IHC)

Lebergewebe wurde mit Paraformaldehyd (4 %) fixiert und mit Hilfe von Olga Seelbach in Paraffin eingebettet. 2 µm dünne Schnitte von Formalin-fixierten, in Paraffin eingelegten Proben oder konservierten Kryoschnitten wurden mit Hematoxylin/Eosin oder mit spezifischen Antikörpern im Bond Max<sup>®</sup> (Leica) gefärbt. Schnitte wurden mit einem speziellen Scanner SCN400<sup>®</sup> (Leica) visualisiert und entweder mit der „Tissue IA Image Analysis“ Software oder mit ImageJ<sup>®</sup> analysiert. *NAFLD Activity Score* (NAS) wurde anhand von charakteristischen Strukturen ermittelt und nochmals von einer unabhängigen Person mit Fachwissen überprüft.

#### 3.2.3.6 Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Für die Detektion von Zytokinen und Chemokinen im Serum von ND und CD-HFD Mäusen oder in Zellkulturüberständen von *in vitro* differenzierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden Antikörper für das jeweilige Antigen in PBS gelöst (1 µg/ml). 100 µl dieser Lösung wurden in jede Vertiefung einer unbeschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt und über Nacht

### 3. Material und Methoden

bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und mit einem Gerät, das automatisiert 96-Well-Mikrotiterplatten (BioPlex Pro II) wäscht, dreimal gewaschen. Anschließend wurde 100 µl einer Lösung (1 % BSA<sup>68</sup> in PBS) zum Blocken unspezifischer Bindungen in jede Vertiefung pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation von 100 µl des Standards und der Proben für mindestens zwei Stunden bei RT. Je nach zu messendem Zytokin oder Chemokin wurde der Standard bei 120 ng/ml (0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA in PBS) als höchste Konzentration angesetzt und in konstanten Abständen verdünnt. Nach der Inkubation und dem Waschvorgang wurden 100 µl biotinylierte Antikörper (0,5 µg/ml), die gegen das entsprechende zu detektierende Antigen gerichtet sind, in jede Vertiefung pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte gewaschen, mit 100 µl eines Avidin-HRP<sup>69</sup> (Meerrettich-Peroxidase) Konjugats beladen und für 30 Minuten bei RT gelagert. Nachdem die Platte dreimal gewaschen worden war, wurde 100 µl einer Substratlösung (TMB<sup>70</sup>) in jede Vertiefung verteilt und solange bei RT inkubiert, bis sich ein deutlicher Farbumschlag zu blau abzeichnete. Schließlich wurde die enzymatische Reaktion mit einer Schwefelsäurelösung (1,8 %) gestoppt und die Platte konnte bei einer Absorption von 450 nm gemessen werden.

#### 3.2.3.7 Fluorescent-linked Immunospot Assay (FluoroSpot)

Der FluoroSpot ist eine Modifikation des ELISpots (Enzyme Linked Immuno Spot Assay), der statt einer enzymatischen Reaktion eines Substrats, Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet, die TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  detektieren können (Ahlborg & Axelsson, 2012). Der Vorteil gegenüber dem ELISA ist die Quantifizierung von Zellen, die die Zytokine sezernieren. Dafür wird die Membran einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit Antikörpern, die gegen TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  gerichtet sind, über Nacht bei 4 °C beschichtet. Um die Membran für die Beschichtung vorzubereiten, wurde die Platte mit 15 µl einer 80 %-igen Ethanol-Lösung aktiviert und danach mit 200 µl PBS dreimal gründlich gewaschen. Am nächsten

---

<sup>68</sup> Engl.: Bovine serum albumin

<sup>69</sup> Engl.: Horse-radish peroxidase

<sup>70</sup> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

### 3. Material und Methoden

Tag wurde die Antikörperlösung dekantiert und einmal mit 150 µl PBS pro Vertiefung gewaschen. 200 µl von  $5 \times 10^4$  *in vitro* differenzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde in jede Vertiefung pipettiert und für 24 Stunden inkubiert. Die Stimulation mit 1 nM SIINFEKL für die positive Kontrolle erfolgte für die letzten zwei Stunden. In einigen Bedingungen wurden die Zellen nach 23 Stunden für eine Stunde mit ATP (200 µM) oder NAD (10 µM) versetzt. Nach der Inkubationsphase wurde die Platte jeweils zweimal mit 200 µl PBS und 200 µl 0,05 % Tween-PBS gewaschen. Mit 80 µl einer Lösung von Antikörpern, die gegen IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  gerichtet und mit FITC bzw. Biotin konjugiert waren, wurden die Zytokine im Komplex mit den membrangebundenen Antikörpern detektiert. Nachdem die Platte für zwei Stunden bei RT inkubiert worden war, wurde die Platte dreimal mit 200 µl 0,05 % Tween-PBS gewaschen. Die Platte wurde mit 80 µl einer tertiären Lösung, die Antikörper beinhaltete, die jeweils mit AlexaFluor 488 (bindet an FITC) oder mit CTL-Red (bindet an Biotin) konjugiert waren, versetzt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Damit wurden die Zellen, die Zytokine sezernierten, visualisiert. Im letzten Schritt wurde die Platte mit 150 µl destilliertem Wasser dreimal gewaschen und über Nacht mit der offenen Seite auf Papiertüchern zum Trocknen gelegt. Die Auswertung des Fluorospots erfolgte mithilfe des Immunospots<sup>®</sup> S6 ULTIMATE Analyzers und der Immunospot<sup>®</sup> Software.

#### 3.2.4 Molekularbiologische Methoden

##### 3.2.4.1 RNA Isolierung und quantitative real-time PCR (qPCR)

Die RNA aus T-Zellen wurde mit dem NucleoSpin RNA XS Kit (Macherey Nagel) nach Protokoll des Herstellers isoliert. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde mit Hilfe des Nanophotometers (Implen) ermittelt. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit dem SensiFAST™ cDNA Synthese Kit (Bioline) nach Protokoll des Herstellers. Für die qPCR<sup>71</sup> wurden die DNA-Proben zusammen mit 2x Takyon Mix SYBR Assay (Eurogentec) und den entsprechenden Primern (Eurofins) auf einer 384-Well-Mikrotiterplatte verteilt und mit dem LightCycler 480 (Roche) gemessen.

---

<sup>71</sup> Engl.: quantitative polymerase chain reaction

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.5 Metabolische Methoden

##### 3.2.5.1 Analyse des Metabolismus der T-Zellen mittels Seahorse XF Bioanalyser

Der Seahorse XF Bioanalyser erlaubt es mithilfe der Sensoren für Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Protonen (H<sup>+</sup>), den Sauerstoffverbrauch (OCR<sup>72</sup>) bzw. die Ansäuerung des Mediums (ECAR<sup>73</sup>) zu messen (Pike Winer & Wu, 2014). Sauerstoffverbrauch ist ein Indikator für mitochondriale Atmung, während Unterschiede im pH-Wert Rückschlüsse auf die Aktivität der Glykolyse erlauben. In Kombination mit pharmakologischen Inhibitoren, die spezifisch einzelne Abschnitte in der Glykolyse oder in der mitochondrialen Atmung blockieren, entsteht ein genaues metabolisches Bild der Zelle.

##### 3.2.5.2 Acetat-Konzentration in der Leber

Die Acetat-Konzentration in der Leber wurde mithilfe des „Acetate Colorimetric Assay Kit“ (Sigma-Aldrich) nach dem Protokoll des Herstellers ermittelt. Die Messung beruht auf einer enzymatischen Umsetzung eines Substrats, dessen Menge proportional zur Acetat-Konzentration ist.

##### 3.2.5.3 Acetataufnahme

1x10<sup>6</sup> *in vitro* differenzierte CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 15 Minuten in 1,5 ml Eppendorfgefäße mit C<sup>14</sup>-markierten Acetat (PerkinElmer) bei 37 °C inkubiert. Als Stammlösung wurde C<sup>14</sup>-markiertes Acetat (1 mCi<sup>74</sup>=37 MBq<sup>75</sup>) mit 1ml Ethanol vermischt (51,6 mCi (=1,909 GBq) pro mmol Acetat). Für die Messungen wurde die Stammlösung in Ethanol (1:10) verdünnt und für jede Probe (100 µl) wurden je 1 µl der verdünnten Lösung eingesetzt (entspricht 0,1 µCi=3.7 kBq). Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 480 g), Überstand verworfen und mit 1,5 ml PBS resuspendiert. Nach der erneuten

---

<sup>72</sup> Engl.: oxygen consumption rate

<sup>73</sup> Engl.: extracellular acidification rate

<sup>74</sup> Millicurie

<sup>75</sup> Megabecquerel

### 3. Material und Methoden

Zentrifugation (5 min, 480 g) und dem Verwerfen des Überstandes, wurden die Zellen mit 0,1 % SDS<sup>76</sup> lysiert. 100 µl der lysierten Zellen wurden mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™, PerkinElmer) vermischt und β-Radioaktivität wurde mit einem Flüssig-Szintillationszähler (Tri-Carb® 4810 TR, PerkinElmer) gemessen.

#### 3.2.5.4 Histon-Acetyltransferasen-Aktivität

Die Aktivität der Histon-Acetyltransferasen (Y. Chen et al.) in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* wurde mit dem Kit „HAT Activity Fluorometric Assay Kit“ (BioVision) nach dem Protokoll des Herstellers gemessen. Bei dieser Methode katalysieren HAT Enzyme den Transfer der Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf Histonpeptiden, sodass als Reaktion acetylierte Peptide und Koenzym A (CoA) entstehen. Koenzym A reagiert im Gemisch mit einer speziellen Entwicklerlösung, das über eine Fluoreszenz bei 535/587 nm (Anregung/Emission) detektiert werden kann.

#### 3.2.6 Funktionelle Analysen

##### 3.2.6.1 Zytotoxizitätsassays

###### 3.2.6.1.1 xCelligence®

Bei dieser Methode wurde die Vitalität der zu analysierenden Zellen über Impedanz gemessen. Adhärente Zellen fungieren als nichtleitende Körper, die den elektronischen Fluss in der 96-Well-Mikrotiterplatte blockieren. Gold-Biosensoren am Boden jeder Vertiefung detektieren die Impedanz, dass eine longitudinale dynamische Messung der Adhärenz der Zellen erlaubt. Für sterbende Zellen gilt: Je geringer die Adhärenz, desto geringer ist ihre Impedanz (Kho et al., 2015). Um die zytotoxische Fähigkeit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Hepatozyten zu messen, wurden 1x10<sup>4</sup> Hepatozyten pro Vertiefung ausgesät und beim Erreichen eines Plateaus (keine Veränderung der Impedanz zu messen) mit

---

<sup>76</sup> Engl.: sodium dodecyl sulfate

### 3. Material und Methoden

$3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei 37 °C kokultiviert. Die Messung der Impedanz erfolgte alle 15 Minuten in einem Zeitraum von 48 Stunden.

Um die antigen-spezifische Zytotoxizität von OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf virus-infizierte Hepatozyten zu messen, wurden Hepatozyten zwei Tage vor der Kokultur mit AdGOL (rekombinante Adenoviren, die für **GFP**, **O**valbumin und **L**uziferase codieren) infiziert. Für die Infektion wurde eine MOI<sup>77</sup> von 10 gewählt.

Eine andere Möglichkeit, antigen-spezifische Zytotoxizität von OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Hepatozyten zu messen, war die exogene Hinzugabe von 20 nM SIINFEKL auf Hepatozyten. Nach einer 30-minütigen Inkubation des Antigens mit den Hepatozyten wurden diese zweimal mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert.

#### 3.2.6.1.2 Durchflusszytometrische Analyse von CFSE-gefärbten Milzzellen als Zielzellen

Aufgereinigte Milzzellen wurden zur Hälfte mit Antigen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, danach mit 20 ml PBS aufgefüllt und zentrifugiert (480 g, 5 min). Der Vorgang mit 20 ml PBS und anschließender Zentrifugation wurde nochmals wiederholt. Milzzellen, die mit dem Antigen inkubiert wurden, wurden mit 1 µM CFSE<sup>78</sup> und Milzzellen ohne Antigen mit 10 µM CFSE für 20 Minuten bei 37 °C gefärbt. Danach wurden die Zellzahlen bestimmt und im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt. Die Kokultur fand in verschiedenen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen in U-förmigen 96-Well-Mikrotiterplatten bei 37 °C für sechs Stunden statt. Spezifische Zytotoxizität wurde mit der folgenden Gleichung ermittelt (Böttcher et al., 2013):

$$\% \text{ spez. Zytotoxizität} = 100 \times \left[ 100 \times \left( \frac{(CFSE_{\text{hoch}} / CFSE_{\text{niedrig}})_{\text{Probe}}}{(CFSE_{\text{hoch}} / CFSE_{\text{niedrig}})_{\text{Kontrolle}}} \right) \right]$$

#### 3.2.6.2 Adoptiver Transfer von SIINFEKL-spezifischen OT-1 CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen

---

<sup>77</sup> Engl.: multiplicity of infection

<sup>78</sup> Carboxyfluorescein succinimidyl ester

### 3. Material und Methoden

$2 \times 10^6$  SIINFEKL-spezifische Effektor OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in Mäuse injiziert, die zwei Tage zuvor mit  $10^7$  IU<sup>79</sup> AdGOL infiziert worden waren. Für den adoptiven Transfer wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ L sterilem PBS resuspendiert und mit einer Insulinspritze in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Für eine leichtere Durchführung der Injektion wurden die Mäuse in einer Röhre fixiert und mit Infrarotlicht bestrahlt, um die Durchblutung der Schwanzvene zu fördern.

#### 3.2.7 Bioinformatische Methoden

##### 3.2.7.1 mRNA-Sequenzierung (Illumina)

Für die Sequenzierung des Transkriptoms wurden CX3CR1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz sowie CXCR6<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von ND und CD-HFD Mäusen mittels FACS-Sortierens (siehe 3.2.1.2) selektiert. Jeweils  $10^4$  Zellen von drei biologischen Replikaten wurden in einer speziellen 96-Well PCR-Mikrotiterplatte ausgesät. Die weitere Aufbereitung der Proben sowie die Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Rupert Öllinger (AG Rad, Klinikum rechts der Isar, München) durchgeführt. Die bioinformatische Analyse übernahm Herr Dr. Sainitin Donakonda (Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar, München). Mit der Maxima RT Polymerase sowie Oligo-dT-Primern, an denen spezifische molekulare Erkennungsmarker (UMIs<sup>80</sup>) angehängt waren (Barcodes) und einem Adapter wurde die gesamte poly(A)-RNA in cDNA umgeschrieben und mit den entsprechenden Barcodes verbunden. Die 5'-Enden der cDNAs wurden durch *template-switch* Oligonukleotide (TSOs) verlängert. Nachdem alle Proben (je 3 x CXCR6<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber, je 3 x CX3CR1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von ND und CD-HFD Mäusen) zusammengeführt worden waren, wurden alle cDNAs mit Primern, die passend zur TSO-Sequenz waren, und dem Adapter gleichzeitig amplifiziert. Die cDNA wurde mit dem Nextera XT Kit fragmentiert, mit Markern versehen und 3'-Fragmente wurden mit Primern, die einen Überhang für Illumina P5 und P7 hatten,

---

<sup>79</sup> Engl.: infectious units

<sup>80</sup> Engl.: unique molecular identifier

### 3. Material und Methoden

amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgte durch eine NextSeq 500 (Illumina). Zur Erstellung von Proben- und Gen-sortierten UMI-Tabellen wurden die Daten mithilfe der Drop-Seq Pipeline 12 (<https://github.com/broadinstitute/Drop-seq>) verarbeitet und mit dem Referenz-Genom GRCm38 verglichen. Transkript- und Gen-Definitionen wurden anhand der ENSEMBL Annotations-Vorgabe 75 durchgeführt. Die Anzahl der detektierten Transkripte wurde normiert und die statistisch signifikanten, unterschiedlich exprimierten Gene (DEGs<sup>81</sup>) (1,5-fache Änderung,  $p_{adj} < 0,05$ ) wurden mithilfe der Programmiersprache R (DESeq2 R Paket) zwischen den verschiedenen Gruppen identifiziert (Love et al., 2014). Die Hauptkomponentenanalyse (PCA<sup>82</sup>) wurde mit der „plotPCA“-Funktion von DESeq2 R durchgeführt. Der euklidische Abstand zwischen den Proben wurde mit der gruppierten normierten Anzahl der Transkripte durch den *complete-linkage* Algorithmus in R berechnet. Die gruppierten *Heatmaps* wurden mit der *heatmap.2*-Funktion in R erstellt.

#### 3.2.7.2 Netzwerkanalyse der Transkriptionsfaktoren

Für die Netzwerkanalyse wurden diejenigen Transkriptionsfaktoren (TFs) verwendet, die in den DEGs der Datensätze von CXCR6<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen ND und CD-HFD Mäusen und von CD-HFD Mäusen zwischen CXCR6<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen vertreten waren. Um ihre potentielle transkriptionelle Aktivität in den DEGs zu überprüfen, wurden alle Promotersequenzen, die bis zu 2 Kilobasen (kb) in den DEGs vorgeschaltet waren, von der eukaryotischen Promoterdatenbank heruntergeladen (Dreos et al., 2017). Gleiches galt für die Bindungsstellen der TF, die von *JASPAR* und *Hocomoco* Datenbanken bezogen worden sind. Die Bindungsstellen der TF in den Promotersequenzen der DEGs wurde mit dem *custom python script* gescannt. Die Netzwerke zwischen Genen und TF (TF-Gen) und zwischen TFs (TF-TF) wurde mit *Cytoscape* (v3.7.1) hergestellt und visualisiert (Shannon et al., 2003). Die Darstellung der Hierarchie der TFs, gekennzeichnet als ankommende und weitergebende Informationen für andere TFs bzw. Genen, wurde mit *igraph R* (<https://igraph.org/>) durchgeführt. Die Ebene der

---

<sup>81</sup> Engl.: differentially expressed genes

<sup>82</sup> Engl.: principal component analysis



### 3. Material und Methoden

Hierarchie wurde mit folgender Formel kalkuliert:  $H = (O - I)/(O + I)$ . Der Wert definiert drei Ebenen des Netzwerks (Gerstein et al., 2012).

Um alle vorgeschalteten TFs vorherzusagen, welche die DEGs in beiden Datensätzen regulieren, wurde eine Analyse mit BART<sup>83</sup> (v1.1) verwendet (Z. Wang et al., 2018). Alle TFs, die signifikant angereicherte Bindungssequenzen in den DEGs aufwiesen, wurden mit dem *Mouse Transcription Factor Atlas* identifiziert (Zhou et al., 2017). Damit konnten 29 bzw. 25 TFs in den beiden Vergleichen (CD-HFD: CXCR6<sup>+</sup> vs. CXCR6<sup>-</sup>; CXCR6<sup>+</sup>. ND vs. CD-HFD) gefunden werden.

#### 3.2.7.3 Gene set enrichment analysis (GSEA)

Mit GSEA ist es möglich, den Grad der Repräsentation eines bereits annotierten, öffentlich zugänglichen Datensatzes zu Transkriptionsfaktoren, Signalwegen oder anderen molekularen Prozessen im zu analysierenden Datensatz zu ermitteln (Mahi et al., 2019; Mathur et al., 2018). Dabei werden alle Gene unabhängig von ihrer Signifikanz und der unterschiedlichen Anzahl der Genkopien berücksichtigt. Folgende Datensätze wurden im *gmt*-Format von der *Molecular Signature Database* (MsigDB) heruntergeladen:

- Effektor (GSE1000001: KAECH\_NAIVE\_VS\_DAY8\_EFF\_CD8\_TCELL\_UP)
- GPCR<sup>84</sup> Signalweg
- TCR<sup>85</sup> Signalweg
- Th17
- Zellzyklus
- FOXO1<sup>oben</sup>(GSE46025: WT\_VS\_FOXO1\_KO\_KLRG1\_LOW\_CD8\_EFFECTOR\_TCELL\_UP)
- FOXO1<sup>unten</sup>(GSE46025:WT\_VS\_FOXO1\_KO\_KLRG1\_LOW\_CD8\_EFFECTOR\_TCELL\_DOWN)
- IL-21 (GSE1919: CTRL\_VS\_IL-21\_TREATED\_TCELL\_24H Up)
- Exhaustion<sup>86</sup> (Bengsch et al., 2016)
- TOX (Khan et al., 2019)

Datensätze für BATF<sup>87</sup> und Tbx21 wurden als unbearbeitete Microarray Daten von der GEO Datenbank heruntergeladen (accession IDs: GSE54215 (BATF vs WT [Day3]) und

---

<sup>83</sup> Engl.: Binding Analysis for Regulation of Transcription prediction tool

<sup>84</sup> Engl.: G-protein coupled receptor

<sup>85</sup> Engl.: T cell receptor

<sup>86</sup> Engl.: Erschöpfung

<sup>87</sup> Engl.: Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor

### 3. Material und Methoden

GSE122931 (Tbx21 vs WT [H1 cells]) und die relevanten Gene mit *Limma R* gefiltert (Ritchie et al., 2015). Die Gensequenzen, die für RUNX3 wichtig waren, wurden vom RNA-seq Datensatz von der GEO Datenbank verwendet (ID: GSE81885) und mit *GREIN DB* weiter prozessiert (Mahi et al., 2019). Gensequenzen, die in humaner Form im *gmt*-Format vorhanden waren, wurden mit *custom shell script* zu den homologen Genen in der Maus konvertiert. GSEA für die DEGs aus den beiden Kombinationen CDHFD CXCR6<sup>+</sup>/ND CXCR6<sup>+</sup> und CDHFD CXCR6<sup>+</sup>/CDHFD CXCR6<sup>-</sup> wurde mit dem Programm GSEA v3.0 [14] durchgeführt und anhand einer 1,5-fachen Änderung (*DESeq2*) angeordnet. *PreRanked* ist eine Methode von GSEA, um den normalisierten Anreicherungswert (NES<sup>88</sup>) zu bestimmen. Die Falscherkennungsrates (FDR<sup>89</sup>) wurde mit  $q \leq 0.25$  festgelegt. Alle NES mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0.01$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

#### 3.2.8 Statistik

Alle Statistiken wurden mit der GraphPad Prism Software berechnet. Als statistische Methode für den Vergleich von zwei Gruppen wurde entweder ungepaarter oder gepaarter Student's T-Test verwendet. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz mit einer oder mehreren Variablen bei mehr als zwei Gruppen wurde entweder die einfache (*ONE-Way ANOVA*<sup>90</sup>) oder die mehrfache Varianzanalyse (*TWO-Way ANOVA*) genutzt. Die statistische Signifikanz wurde wie folgt markiert: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (*Mean*) zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts gekennzeichnet.

---

<sup>88</sup> Engl.: normalized enrichment score

<sup>89</sup> Engl.: false discovery rate

<sup>90</sup> Engl.: analysis of variance

3. Material und Methoden

## 4. Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Charakterisierung der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen

Das angeborene Immunsystem nimmt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von NASH ein, aber inwieweit das adaptive Immunsystem daran beteiligt ist, ist noch unklar. Aktuelle Studien geben Hinweise darauf, dass vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine besondere Rolle bei NASH haben. Eine genaue Charakterisierung dieser Zellen in der Leber bei NASH soll Aufschlüsse über ihre exakte Rolle in dieser Krankheit geben (Breuer et al., 2020; Malehmir et al., 2019; Wolf et al., 2014).

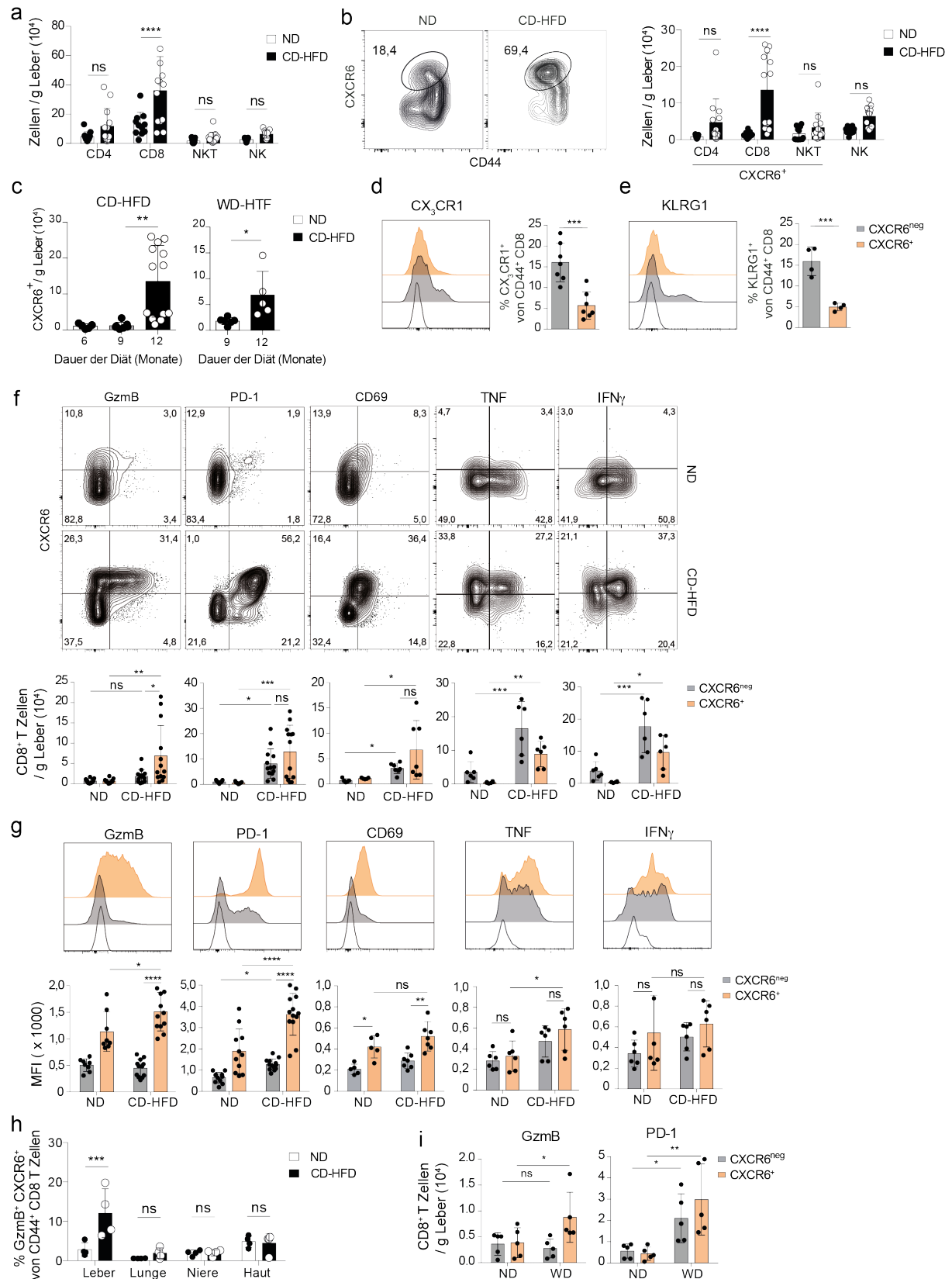
##### 4.1.1 CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen sind spezifisch in der Leber erhöht und zeigen einen gewebeständigen, erschöpften und zytotoxischen Phänotyp

Für die genaue Charakterisierung der Lymphozyten in der Leber von CD-HFD Mäusen wurden T-Zellen gewählt, da trotz des Fehlens von NKT-Zellen in den CD1d<sup>-/-</sup> Mäusen als auch in den J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> Mäusen weiterhin ein Leberschaden auftrat. Dieser war jedoch in den  $\beta$ <sub>2</sub>m<sup>-/-</sup> und TCR $\beta\delta$ <sup>-/-</sup> Mäusen verschwunden (Daten von Dominik Pfister). Bei der ersten Analyse von Lymphozyten in CD-HFD Mäusen, die zwölf Monate lang NASH induzierende Diät erhalten hatten, fiel auf, dass nur die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber zwischen ND Mäusen und CD-HFD Mäusen unterschiedlich war (Abb. 6a). Für die nähere Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde der Chemokinrezeptor CXCR6 gewählt, da dieser wichtig für den Verbleib von T-Zellen in der Leber ist und bei Entzündungsreaktionen erhöht vorkommt (Tse et al., 2014). Die Analyse ergab einen deutlichen Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die positiv für CXCR6 waren (Abb. 6b). Die Anzahl der Zellen erhöhte sich erst nach zwölf Monaten unter den NASH induzierenden Diäten CD-HFD und WD-HTF (Abb. 6c,d). CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten kein CX<sub>3</sub>CR1 bzw. KLRG1 (Abb. 6d,e). CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die jeweils positiv für GzmB, PD-1, CD69, TNF und IFN $\gamma$  waren, waren vermehrt in der Leber von CD-HFD Mäusen zu finden (Abb. 6f). Die Analyse der Expression dieser Moleküle ergab, dass CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen im Vergleich zu

#### 4. Ergebnisse

CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine höhere Expression für GzmB, PD-1 und CD69 aufwiesen, aber nicht für TNF und IFN $\gamma$  (Abb. 6g). Bis auf IFN $\gamma$  war die Expression aller untersuchten Moleküle in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen der CD-HFD Mäuse im Vergleich zu ND Mäusen nochmals erhöht (Abb. 6g). Das vermehrte Auftreten von CXCR6<sup>+</sup> GzmB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen war leberspezifisch, da in anderen Organen wie Niere, Lunge oder Haut keine Erhöhung zu erkennen war (Abb. 6h). Einen Anstieg an CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB und PD-1 exprimierten, war auch in der Leber von WT Mäusen zu sehen (Abb. 6i).

## 4. Ergebnisse



**Abb. 6: Immunphänotypische Charakterisierung von Lymphozyten in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen.**

(a) Quantitative Bestimmung ( $10^4/g$  Leber) von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=10; CD-HFD: n=13). (b) Quantitative Bestimmung ( $10^4/g$  Leber) von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NKT-Zellen, die positiv für CXCR6 sind, sowie NK-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=10; CD-HFD: n=13). (c) Quantitative Bestimmung ( $10^4/g$  Leber)

## 4. Ergebnisse

von CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD und WD-HTF Mäusen nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Fütterung (CD-HFD: n=13; WD-HTF: n=5). **(d,e)** Prozentualer Anteil an CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die entweder CX<sub>3</sub>CR1 oder KLRG1 exprimieren, von lebenden Lymphozyten aus der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND, CD-HFD: n=4-7). **(f)** Quantitative Bestimmung (10<sup>4</sup>/g Leber) von CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB, PD-1, CD69, TNF oder IFN $\gamma$  exprimieren, in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=10; CD-HFD: n=13) **(g)** Repräsentative Histogramme von der Expression von GzmB, PD-1, CD69, TNF und IFN $\gamma$  in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen mit der entsprechenden FMO Kontrolle. Quantitative Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI<sup>91</sup>) von GzmB, PD-1, CD69, TNF und IFN $\gamma$  für beide Populationen in ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5-11; CD-HFD: n=6-13). **(h)** Prozentualer Anteil an CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>+</sup>GzmB<sup>+</sup> T-Zellen von lebenden Lymphozyten aus der Leber, Lunge, Niere und Haut (ND, CD-HFD: n=4). **(i)** Quantitative Bestimmung (10<sup>4</sup>/g Leber) von CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB oder PD-1 exprimieren, in der Leber von ND und WD-HTF Mäusen (ND: n=5; WD-HTF: n=5)

Jeder Punkt in Abbildung 8 steht für eine Maus. In **(a,b, f-i)** wurde eine TWO-Way ANOVA, in **(c)** eine ONE-Way ANOVA und in **(c-e)** einen ungepaarten t-test als Statistik verwendet.

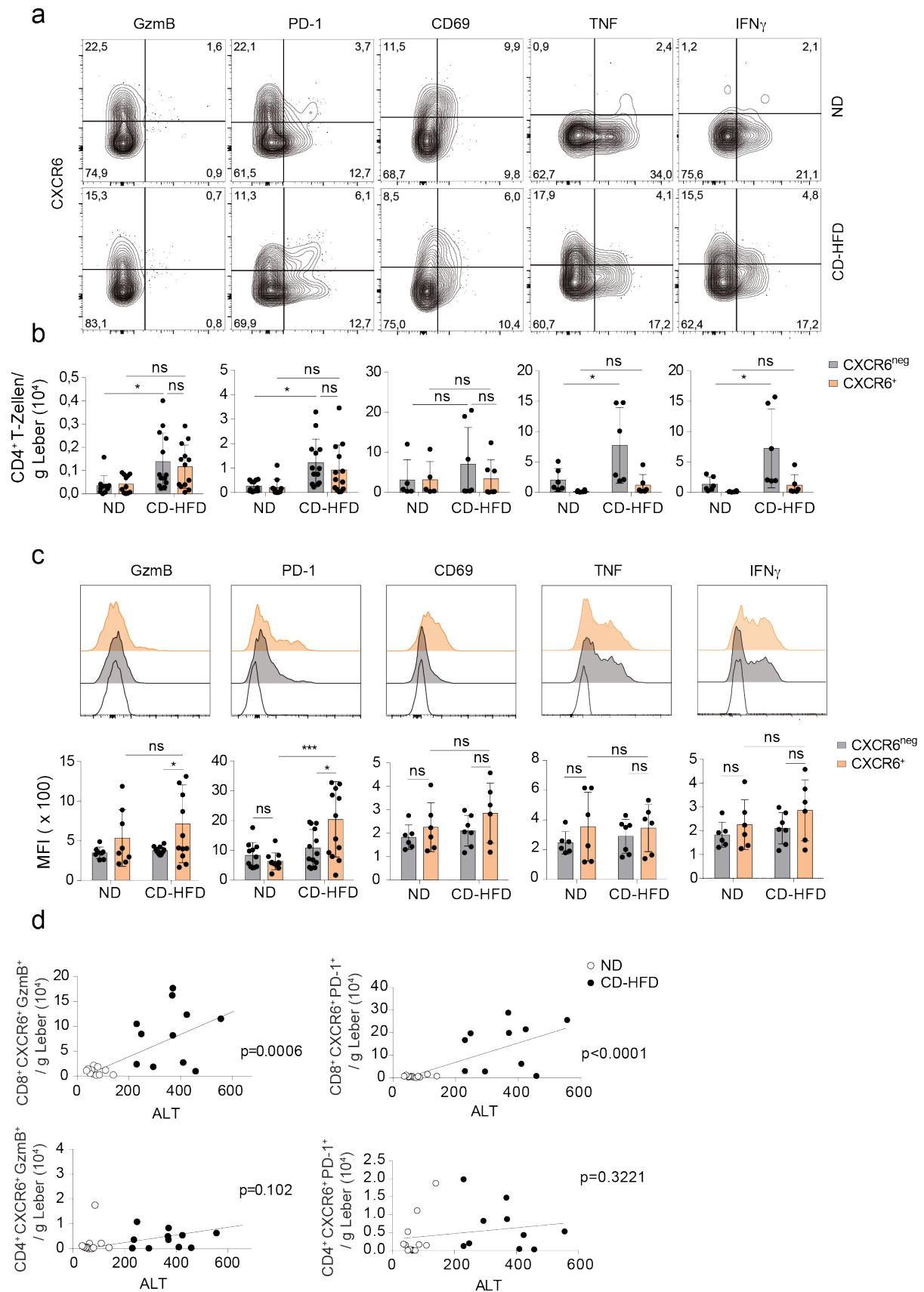
Die Anzahl an CXCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB, PD-1, CD69, TNF oder IFN $\gamma$  exprimierten, war dagegen in der Leber von CD-HFD Mäusen nur leicht erhöht und es gab keinen Unterschied zu CXCR6<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 7b). Einzig die Expression von GzmB und PD-1 war auf CXCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den ND Mäusen leicht erhöht (Abb. 7c). Ebenso konnte keine eindeutige Korrelation der Anzahl an CXCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB oder PD-1 exprimierten, mit der Konzentration an Alanin-Aminotransferasen (ALT) in CD-HFD Mäusen nachgewiesen werden, wohingegen diese signifikant für beide Populationen an CD8<sup>+</sup> T-Zellen war (Abb. 7).

Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten aus der Leber von CD-HFD Mäusen ergab, dass sich eine deutliche Population an CXCR6<sup>+</sup> GzmB<sup>+</sup> und CXCR6<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch in der Leber ausbildete und dass die Anzahl der Zellen mit dem Grad des Leberschadens korrelierte.

---

<sup>91</sup> Engl.: Mean Fluorescence Intensity

## 4. Ergebnisse



**Abb. 7: Immunphänotypische Charakterisierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen.**

(a,b) Quantitative Bestimmung ( $10^4$ /g Leber) von CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB, PD-1, CD69, TNF oder IFN $\gamma$  exprimieren, in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5-11; CD-HFD: n=6-13). (c)



## 4. Ergebnisse

Repräsentative Histogramme von der Expression von GzmB, PD-1, CD69, TNF und IFN $\gamma$  in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen mit der entsprechenden FMO Kontrolle. Quantitative Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von GzmB, PD-1, CD69, TNF und IFN $\gamma$  für beide Populationen in ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5-11; CD-HFD: n=6-13). **(d)** Korrelation der Anzahl an CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die entweder GzmB oder PD-1 exprimieren, mit dem Leberenzym Alanin-Aminotransferase (ALT) (ND, CD-HFD: n=11).

Jeder Punkt in Abbildung 9 steht für eine Maus. In **(b,c)** wurde eine TWO-Way ANOVA und **(d)** eine lineare Korrelation als Statistik verwendet.

### 4.1.2 Klonale Expansion ist nicht für die erhöhte Anzahl an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen verantwortlich

Die durchflusszytometrische Charakterisierung der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen ergab einen Phänotyp, der dem von geweberesidenten Gedächtnis T-Zellen ähnelte. Um einen vollständigen Einblick in die Zellen zu bekommen, wurden diese aus den Lebern von ND und CD-HFD Mäusen sortiert, sequenziert und anschließend mithilfe verschiedener bioinformatischer Analysen detailliert charakterisiert. Dabei wurden CD44<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> aus der Milz, CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>+</sup> und CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>-</sup> aus der Leber von ND und CD-HFD Mäusen miteinander verglichen. Die PCA-Analyse ergab große Unterschiede in der Expression der Genen in den Zellen aus der Milz und Leber sowie in den CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den ND und CD-HFD Mäusen (Abb. 8a). Die genaue Charakterisierung der deutlich unterschiedlich regulierten Gene in den CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen ND und CD-HFD Mäusen ergab hohe Expressionen an kostimulatorischen Molekülen wie *Tnfrs4* (OX40) oder Effektormolekülen wie *Gzmk* sowie Molekülen, die mit einem „erschöpften“ Phänotyp assoziiert sind, wie *Pdcd1* (PD-1), *Il-10* und *Maf* (Abb. 8b,c,e). Gene, die am stärksten herunterreguliert waren, codieren für Rezeptoren und Liganden, die wichtig für den Verbleib in den Lymphknoten bzw. für das Wandern dorthin sind, z.B. *Il-7r*, *Sell*<sup>92</sup> (CD62L), *Ccr7* oder *S1pr1* (Abb. 8b,c,e). Mithilfe der *gene set enrichment analysis* (GSEA), die für die Berechnung aller unterschiedlich regulierten Gene aus der Transkriptomanalyse unabhängig der statistischen Signifikanz einschließt, konnte die Bedeutung von definierten biologischen Prozessen in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen

---

<sup>92</sup> Engl.: Selectin L

#### 4. Ergebnisse

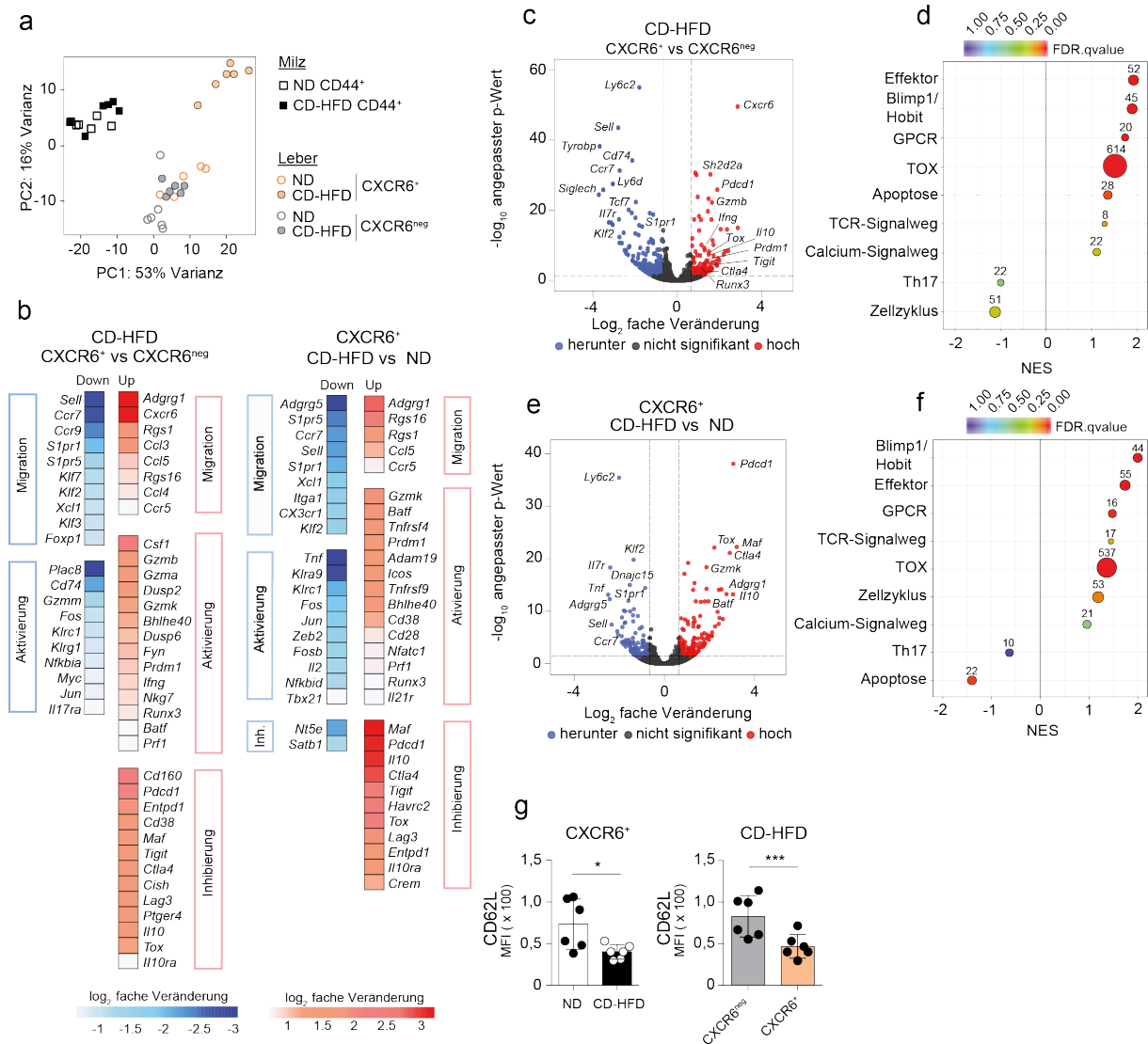
von CD-HFD Mäusen im Vergleich zu ND Mäusen und zu CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen überprüft werden. In beiden Vergleichen waren Gene, die charakteristisch für TOX, der ein essentieller Transkriptionsfaktor für *exhaustion*<sup>93</sup> ist, und für Blimp1/Hobit, die wichtige Transkriptionsfaktoren für die Gewebeständigkeit sind, deutlich überrepräsentiert. Gleiches galt für Effektorantworten und für den GPCR Signalweg. Dagegen konnte für Gene, die für den T-Zellrezeptor Signalweg (TCR), Zellzyklus und für Th17-Zellen wichtig sind, keine eindeutige Anreicherung beobachtet werden (Abb. 8d,f). Beim Vergleich von CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen zeigte sich, dass die Signatur für Apoptose spezifisch für die T-Zellpopulation galt (

Abb. 9: Immunphänotypische Charakterisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber **von ND und CD-HFD Mäusen**d,f). Durchflusszytometrische Analysen für GzmB (Abb. 6f), PD-1 (Abb. 6f) und CD62L bestätigten die Ergebnisse aus den bioinformatischen Analysen (Abb. 8g).

---

<sup>93</sup> Engl.: Erschöpfung

## 4. Ergebnisse



**Abb. 8: Bioinformatische Analyse der RNA-Sequenzierung von sortierten CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Milz und Leber von ND und CD-HFD Mäusen.**

(a) PCA-Analyse aller Zellpopulationen, die sequenziert worden sind. (b) Heatmap-Darstellung von einzelnen Genen, die in CXCR6<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen im Vergleich zu ND Mäusen und im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen signifikant reguliert waren. Die Farbskala gibt die log<sub>2</sub>-fache Veränderung einzelner Gene zwischen den Gruppen an (c,e) Volcano-Plot zur grafischen Darstellung aller DEGs in den abgebildeten Vergleichen, die einen größeren Unterschied als log<sub>2</sub> hatten. Rote Punkte geben Gene wieder, deren Anzahl vergleichsweise erhöht waren, während blaue Punkte Gene darstellen, deren Anzahl im Vergleich erniedrigt waren. (d,f) Darstellung der GSEA aller Gene aus beiden Vergleichen, die im RNA-seq analysiert wurden. Größe der Punkte spiegelt die Anzahl an Genen aus den jeweiligen Datensätzen wider, die für die Analyse verwendet worden sind. Die Farbe zeigt an, wie hoch die Falscherkennungsrate (FDR) war. Der NES<sup>94</sup> gibt den Anteil an Genen an, die im Datensatz überrepräsentiert war. (g) Mittlere Fluoreszenzintensität von CD62L in CXCR6<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Lebern der ND und CD-HFD Mäusen und in CXCR6<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Lebern der CD-HFD Mäusen (ND: n=6; CD-HFD: n=6).

Jeder Punkt in Abbildung 10 steht für eine Maus. In (g) wurde ein ungepaarter t-Test als Statistik verwendet.

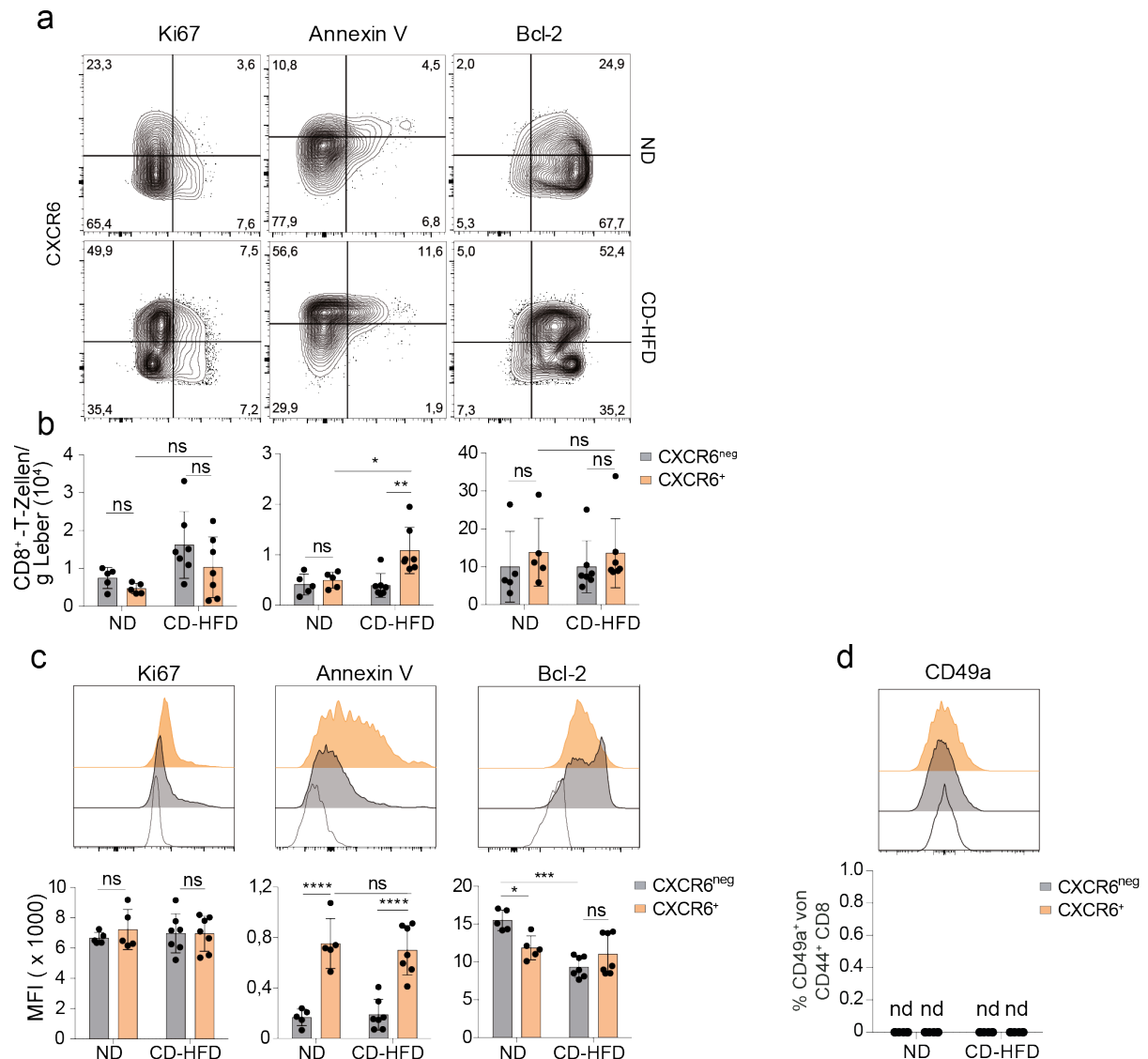
<sup>94</sup> Engl.: normalized enrichment score

#### 4. Ergebnisse

Um die Erkenntnisse aus der bioinformatischen Analyse zu bestätigen, wurden CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD und ND Mäusen isoliert und hinsichtlich Anzeichen von Apoptose und Proliferation durchflusszytometrisch analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass in der entzündeten Leber von CD-HFD Mäusen ein leichter Anstieg an Annexin V<sup>+</sup> CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu sehen war (Abb. 9a). Für die anderen Parameter konnte sowohl in Anzahl als auch in Stärke der Expression keine Unterschiede in den CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den CD-HFD und ND-Mäusen detektiert werden (Abb. 9b,c). Eine interessante Beobachtung war, dass das Integrin CD49a, welches Gedächtniszellen, die im Gewebe verbleiben (Cheuk et al., 2017) charakterisiert, nicht exprimiert war (Abb. 9d).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen Eigenschaften von Gewebeständigkeit, Erschöpfung, Zytotoxizität, Apoptose und fehlender Proliferation aufwiesen.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 9: Immunphänotypische Charakterisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen.**

(a,b) Quantitative Bestimmung (10<sup>4</sup>/g Leber) von CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die positiv für Annexin V, Ki67 und Bcl-2 sind, in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5; CD-HFD: n=7) (c) Repräsentative Histogramme von der Expression von Ki67, Annexin V und Bcl-2 in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen mit der entsprechenden FMO Kontrolle. Quantitative Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von Ki67, Annexin V und Bcl-2 für beide Populationen in ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5; CD-HFD: n=7). (d) Prozentualer Anteil an CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>+</sup>CD49a<sup>+</sup> T-Zellen von CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND, CD-HFD: n=5).

Jeder Punkt in Abbildung 11 steht für eine Maus. In (b-d) wurde eine TWO-Way ANOVA als Statistik verwendet.

### 4.1.3 Expression des Transkriptionsfaktors Foxo1 ist in leber-spezifischen CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen deutlich reduziert

Die durchflusszytometrische Analyse der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, zusammen mit dem Datensatz aus der RNA-Sequenzierung lässt auf einen zytotoxischen Phänotyp der Zellen

#### 4. Ergebnisse

schließen, die darauf programmiert wurden, im Gewebe zu verbleiben. Da bekannte Transkriptionsfaktoren wie T-bet oder Blimp1, die beide für die Regulation von Effektorantworten verantwortlich sind (Rao et al., 2012), in den CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen nicht stärker exprimiert waren, wurde das transkriptionelle Netzwerk mit Hilfe bioinformatischer Methoden ermittelt (Abb. 10a). Als erstes wurden in einem ergebnisoffenen Ansatz mit dem bioinformatischen Programm BART<sup>95</sup> alle bekannten TFs darauf hin überprüft, inwieweit sie eine Anreicherung von ihren Zielgenen im Datensatz der RNA-Sequenzierung zeigten. Als einer der Top-Kandidaten stachen *Irf4*, *Runx3* und *Foxo1* in den CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen und im Vergleich zu ND Mäusen heraus (Abb. 10b,e). Als nächstes wurden alle signifikant unterschiedlich regulierten Transkriptionsfaktoren (TF) aus der Transkriptomanalyse in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen jeweils mit CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus ND Mäusen und mit CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen verglichen. Die Herunterregulierung von *Klf2* kristallisierte sich dabei als wichtiger Knotenpunkt für die transkriptionelle Regulation der CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus den CD-HFD Mäusen heraus (Abb. 10c,f). Die Folge davon war die erhöhte Expression von TFs, die mit zytotoxischen Eigenschaften der CD8<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert sind, wie *Nfatc1*, *Bhlhe40*<sup>96</sup>, *Runx3* und *Batf*. Obwohl im *Volcano*-Plot ein deutliches Vorkommen an inhibitorischen Molekülen zu sehen war, spiegelte sich dies durch das Fehlen von *Maf* bzw. die niedrige Hierarchie von *Tox*<sup>97</sup> in der Netzwerkanalyse nicht wider. Durch die Kombination aus den Ergebnissen der BART-Analyse und der Netzwerkanalyse aus den DEGs zeigte sich, dass die Herunterregulierung von *Foxo1* ein entscheidender Faktor für die Ausprägung der Eigenschaften von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen sein könnte. GSEA für CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen und im Vergleich zu ND Mäusen ergab eine signifikante Anreicherung von hoch- und herunterregulierten Genen für *Foxo1*. Das Gleiche galt auch für *Tox* und *Runx3*, aber nicht für *Batf* und T-bet (Abb. 10d,g). Mit der durchflusszytometrischen Analyse der CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen wurden die

---

<sup>95</sup> Engl.: Binding Analysis for Regulation of Transcription

<sup>96</sup> Engl.: Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40

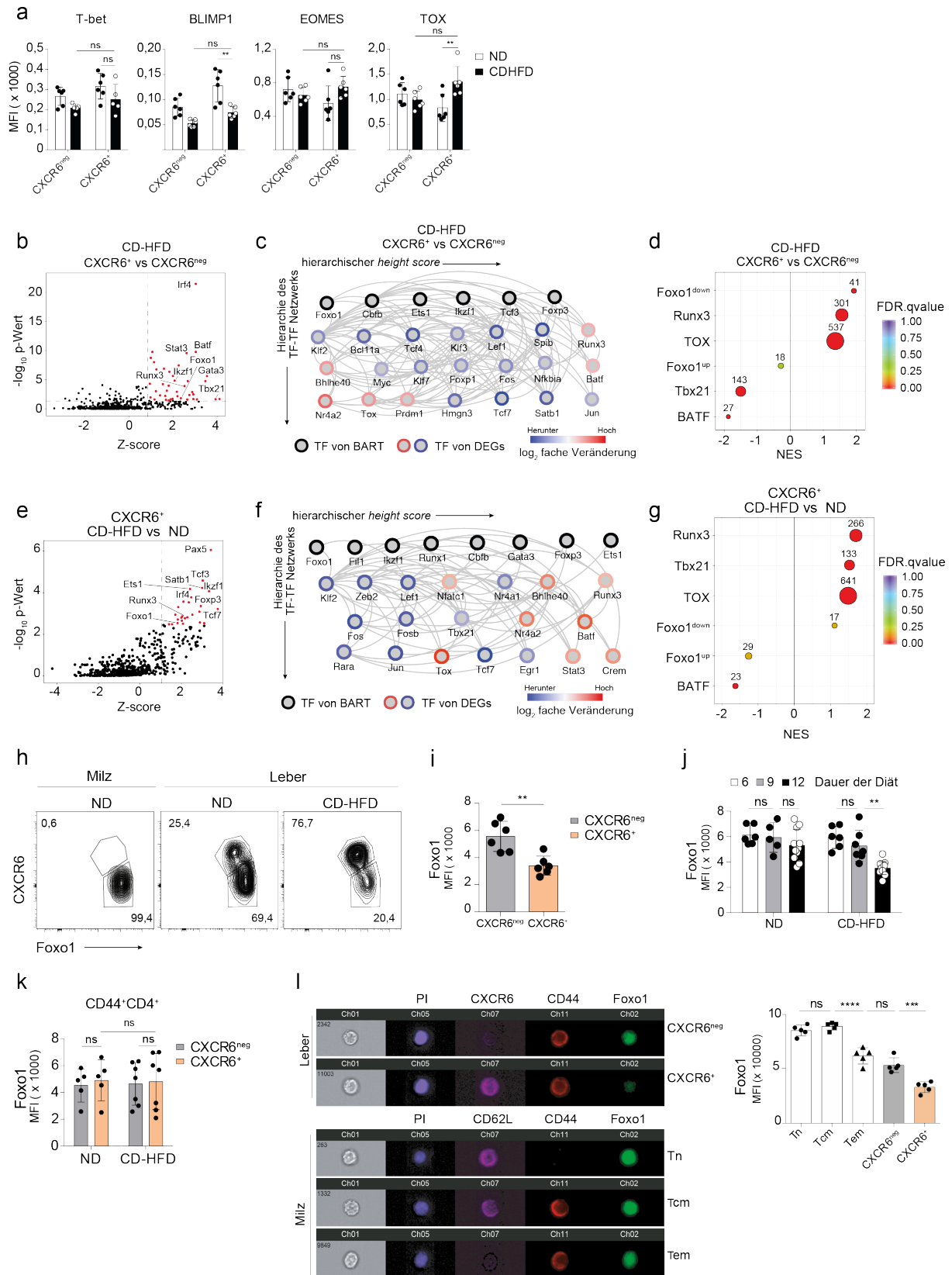
<sup>97</sup> Engl.: Thymocyte selection-associated high mobility group box protein

#### 4. Ergebnisse

bioinformatischen Ergebnisse für Foxo1 und TOX bestätigt (Abb. 10a,i). Die Analyse für Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von ND und CD-HFD Mäusen über verschiedene Zeitpunkte der NASH induzierenden Diät zeigte eine deutliche Reduzierung der Expression erst nach zwölf Monaten (Abb. 10j). CXCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen zeigten dagegen keine Herunterregulierung von Foxo1 (Abb. 10k). Um nachzuweisen, dass die niedrigere Expression von Foxo1 in den CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich im Zellkern vorlag, wurde eine Kombination aus Mikroskopie und Durchflusszytometrie angewandt. Mit dem Imagestream<sup>®</sup> konnte eine sukzessive Abnahme von Foxo1 im Zellkern von naiven T-Zellen und zentralen T-Gedächtniszellen, über Effektor T-Gedächtniszellen bis hin zu CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber, beobachtet werden (Abb. 10l).

Mit unterschiedlichen bioinformatischen Methoden konnte die Reduktion der transkriptionelle Aktivität von Foxo1 als entscheidender Knotenpunkt in der Regulation der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen ermittelt werden.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 10: Bioinformatische Analyse des Netzwerks von Transkriptionsfaktoren in sortierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen.**

(a) Mittlere Fluoreszenzintensität von T-bet, Blimp1, EOMES und TOX in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen (CD-HFD=6). (b,e) BART-Analyse von allen bekannten TFs, die Bindungsstellen in den DEGs der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen (b) bzw. in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen von ND-Mäusen haben (e). (c,f) Netzwerkanalyse von TFs, die



## 4. Ergebnisse

in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen **(b)** bzw. in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen von ND-Mäusen unterschiedlich reguliert waren **(f)**. **(d,g)** GSEA von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen **(d)** bzw. in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen von ND-Mäusen **(g)** für Gene, die in den zu vergleichenden Datensätzen von den jeweiligen TFs abhängig waren. **(h)** Expression von CXCR6 und Foxo1 in CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz von ND-Mäusen und in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen. **(i)** Mittlere Fluoreszenzintensität von Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen (CD-HFD=6). **(j)** Mittlere Fluoreszenzintensität von Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Diät (ND=5; CD-HFD=5-11). **(k)** Mittlere Fluoreszenzintensität von Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen (ND=5; CD-HFD=7). **(l)** Mittlere Fluoreszenzintensität von Foxo1 in unterschiedlichen CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen aus der Milz und Leber aus ND Mäusen (ND=5).

Jeder Punkt in Abbildung 12 steht für eine Maus. In **(a,j,k)** wurde eine TWO-Way ANOVA, in **(l)** eine ONE-Way ANOVA und in **(i)** einen ungepaarten t-test als Statistik verwendet.

### 4.2 Regulation von Foxo1 und CXCR6 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber

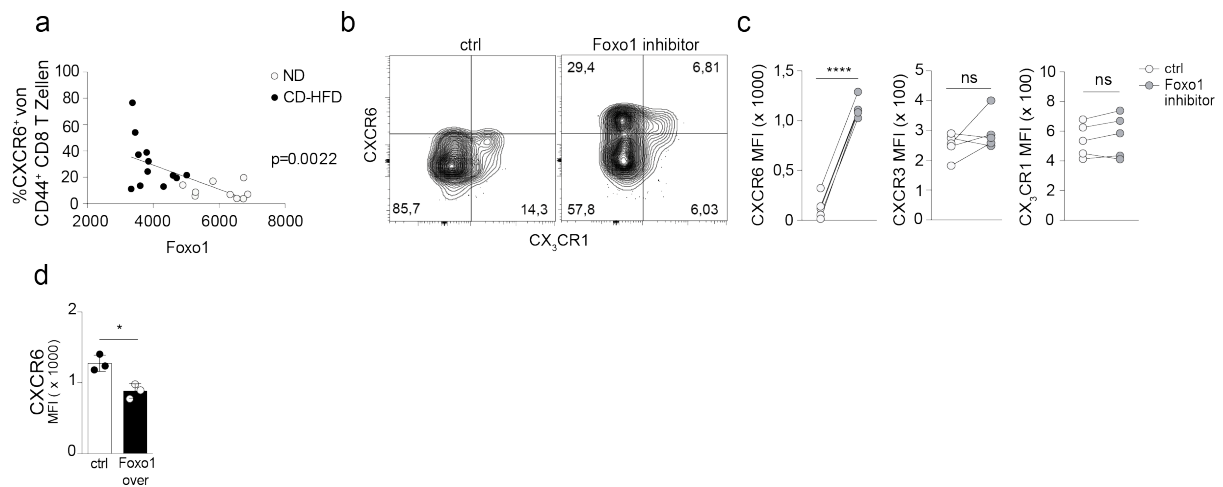
Die Charakterisierung des Phänotyps und des transkriptionellen Netzwerks von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen ergab, dass sie mehr Effektormoleküle exprimierten und dass die erniedrigte Expression von Foxo1 eine zentrale Rolle dafür spielte. Im Folgenden wurde analysiert, ob die reduzierte Aktivität von Foxo1 kausal mit der CXCR6 Expression zusammenhing und welche Faktoren für die Herunterregulierung von Foxo1 entscheidend waren.

#### 4.2.1 Inhibierung der Foxo1 Aktivität erhöht CXCR6 Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Bei der Analyse der Foxo1 Expression in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Lebern von CD-HFD und ND Mäusen, konnte eine deutliche inverse Korrelation von Foxo1 Level und prozentualer Anteil an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen von CD44<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden (Abb. 11a). Unklar war noch, ob eine Herunterregulierung von Foxo1 notwendig für die Entwicklung von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen war. Durch pharmakologische Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Foxo1 mit dem Inhibitor AS1842856 in sortierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber *ex vivo* zeigte sich eine Zunahme der CXCR6 Expression. Dieser Effekt war für CX<sub>3</sub>CR1 und CXCR3 nicht zu sehen (Abb. 11b,c). Die genetische Überexpression von Foxo1 in retroviral-transduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigte die

## 4. Ergebnisse

Herunterregulierung von Foxo1 als wichtigen Schritt für die Ausbildung von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber (Abb. 11d).



**Abb. 11: Regulation von CXCR6 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen über Foxo1 Aktivität.**

(a) Korrelation des prozentualen Anteils an CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von CD44<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen mit der Expression von Foxo1 in diesen Zellen (ND=10; CD-HFD=11). (b, c) CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus der Leber sortiert und mit einem Foxo1 Inhibitor 18 Stunden behandelt. Repräsentativer Dot Plot für CXCR6 und CX<sub>3</sub>CR1 exprimierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die dazugehörige quantitative Analyse der mittleren Fluoreszenz von CXCR6, CX<sub>3</sub>CR1 und CXCR3 (n=5). (d) Mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR6 auf *in vitro* aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Retroviren transduziert worden sind, die entweder Foxo1 überexprimierten oder ein irrelevantes Plasmid (ctrl) trugen (n=3).

Jeder Punkt in (a) steht für eine Maus und jeder Punkt in (b-d) für ein unabhängiges Experiment. In (a) wurde lineare Korrelation, in (c) gepaarter und in (d) ungepaarter t-test als Statistik verwendet.

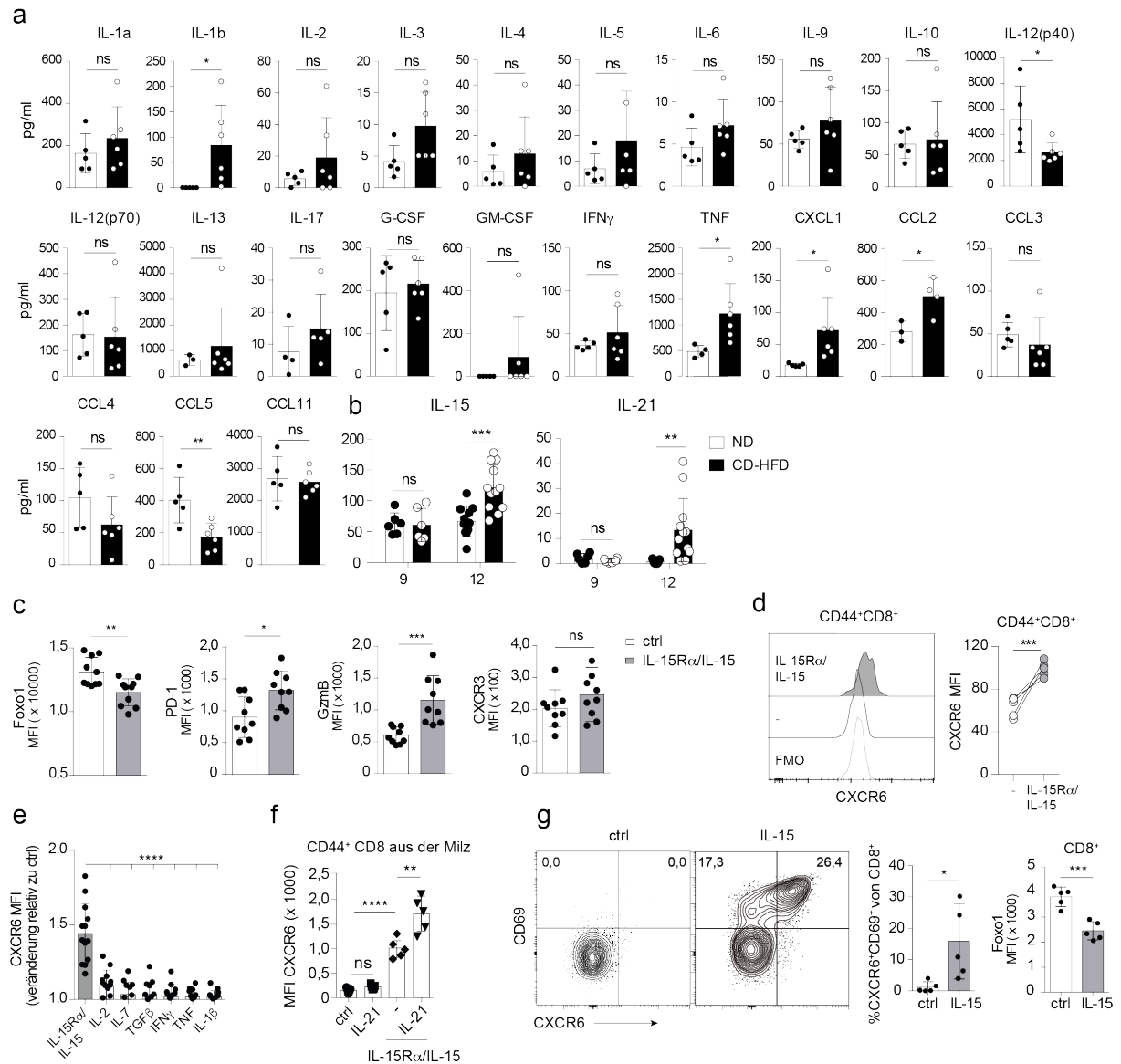
### 4.2.2 IL-15R $\alpha$ /IL-15 und IL-21 regulieren die Expression von Foxo1 in CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunter

CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind antigen-erfahrene CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die für ihre Entwicklung eine ausreichend starke Aktivierung des T-Zellrezeptors erhielten, um durch die Differenzierung zu einer bestimmten T-Zellpopulation besser an die Umgebung angepasst zu sein (Mackay et al., 2013). Trotzdem war die Expression von Foxo1 in den zwei Populationen unterschiedlich, obwohl in beiden Populationen über den T-Zellrezeptor die Kinase Akt Foxo1 phosphorylierte und dadurch Foxo1 aus dem Zellkern entfernt wurde. Eine Gruppe an Zytokinen, die Akt unabhängig vom TCR, nämlich über die Kinase PI3K phosphorylieren kann, sind die  $\gamma_c$ -Zytokine (Rochman et al., 2009). Nur die Konzentrationen von IL-15 und IL-21 waren im Serum von CD-HFD Mäusen erhöht (Abb. 12a,b).

#### 4. Ergebnisse

Übereinstimmend mit der erhöhten Anzahl an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach zwölfmonatiger Diät, waren die Konzentrationen für IL-15 und IL-21 erst nach dieser Zeitspanne erhöht (Abb. 6c, Abb. 12b). Da IL-21 nur in der entzündeten Leber vorkam, wurde zuerst der Einfluss von IL-15R $\alpha$ /IL-15 auf die Expression von Foxo1 in Lymphozyten aus der Leber durch *ex vivo* Stimulierung untersucht. Neben einer Erniedrigung der Expression von Foxo1 in den CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, konnte auch eine Erhöhung von PD-1 und GzmB, aber nicht von CXCR3 detektiert werden (Abb. 12c). Gleichzeitig sorgte die Stimulierung von CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und in der Leber mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 über 24h für eine Erhöhung der Zellen, die für CXCR6 positiv waren (Abb. 12d,e). Andere  $\gamma_c$ - und proinflammatorische Zytokine hatten keinen Effekt auf die Anzahl von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber (Abb. 12e). Bei der Stimulierung von CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 und IL-21 zeigte sich, dass IL-21 erst nach vorheriger IL-15R $\alpha$ /IL-15 Stimulierung die Anzahl an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöhte (Abb. 12f). Für humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen galt dieselbe Regulation, da IL-15 die Expression von Foxo1 erniedrigte und es zu einer Erhöhung an CXCR6<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen kam (Abb. 12g).

## 4. Ergebnisse



**Abb. 12: Regulation von Foxo1 in CD44<sup>+</sup> T-Zellen durch IL-15R $\alpha$ /IL-15 und IL-21.**

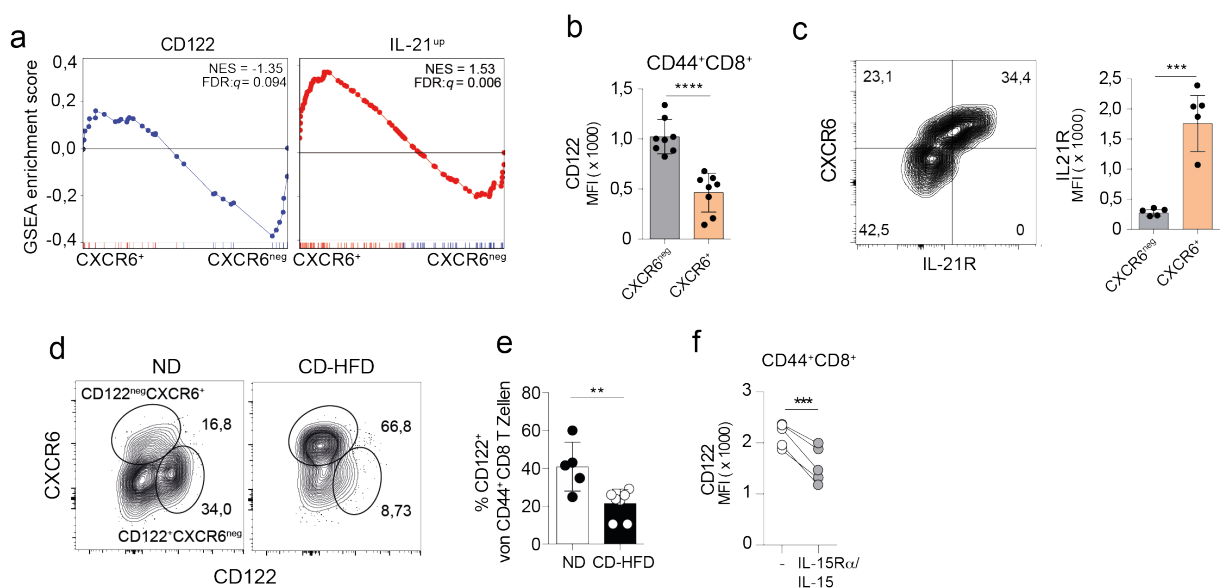
(a) Serumkonzentrationen (pg/ml) von Zytokinen und Chemokinen in ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5; CD-HFD: n=6). (b) Serumkonzentrationen (pg/ml) von IL-15 und IL-21 in ND und CD-HFD Mäusen an unterschiedlichen Zeitpunkten der Diät (ND: n=6-11; CD-HFD: n=6-11). (c) CD8<sup>+</sup>CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus der Leber sortiert und mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 für 18 Stunden stimuliert. Die Expression von Foxo1, PD-1, GzmB und CXCR3 wurde durchflusszytometrisch bestimmt (n=9). (d) CXCR6<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus der Milz sortiert und mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 für 18 Stunden stimuliert. Repräsentatives Histogramm, das die Expression von CXCR6 für CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T-Zellen zeigt, sowie die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität von CXCR6 (n=5). (e) Lymphozyten aus der Leber wurden mit IL-15R $\alpha$ /IL-15, IL-7, IL-2, TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  für 18 Stunden stimuliert. Der prozentuale Anteil an CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen von CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt (n=12). (f) Mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR6 auf sortierten CD44<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz 48 Stunden nach Aktivierung mit den jeweiligen Zytokinen (n=5). (g) Repräsentative Dot Plots von humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Expression von CD69 und CXCR6, die für sechs Tage unterschiedlich behandelt wurden (n=5). (h) Mittlere Fluoreszenz von Foxo1 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 6 nach Stimulierung mit IL-15 (n=5).

Jeder Punkt in (a-f) steht für eine Maus und jeder Punkt in (g) für einen freiwilligen Blutspender. In (a, c, g) wurde ein ungepaarter t-test, in (d) ein gepaarter t-test, in (e,f) eine ONE-Way ANOVA und in (b) eine TWO-Way ANOVA als Statistik verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.2.3 Rezeptoren für IL-15 und IL-21 sind auf CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlich exprimiert

Für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch IL-15 und IL-21 ist die Expression der jeweiligen Rezeptoren auf der Oberfläche entscheidend. Während IL-15 nur im Komplex mit IL-15R $\alpha$  und IL-2R $\beta$  (CD122) funktioniert, reicht der IL-21 Rezeptor aus, um die Signale in die Zelle weiterzuleiten (Rochman et al., 2010). Die GSEA für Gene aus dem IL-2R $\beta$  Signalweg zeigte in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen eine negative Anreicherung an, während sie für Gene aus dem IL-21 Signalweg positiv waren (Abb. 13a). Die unterschiedliche Anreicherung der Gene für beide Signalwege in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen spiegelte sich in der Expression der jeweiligen Rezeptoren wider. CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber wiesen eine schwache Expression von IL-2R $\beta$  (CD122) auf, aber eine deutliche für IL-21R (Abb. 13b,c). Auf der anderen Seite zeigten CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen eine stärkere Expression für CD122, aber keine für IL-21R (Abb. 13b,c). Auffällig war, dass der Anteil an CD122<sup>+</sup> T-Zellen von CD44<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen geringer war und dass sich die Expression von CD122 nach Stimulierung mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 in sortierten CD44<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz reduzierte (Abb. 13d-f).



**Abb. 13: Expression der Rezeptoren von IL-15 und IL-21 auf CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber.**

(a) GSEA von CD122- und IL-21R-abhängigen Genen im Vergleich mit den Datensätzen aus dem RNA-seq von CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen. (b) Mittlere Fluoreszenzintensität

## 4. Ergebnisse

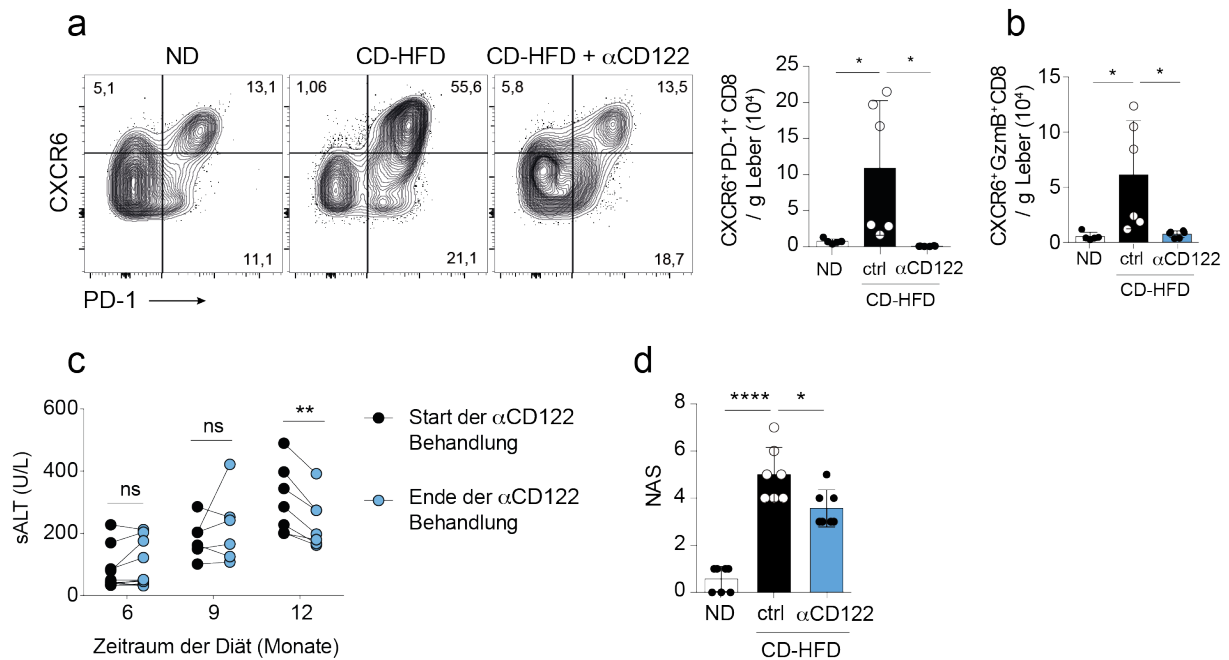
von CD122 auf CD44<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von ND-Mäusen (n=8). **(c)** Repräsentative Dot Plot für IL-21R in Kombination mit CXCR6 auf CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen aus der Leber von ND-Mäusen sowie die entsprechenden quantitativen Analysen der Fluoreszenzintensitäten von IL-21R (n=5). **(d, e)** Repräsentativer Dot Plot für CD122 in Kombination mit CXCR6 auf CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen aus der Leber von ND und CD-HFD Mäusen sowie die entsprechenden quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität von CD122 auf CD44<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (ND: n=5; CD-HFD: n=7). **(f)** CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber wurden auf CD122 sortiert und für 18 Stunden mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 stimuliert. Mittlere Fluoreszenzintensität des Rezeptors wurde vor und nach der Stimulierung ermittelt (n=5).

Jeder Punkt in **(c-f)** steht für eine Maus. In **(b, c, e)** wurde ungepaarter t-test und in **(f)** gepaarter t-test als Statistik verwendet.

### 4.2.4 Anti-CD122 Therapie in CD-HFD Mäusen reduziert den Leberschaden

Die Tatsache, dass CD122 nur auf den CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert war, die kein CXCR6 auf der Oberfläche hatten, war für einen therapeutischen Ansatz den Leberschaden in CD-HFD Mäusen zu reduzieren, vielversprechend. Die Hypothese war, dass sich durch eine unterbundene Differenzierung von immunpathogenen CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Leberschaden in CD-HFD Mäusen verringerte. Tatsächlich konnte nur bei denjenigen Mäusen, die die Diät zwölf Monate erhalten hatten, eine Reduktion des Leberschadens nachgewiesen werden (Abb. 14c). Die Abnahme der ALT-Werte war mit einem Rückgang der CXCR6<sup>+</sup>GzmB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der CXCR6<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert (Abb. 14a,b). Auch der histologische Befund spiegelte die Reduktion von NASH Symptomen wider (Abb. 14d). Die erfolgreiche Therapie des Leberschadens mit einem anti-CD122-Antikörper in CD-HFD Mäusen, die zwölf Monate NASH induzierende Diät erhalten hatten, zeigte, dass die Ausbildung einer immunpathologischen CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation gezielt verhindert werden konnte.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 14:** Anti-CD122 Therapie in CD-HFD Mäusen blockiert die Ausbildung der pathologischen CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

(a) Repräsentative Dot Plots von CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die CXCR6 und PD-1 exprimieren, in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen, die über zwölf Monate mit CD-HFD gefüttert wurden. Ein Teil der CD-HFD Mäuse erhielt eine zweiwöchige Therapie mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD122. In diesem Zeitraum wurden den Mäusen alle drei Tage mit 100  $\mu$ g  $\alpha$ CD122-Antikörper i.p. gespritzt. Quantifizierung der CXCR6<sup>+</sup>GzmB<sup>+</sup> und CXCR6<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber erfolgte für jede Versuchsgruppe nach Abschluss des Experiments (ND: n=5; CD-HFD: n=6; CD-HFD +  $\alpha$ CD122: n=6). (c) ALT-Konzentrationen im Serum von CD-HFD Mäusen, die 6, 9 oder 12 Monate mit NASH induzierender Diät gefüttert worden sind, wurden vor und nach der zweiwöchigen anti-CD122 Behandlung ermittelt (n=6). (d) Bestimmung des NAS anhand histologischer Befunde in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5; CD-HFD: n=7; CD-HFD +  $\alpha$ CD122: n=6).

Jeder Punkt in Abbildung 16 steht für eine Maus. In (a, b, d) wurde eine ONE-Way ANOVA und in (c) ein gepaarter t-test zu jedem Zeitpunkt der Diät als Statistik verwendet.

### 4.3 Regulation der Effektorfunktion von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber

Die Herunterregulierung von Foxo1 über IL-15 und IL-21 sorgte für eine Zunahme von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und für eine Differenzierung zu einem zytotoxischen Phänotyp. Für Foxo1 ist bekannt, dass durch seine Inaktivierung T-bet nicht mehr reprimiert wird und sich CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Effektor T-Zellen differenzieren können (Rao et al., 2012; Skon et al., 2013). Welche zusätzlichen Effekte die Herunterregulierung von Foxo1 auf die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat, soll in diesem Abschnitt untersucht werden.

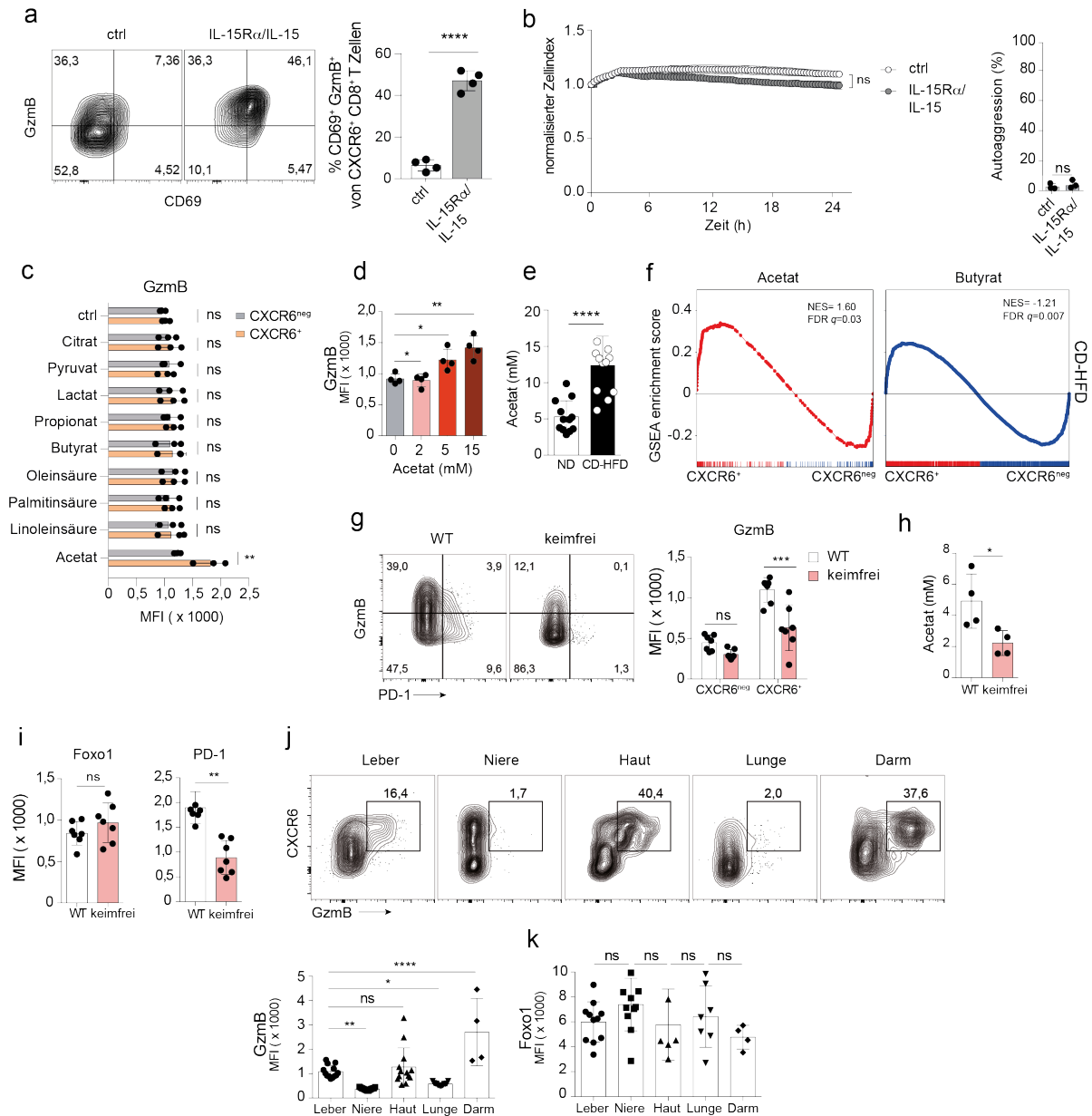
## 4. Ergebnisse

### 4.3.1 Erhöhte GzmB Level in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber hängen von der kurzkettigen Fettsäure Acetat ab

Die RNA-Sequenzierung der FACS-sortierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Lebern von CD-HFD Mäusen ergab eine Erhöhung der Transkripte von Granzym B (GzmB). Gleichzeitig zeigte die durchflusszytometrische Analyse erniedrigte Foxo1 Expression in diesen Zellen an, die für eine gesteigerte Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich sein könnte (Rao et al., 2012; Skon et al., 2013). Dadurch, dass die Erhöhung der GzmB Expression in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Stimulierung mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 nicht zur Eliminierung von Hepatozyten geführt hatte, waren zusätzliche Faktoren notwendig, die die Effektorfunktion beeinflussen konnten (Abb. 15a,b). Da NASH eine Krankheit mit einem gestörten Fettstoffwechsel ist (Friedman et al., 2018), wurden verschiedene Fettsäuren und verwandte Metabolite daraufhin untersucht, ob sie die Expression von GzmB in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen beeinflussen können. Nur die kurzkettige Fettsäure Acetat war in der Lage, die Expression von GzmB in konzentrationsabhängiger Weise zu erhöhen (Abb. 15c,d). Entsprechend höhere Acetat-Konzentration konnte in den Lebern der CD-HFD Mäusen gefunden werden (Abb. 15e). GSEA für CXCR6<sup>+</sup> im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte eine eindeutige Anreicherung von Acetat-abhängigen Genen, die nicht für Butyrat galt (Abb. 15f). Erhöhte Konzentrationen an Acetat in der Leber könnten nicht nur durch das Freisetzen aus gestressten Zellen resultieren, sondern auch als Stoffwechselprodukt einer gestörten Mikrobiota (Liu et al., 2018). Tatsächlich war eine Reduzierung der GzmB Level in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus keimfreien Mäusen zu erkennen, die nicht mit einer unterschiedlichen Expression von Foxo1 und PD-1, aber mit einer geringeren Konzentration an Acetat in der Leber zu erklären war (Abb. 15g-i). Bei der Analyse der Expression von Foxo1 und GzmB in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus unterschiedlichen Organen gab es keine eindeutige inverse Korrelation von Foxo1 und GzmB (Abb. 15j). Stattdessen kamen die erhöhten GzmB Level in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in Organen vor, die in Verbindung mit der Mikrobiota stehen. Das stützte die Hypothese, dass Stoffwechselprodukte der Mikrobiota einen Einfluss auf die Effektorfunktion haben könnten.



## 4. Ergebnisse



**Abb. 15: Die kurzketige Fettsäure Acetate erhöht die Gzmb Expression von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber.**

(a) Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz über fünf Tage mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 Stimulation für die letzten 24 Stunden. Quantifizierung des Anteils von CXCR6<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>Gzmb<sup>+</sup> T-Zellen an CD8<sup>+</sup> T-Zellen (n=4). (b) Repräsentative Messung der Zellimpedanz mittels Xcelligence<sup>®</sup> Technologie von Hepatozyten in Kokultur mit CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 stimuliert worden sind (n=3). (c) *In vitro* differenzierte CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Pyruvat (5 mM<sup>98</sup>), Citrat (5 mM), Lactate (5 mM), Acetate (5 mM), Propionat (0,5 mM), Butyrat (0,5 mM), Linolensäure (100  $\mu$ M), Oleinsäure (100  $\mu$ M) oder Palmitinsäure (50  $\mu$ M) für 24 Stunden kultiviert und die mittlere Fluoreszenzintensität von Gzmb Expression wurde gemessen (n=3). (d) CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Acetate für 24 Stunden *in vitro* kultiviert und die mittlere Fluoreszenzintensität von Gzmb Expression bestimmt (n=4). (e) Konzentration von Acetate in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND, CD-HFD: n=12). (f) GSEA von Acetate- und Butyrat-abhängigen Genen im Vergleich mit den Datensätzen aus dem RNA-seq von CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen. (g) Mittlere Fluoreszenzintensität von Gzmb in CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von WT und keimfreien Mäusen (n=7). (h) Konzentration von Acetate in der Leber von WT und keimfreien Mäusen (n=4). (i) Mittlere Fluoreszenzintensität von Foxo1 und PD-1 in CXCR6<sup>+</sup> T-

<sup>98</sup> Millimolar

## 4. Ergebnisse

Zellen in der Leber von WT und keimfreien Mäusen (n=7). (**j, k**) Mittlere Fluoreszenz von GzmB und Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber, Niere, Haut, Lunge und Darm (n=4-11).

Jeder Punkt in (**e, g-k**) steht für eine Maus und jeder Punkt in (**a-d**) für ein unabhängiges Experiment. In (**d, j, k**) wurde eine ONE-Way ANOVA, in (**c, g**) eine TWO-Way ANOVA und in (**a, b, e, h, i**) ein gepaarter t-test als Statistik verwendet.

### 4.3.2 Acetat erhöht die Expression von GzmB und TNF spezifisch in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit niedriger Foxo1 Aktivität

Die kurzkettige Fettsäure Acetat erhöhte die Expression von GzmB in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber ob dieser Effekt mit der transkriptionellen Aktivität von Foxo1 zusammenhing war nicht klar. In der Tat wiesen nur *in vitro* differenzierte CXCR6<sup>+</sup> und nicht CXCR6<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Erhöhung von GzmB durch Zugabe von Acetat auf (Abb. 16a). Durch retroviraler Überexpression von Foxo1 in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, fiel die Erhöhung von GzmB in Anwesenheit von Acetat geringer aus als in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit bedeutungslosen viralen Partikeln transduziert worden waren (Abb. 16b). Nicht nur eine geringere transkriptionelle Aktivität in CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen war für die gesteigerte Expression von GzmB bei Zugabe von Acetat entscheidend, auch die gleichzeitige Stimulierung mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 war dafür wichtig (Abb. 16c). Diese Beobachtung konnte auch in anderen zytotoxischen Lymphozyten wie NK Zellen und NKT-Zellen nachgewiesen werden, aber nicht in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 16d). Neben GzmB wurde der Einfluss von Acetat auch auf andere Effektormoleküle untersucht. Die Expression von TNF konnte in Gegenwart von Acetat in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gesteigert werden, die Expression von IFN $\gamma$ , FasL, TRAIL und NK2DG waren hingegen unverändert (Abb. 16e). Warum der Effekt nur in diesen Zellen auftrat, wurde anhand von Parametern untersucht, die die Expression von Effektormolekülen steigern könnten: erhöhte Glykolyse, vermehrte Expression von T-bet, Aktivierung von Signalwegen oder Abnahme von inhibitorischen Rezeptoren auf der Oberfläche. Weder für *ex vivo* noch *in vitro* IL-15R $\alpha$ /IL-15 stimulierte CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine Erhöhung dieser Parameter nach Zugabe von Acetat beobachtet werden (Abb. 16f-j). Auch eine verstärkte Aufnahme von Acetat war nicht zu erkennen (Abb. 16k). Acetyl-CoA ist ein wichtiges Stoffwechselprodukt, das in den Zellen für eine Vielzahl von metabolischen Prozessen wichtig ist, u.a. für die Acetylierung von Histonen (Pietrocola et al., 2015).

#### 4. Ergebnisse

Mithilfe von Inhibitoren, die die Aktivität von ACLY<sup>99</sup>, ACSS2<sup>100</sup> und HATs<sup>101</sup> blockierten, konnte eine Erhöhung von GzmB und TNF durch Acetat mit dem ACSS2 Inhibitor unterbunden werden (Abb. 16l). Die Blockade der HATs konnte auch die Erhöhung von GzmB durch Acetat verhindern, aber nicht von TNF. Die unterschiedliche Regulation der beiden Moleküle spiegelte sich in der unterschiedlichen Transkription der Gene für GzmB und TNF wider. Während die mRNA von GzmB durch Acetat erhöht war, blieb sie für TNF gleich (Abb. 16m). Diese Daten deuteten darauf hin, dass die Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA kritisch für die erhöhte Expression von GzmB und TNF war.

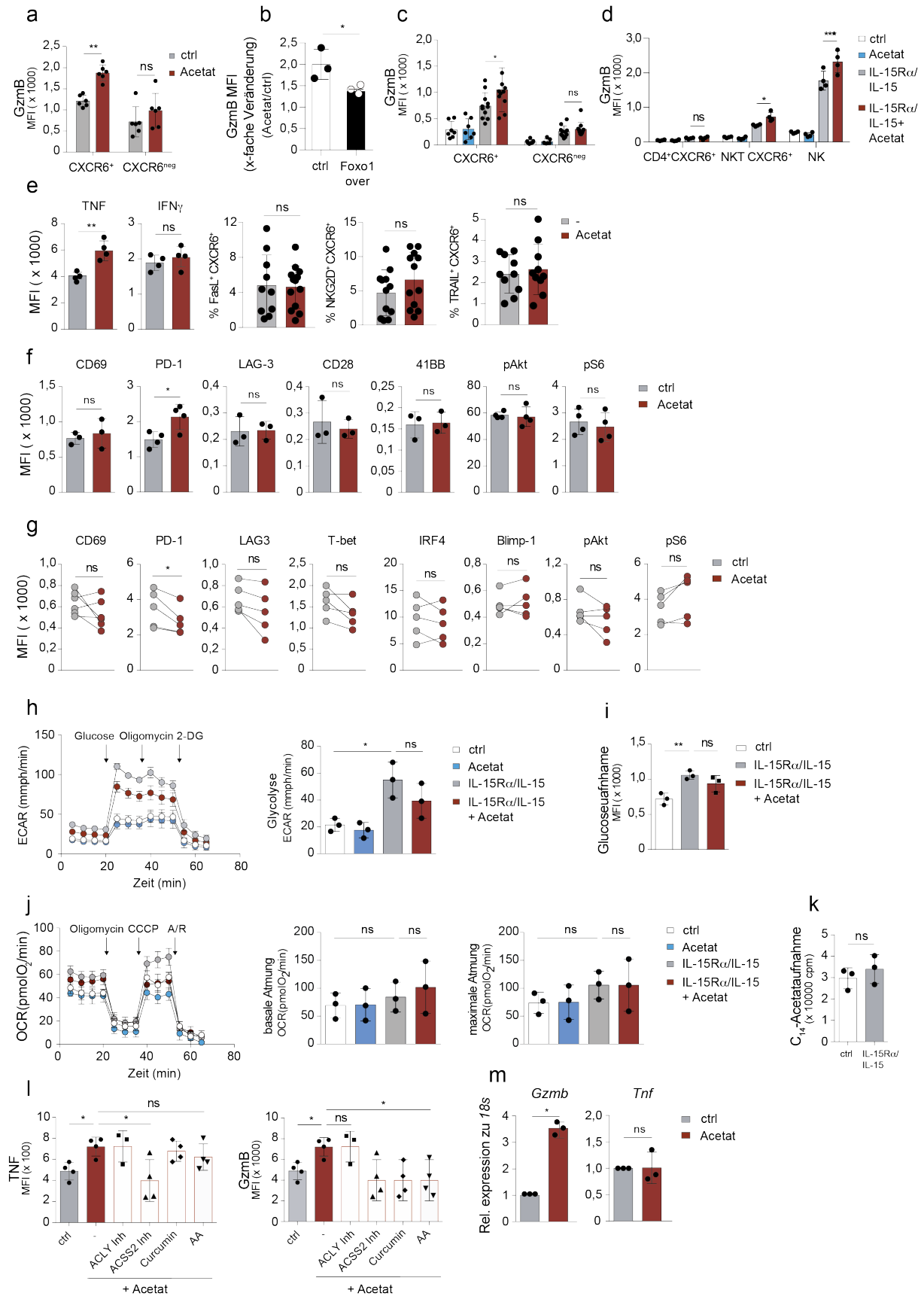
---

<sup>99</sup> Engl.: ATP citrate lyase

<sup>100</sup> Engl.: Acetyl-CoA synthetase 2

<sup>101</sup> Engl.: Histone acetyl transferases

## 4. Ergebnisse



**Abb. 16: Mechanismus der Erhöhung von Effektormolekülen durch Acetat in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen.**

(a) Mittlere Fluoreszenzintensität von Gzmb in CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>neg</sup> T-Zellen in Abhängigkeit von Acetat (15 mM) *in vitro* (n=6). (b) Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität von Gzmb zwischen *in vitro* aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von Acetat (15 mM), die mit Retroviren transduziert worden sind,

## 4. Ergebnisse

die entweder Foxo1 überexprimieren oder ein irrelevantes Plasmid (ctrl) trugen (n=3). **(c, d)** Lymphozyten aus der Leber wurden mit Acetat (15 mM) und IL-15R $\alpha$ /IL-15 für 18 Stunden *ex vivo* stimuliert und die mittlere Fluoreszenzintensität von GzmB in CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie in CXCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CXCR6<sup>+</sup> NKT-Zellen und NK Zellen wurde ermittelt (n=5-10). **(e)** Mittlere Fluoreszenzintensität von TNF, und IFN $\gamma$  sowie prozentualer Anteil an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die positiv für FasL, NKG2D und TRAIL waren, in Anwesenheit von Acetat (15 mM). Für die Analyse von TNF und IFN $\gamma$  wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin für vier Stunden reaktiviert (n=3-5). **(f)** Mittlere Fluoreszenzintensität von verschiedenen Oberflächenmolekülen und Kinasen in *in vitro* differenzierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Kultivierung mit Acetat (15 mM) für 24h (n=3). **(g)** IL-15R $\alpha$ /IL-15 stimulierte Lymphozyten aus der Leber wurden mit Acetat (15 mM) für 18 Stunden *ex vivo* kultiviert und die mittlere Fluoreszenzintensität von verschiedenen Molekülen in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde ermittelt (n=5). **(h)** Repräsentatives Schaubild für eine metabolische Analyse der Glykolyse in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Seahorse XF Flux Analyzer mit quantitativer Auswertung der Glykolyse. Dazu wurde die Differenz der ECAR-Werten nach Glukosezugabe mit den basalen Werten gebildet. ECAR gibt die Rate der Ansäuerung (mmpH) im Medium pro Minute an. **(i)** Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität eines fluoreszierenden Glukoseanalogons, um die Aufnahme von Glukose in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* in Anwesenheit von Acetat zu analysieren (n=3). **(j)** Repräsentatives Schaubild für eine metabolische Analyse der Glykolyse in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Seahorse XF Flux Analyzer mit quantitativer Auswertung der Glykolyse. Dazu wurde die Differenz der ECAR-Werten nach Glukosezugabe mit den basalen Werten gebildet. ECAR gibt die Rate der Ansäuerung (mmpH) im Medium pro Minute an. **(k)** Messung der Aufnahme von Acetat mittels radioaktiv-markierten Acetat in TGF $\beta$  bzw. IL-15R $\alpha$ /IL-15 stimulierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (n=3). **(l)** Mittlere Fluoreszenzintensitäten von TNF und GzmB in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Acetat und unterschiedlichen Inhibitoren für 24 Stunden behandelt worden waren. Für die Analyse von TNF wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin für vier Stunden reaktiviert (n=4). **(m)** Quantitative Bestimmung der mRNA von *Gzmb* und *Tnf* in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Acetat für 24 Stunden kultiviert worden waren (n=3).

Jeder Punkt in **(c, d, g)** steht für eine Maus und jeder Punkt in **(a, b, e, f, h-m)** für ein unabhängiges Experiment. In **(b, e, f, k, m)** wurde ein ungepaarter t-test, in **(g)** ein gepaarter t-test, in **(h-i, l)** eine ONE-Way ANOVA und in **(a, c, d)** eine TWO-Way ANOVA als Statistik verwendet.

### 4.4 Antigen-unabhängige Eliminierung von Hepatozyten durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die erfolgreiche Reduzierung des Leberschadens in CD-HFD Mäusen durch die anti-CD122 Therapie und das Fehlen einer klonalen Expansion der immunpathogenen CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, deutete darauf hin, dass ein antigen-unabhängiger Mechanismus für den Leberschaden bei NASH vorliegen muss. Da in NASH eine sterile Entzündung der Leber vorliegt, wurden Zellen des adaptiven Immunsystems bisher nicht in Zusammenhang mit direkter Gewebeschädigung gebracht (G. Y. Chen & Nunez, 2010). In diesem Abschnitt soll untersucht werden, welchen funktionellen Einfluss Acetat auf die Effektorfunktion der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber Hepatozyten besitzt.

## 4. Ergebnisse

### 4.4.1 Keine gesteigerte antigen-spezifische Eliminierung von Hepatozyten durch Acetat-behandelte CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Acetat bewirkte über unterschiedliche Mechanismen eine Erhöhung von GzmB und TNF in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität. Ob durch die Zugabe von Acetat die Eliminierung von Zielzellen durch CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ohne die Präsentation von Antigenen erfolgte, wurde an murinen Hepatozyten getestet. Mithilfe der Xcelligence<sup>®</sup>-Technologie war es möglich, die Dynamik der Eliminierung von Hepatozyten zu verfolgen. Nur CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die eine erniedrigte Foxo1 Aktivität aufwiesen, oder aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit einem Foxo1 Inhibitor behandelt worden waren, waren in der Lage bis zu 50 % aller Hepatozyten nach 24 Stunden in Anwesenheit von Acetat zu eliminieren (Abb. 17a,b). Die Zugabe von Acetat bei CXCR6<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die eine höhere Foxo1 Aktivität besitzen, oder bei aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die nicht mit einem Foxo1 Inhibitor behandelt worden waren, hatte keine Auswirkung auf das antigen-unspezifischen Eliminieren von Hepatozyten (Abb. 17a,b). Acetat hatte dagegen keinen zusätzlichen Effekt auf die antigen-spezifische Immunantwort von CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber Zielzellen. Sowohl die Präsentation von verschiedenen Ovalbumin-Antigenen, in unterschiedlicher Affinität mit dem T-Zellrezeptor interagieren, als auch von SIINFEKL, das in verschiedenen Konzentrationen getestet wurde, für antigen-spezifische CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, zeigte keinen Unterschied in der Eliminierung von Zielzellen (Abb. 17c,d). Um eine antigen-unspezifische Immunantwort von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität in Anwesenheit von Acetat *in vivo* zu überprüfen, wurden Mäuse mit hepatotropen Adenoviren infiziert, die für die Gene Ovalbumin, GFP<sup>102</sup> und Luziferase codieren. Ovalbumin diente dabei als Antigen, GFP, um infizierte Zellen in der Leber zu lokalisieren, und Luziferase dazu, die Virusinfektion in der Leber *in vivo* longitudinal zu messen. Für diesen Versuch wurden unterschiedlich behandelte antigen-spezifische CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die infizierten Mäuse gespritzt. Erstaunlicherweise eliminierte die Gruppe, die vor dem Transfer mit IL15R $\alpha$ /IL-15 und Acetat behandelt worden war, das Virus am schlechtesten (Abb. 17e). Zwischen den anderen Behandlungsgruppen gab es keine

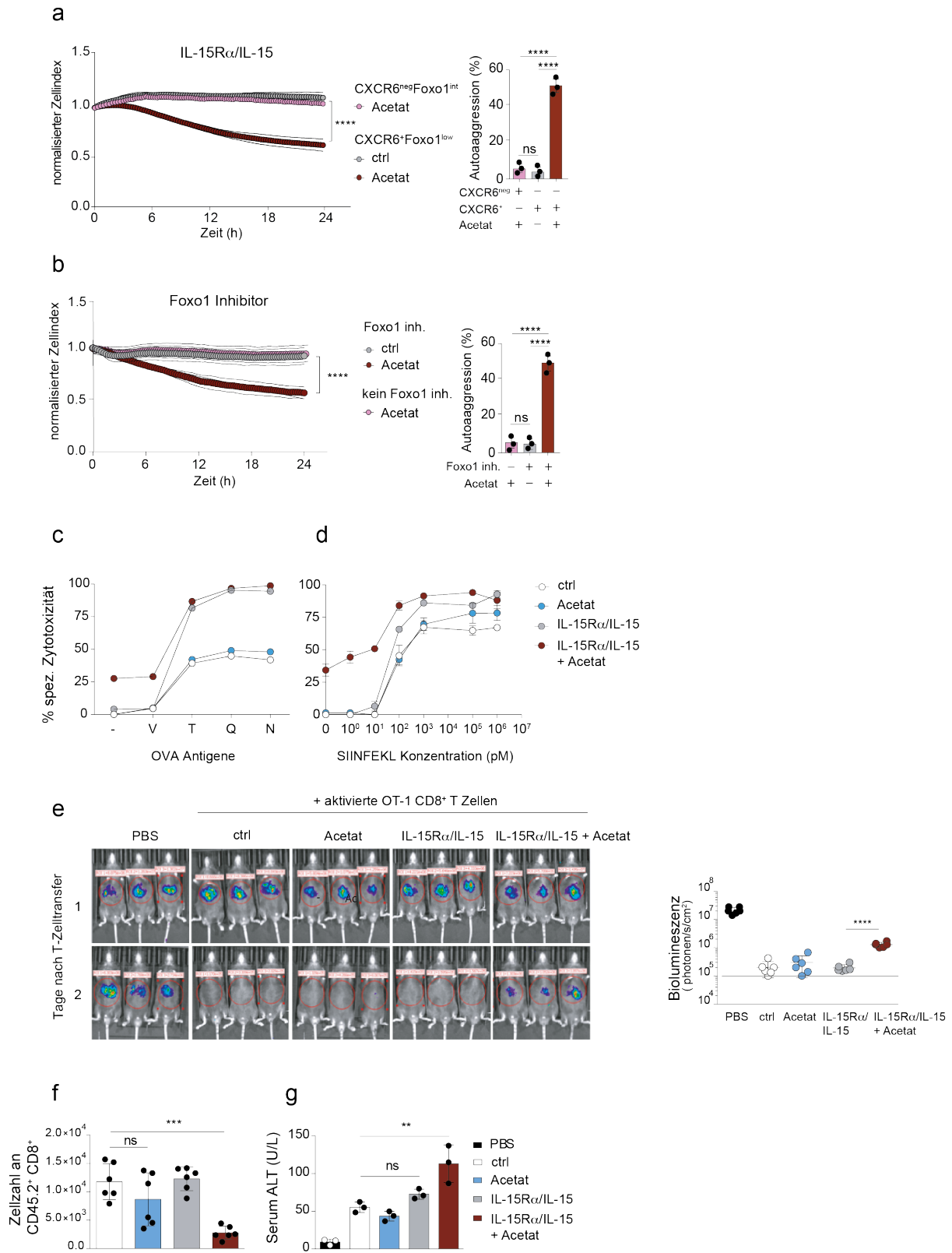
---

<sup>102</sup> Engl.: Green-fluorescent protein

#### 4. Ergebnisse

Unterschiede bei der Eliminierung des Virus. Bei der Analyse der antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag zwei nach Transfer, waren in der Leber weniger von denjenigen Zellen zu finden, die vor der Injektion mit IL15R $\alpha$ /IL-15 und Acetat behandelt worden waren (Abb. 17f). Überraschenderweise hatten aber Mäuse, die diese Zellen erhalten hatten, im Vergleich zu den erfolgreich eliminierten Mäusen eine höhere ALT (Abb. 17g). Diese Daten zeigten, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit geringer Foxo1 Aktivität in Anwesenheit von Acetat Zielzellen antigen-unabhängig *in vitro* und *in vivo* eliminieren konnten.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 17:** Nach Inkubation mit Acetat eliminieren CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen Zielzellen antigen-unabhängig.

(a, b) Repräsentative Messung der Zellimpedanz mittels Xcelligence<sup>®</sup> Technologie von Hepatozyten in Kokultur mit CXCR6<sup>+</sup>Foxo1<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. CXCR6<sup>+</sup>Foxo1<sup>int</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder mit aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit einem Foxo1 Inhibitor behandelt worden sind. Für einige Konditionen wurde die Kokultur mit Acetat (15 mM) versetzt. Der Term „Autoaggression“ bezeichnet die antigen-unabhängige Eliminierung der Zielzellen. Die Berechnung der Autoaggression (%) erfolgte aus dem normalisierten Zellindex, der für die Kontrolle und der zu vergleichenden Kondition 24 Stunden nach Start der Kokultur ermittelt wurde



## 4. Ergebnisse

(n=3). **(c, d)** *In vitro* differenzierte und unterschiedlich behandelte OT-1 CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Milzzellen in einem Verhältnis von 3:1 (T-Zellen:Milzzellen) für 16h kokultiviert, die entweder mit unterschiedlich affinen Ovalbumin-Antigenen oder mit SIINFEKL in verschiedenen Konzentrationen beladen wurden. Die Bestimmung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte mittels Durchflusszytometrie über die Anzahl an toten CFSE-markierte Milzzellen abzüglich der negativen Kontrolle ohne Effektorzellen. **(e)** Biolumineszenz von AdGOL-infizierten Lebern von Mäusen, die unterschiedlich behandelte aktivierte OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhalten haben. Aufnahmen von je 3 Mäusen an Tag 1 und 2 nach Transfer der Zellen sowie die entsprechende quantitative Analyse der Biolumineszenz an Tag 2. Linie bei 10<sup>5</sup> Photonen/s/cm<sup>2</sup> gibt die Intensität an, bei der von einer kompletten Eliminierung der Viren in der Leber ausgegangen wird (n=6). **(f)** Quantitative Bestimmung der Zellzahl der transferierten CD45.2<sup>+</sup> OT-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag zwei nach Transfer (n=6). **(g)** Serumkonzentration der ALT (n=3).

Jeder Punkt in **(e-g)** steht für eine Maus und in **(a-d)** für ein unabhängiges Experiment. In **(a, b, e-g)** wurde eine ONE-Way ANOVA als Statistik verwendet.

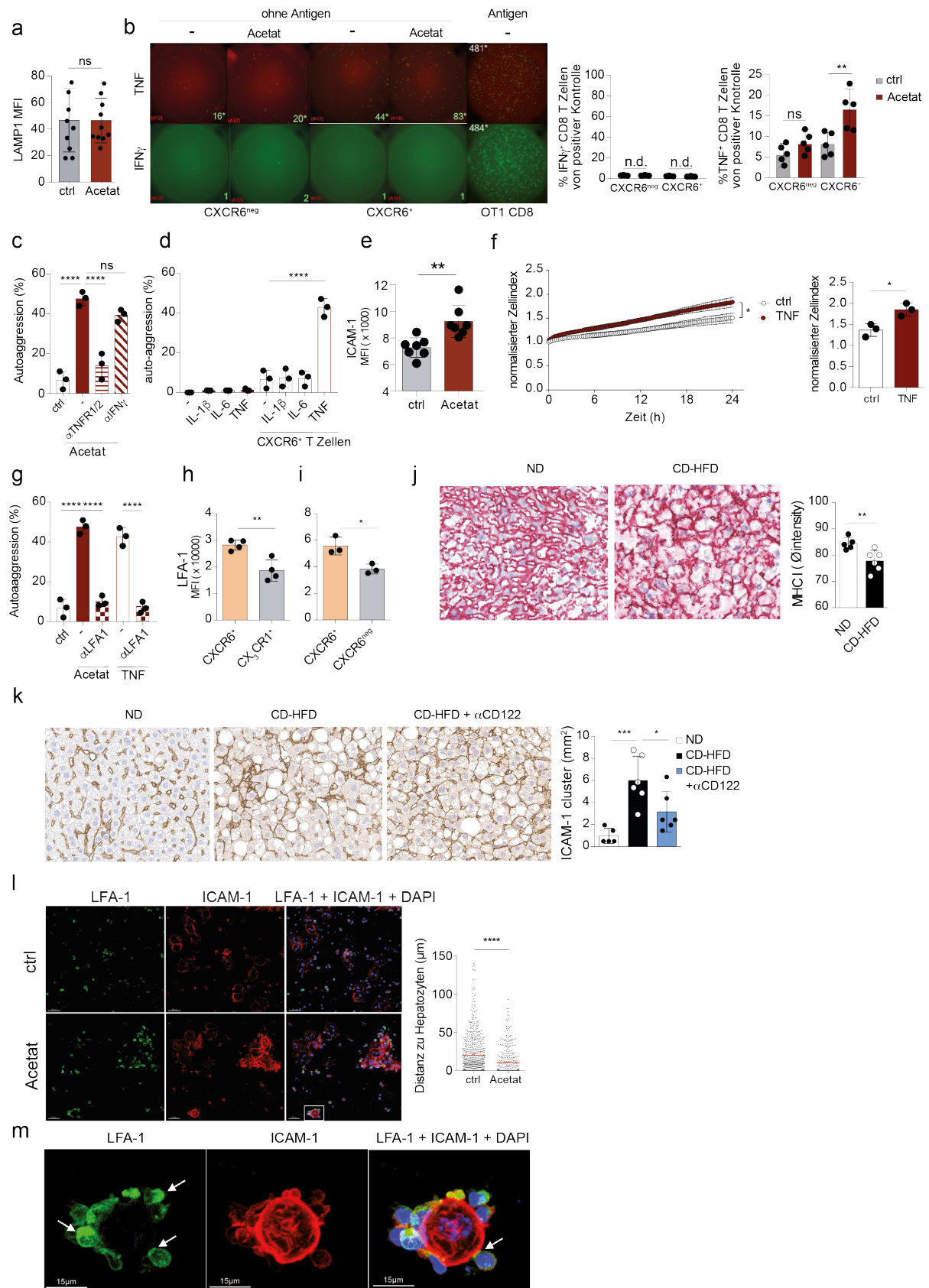
### 4.4.2 Die antigen-unabhängige Eliminierung von Hepatozyten durch Acetat-exponierte CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist abhängig von TNF und LFA-1

Acetat erhöhte die Expression von GzmB und TNF in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität und sorgte dafür, dass Hepatozyten unabhängig von einem Antigen eliminiert werden konnten (Abb. 17a,b). In der Literatur ist lediglich bekannt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen autoreaktiv sein müssen, um unter sterilen Bedingungen Gewebe schädigen zu können (Mieli-Vergani et al., 2018). Der genaue Mechanismus der antigen-unabhängigen Zytotoxizität von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber Hepatozyten in Anwesenheit von Acetat könnte Aufschluss geben, wie auch nicht autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen Leberschaden anrichten können. Um den Mechanismus besser zu verstehen, wurden zuerst die Bedingungen ermittelt, die für das antigen-unspezifische Eliminieren von Hepatozyten entscheidend waren. Die Ergebnisse für die Effekte von Acetat auf CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zielten bisher auf die zell-intrinsischen Folgen ab, aber unklar war, ob es bei einer antigen-unabhängigen Immunantwort zu Freisetzungen von GzmB, TNF oder IFN $\gamma$  kam. Einzig TNF wies eine gesteigerte Freisetzung durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von Acetat auf, während es bei der Degranulierung und der Freisetzung von IFN $\gamma$  keinen Unterschied durch Acetat gab (Abb. 18a,b). Die Bedeutung der gesteigerten Sekretion von TNF zeigte sich bei der Hemmung der Zytotoxizität von Hepatozyten durch Acetat-behandelte CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe von blockierenden Antikörpern gegen beide TNF Rezeptoren (Abb. 18c). Die Kombination aus externer Zugabe von TNF und IL-

#### 4. Ergebnisse

15R $\alpha$ /IL-15 stimulierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen war ausreichend, um Hepatozyten in antigen-unabhängiger Weise zu eliminieren (Abb. 18d). Da TNF keinen direkt zytotoxischen Effekt auf die Hepatozyten hatte, wurde überprüft, inwiefern TNF die Hepatozyten veränderte, damit sie von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen eliminiert werden konnten. Für eine erfolgreiche und effiziente Immunantwort von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist eine stabile Synapse zur Zielzelle notwendig (Zitat (Fooksman et al., 2010)). Da beim antigen-unabhängigen Mechanismus die Synapse über TCR und MHC-I im Komplex mit Antigen keine Rolle spielte, wurde vermutet, dass die Adhäsion über ICAM-1 und LFA-1 ausreichte, um die Effektorfunktion auszuüben. Ein erster Hinweis darauf, dass diese Achse entscheidend war, war die Erhöhung von ICAM-1 auf den Hepatozyten, die in Kultur mit Acetat-exponierten CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren (Abb. 18e). TNF erhöhte die adhäsive Oberfläche von Hepatozyten, das am erhöhten Zellindex (murine Hepatozyten teilen sich unter *in vitro* Bedingungen nicht) zu erkennen war (Abb. 18f). Die Blockade von LFA-1 (CD11a) auf T-Zellen, welches ein wichtiges Integrin beim Aufbau der Synapse mit der Zielzelle über ICAM-1 ist, verhinderte das Eliminieren der Hepatozyten (Abb. 18e-h). Die Achse ICAM-1/LFA-1 dürfte auch *in vivo* eine Rolle spielen, da zum einen CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt LFA-1 exprimieren und zum anderen in der Leber von NASH Mäusen im Vergleich zu ND Mäusen mehr ICAM-1<sup>+</sup> Bereiche zu finden waren (Abb. 18h,k). Im Gegensatz dazu war die Expression von MHC-I in der Leber von CD-HFD Mäusen reduziert (Abb. 18j). Die anti-CD122 Therapie sorgte dafür, ICAM-1<sup>+</sup> Bereiche kleiner wurden (Abb. 18k). Konfokale, mikroskopische Aufnahmen von Hepatozyten und CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigten die Vermutung, dass sich trotz fehlender Interaktion zwischen TCR und dem MHC-I:Peptid Komplex, eine Synapse zwischen diesen Zellen ausbildete und sich die Anzahl dieser unter Zugabe von Acetat erhöhte (Abb. 18l,m).

## 4. Ergebnisse



**Abb. 18: Antigen-unabhängiges Eliminieren von Hepatozyten durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist abhängig von TNF und LFA-1.**

(a) Mittlere Fluoreszenzintensität von membrangebundenen LAMP1 auf CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von Acetat (15 mM) *in vitro* (n=9). (b) 5x10<sup>4</sup> *in vitro* differenzierte CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 24 Stunden mit Acetat (15 mM) inkubiert. Antigen-spezifische Aktivierung von CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>

## 4. Ergebnisse

OT1 T-Zellen erfolgte für zwei Stunden in Anwesenheit von SIINFEKL (10 nM). TNF<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Spots wurden quantifiziert und der Anteil an TNF<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Spots im Vergleich zur positiver Kontrolle berechnet (n=5). **(c)** Autoaggression von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Hepatozyten 24 Stunden nach Start der Kokultur in Anwesenheit von Acetat und blockierenden Antikörpern gegen TNFR1 und TNFR2<sup>103</sup> und IFN $\gamma$  (n=3). **(d)** Analyse der Autoaggression von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Hepatozyten 24 Stunden nach Start der Kokultur in Anwesenheit von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen (n=3). **(e)** Mittlere Fluoreszenz von ICAM-1 auf Hepatozyten in Kokultur mit Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (n=7). **(f)** Zellindex von Hepatozyten 24 Stunden nach TNF (5 ng/ml) Behandlung (n=3). **(g)** Autoaggression von Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Hepatozyten. Einige Kokulturen wurden mit TNF-vorbehandelten Hepatozyten und mit blockierenden Antikörpern gegen LFA-1 durchgeführt (n=3). **(h, i)** Analyse der mittleren Fluoreszenz von CD11a (LFA-1) auf verschiedenen CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellpopulationen *ex vivo* und *in vitro* (*ex vivo*: n=4; *in vitro*: n=3). **(j)** Quantitative Analyse der Intensität der Färbung von MHC-I in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen (ND: n=5; CD-HFD: n=6). **(k)** Immunhistochemische Analyse der Fläche (mm<sup>2</sup>) in der Leber von unterschiedlichen Behandlungsgruppen, die positive Signale für ICAM-1 zeigten (ND: n=5; CD-HFD: n=7; CD-HFD + aCD122: n=6). **(l)** *In vitro* differenzierte Acetat-behandelte CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Hepatozyten für 24h kokultiviert. Für die Visualisierung der immunologischen Synapse wurden T-Zellen mit LFA-1 und Hepatozyten sowie T-Zellen anhand der Expression von ICAM-1 detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI<sup>104</sup> gefärbt, sodass Hepatozyten anhand der Größe und den zahlreichen Zellkernen identifiziert werden konnten. Aufnahmen wurden mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Anhand sechs mikroskopischer Aufnahmen für beide Konditionen wurde die mittlere Distanz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu den Hepatozyten ermittelt. **(m)** Eine beispielhafte Interaktion von Hepatozyten mit mehreren CD8<sup>+</sup> T-Zellen in höherer Auflösung (vergrößerte Stelle wurde mit einem weißen Kästchen umrandet). Pfeile geben die Polarisation von LFA-1 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen an.

Jeder Punkt in **(j, k)** steht für eine Maus und jeder Punkt in **(a-i)** für ein unabhängiges Experiment. In **(a, e, f, h-j, i)** wurde ein ungepaarter t-test und in **(b-d, g, k)** eine ONE-Way ANOVA als Statistik verwendet.

### 4.4.3 Extrazelluläres ATP (eATP) aktiviert autoaggressive CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die LFA-1/ICAM Achse und TNF wurden als kritische Faktoren für das antigen-unabhängige Eliminieren von Hepatozyten ermittelt. Unklar war bisher, welches Aktivierungssignal die CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen dazu veranlasst, ihre Effektorfunktion unabhängig vom T-Zellrezeptorsignal auszuüben. Nach Aktivierung von T-Zellen durch antigen-präsentierende Zellen werden unterschiedliche Signalwege in den T-Zellen aktiviert, was eine Vielzahl an verschiedenen Prozessen in Gang setzt (Gaud et al., 2018). Das Eliminieren von Hepatozyten über einen antigen-unabhängigen Mechanismus führte zuerst zu der Vermutung, dass erhöhte tonische Aktivierung über die Interaktion vom T-Zellrezeptor mit MHC-I Molekülen für dieses Phänomen verantwortlich war. Phosphorylierungen von verschiedenen Schlüsselenzymen im T-Zellrezeptorsignalweg wurden überprüft, aber Acetat

---

<sup>103</sup> Engl.: Tumor-necrosis factor receptor 2

<sup>104</sup> 4',6-Diamidin-2-phenylindol

#### 4. Ergebnisse

hatte keinen Einfluss auf diese Signalwege (Abb. 19a). Auch die Verwendung von Hepatozyten aus  $\beta_2m^{-/-}$  Mäusen, denen MHC-I Moleküle fehlten, sorgte für kein Aufheben der Eliminierung von Hepatozyten durch Acetat-exponierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 19b). Genauso sorgte die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen MHC-I und PD-1 für keine Reduktion bzw. Erhöhung der Zytotoxizität (Abb. 19b). Inhibitoren, die spezifisch einzelne Signalwege blockierten, und Acetat wurden gemeinsam in die Kokultur von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hepatozyten hinzugefügt. Dabei stellte sich heraus, dass Cyclosporin A (Calcineurin-Inhibitor), Wortmannin (PI3K Inhibitor) und EGTA die Zytotoxizität der T-Zellen aufheben konnten (Abb. 19c). Chemikalien, die ERK<sup>105</sup> (UO126) und PLC $\gamma$ <sup>106</sup>(Edelfosin) blockierten, hatten keinen Einfluss (Abb. 19c). Da Edelfosin keinen Effekt auf das Eliminieren der Hepatozyten hatte, wurde vermutet, dass extrazelluläres Calcium einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben könnte. Tatsächlich gab es spezifisch in *in vitro* differenzierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen höhere Calciumkonzentrationen als in der CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation (Abb. 19i). Eine Vielzahl an verschiedenen Substanzen wurde getestet, um die Liganden zu ermitteln, die den erhöhten Calciumeinstrom in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen verursachten. Extrazelluläres ATP und Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) waren die einzigen Liganden, die dazu in der Lage waren (Abb. 19d). Die Ursache des erhöhten Calciumeinstroms spezifisch in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich anhand der Expression vom purinergen Rezeptors P2X7, der verstärkt auf diesen Zellen zu finden war (Abb. 19e). Mit einem P2XR7 Inhibitor konnte der durch eATP und NAD<sup>+</sup> verursachte Calciumeinstrom in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterbunden werden (Abb. 19f,g). Im Überstand der Kultur von Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Hepatozyten konnten erhöhte ATP-Konzentrationen gemessen werden, die über Pannexin I freigesetzt werden (Abb. 19h). Das könnte zum verstärkten Calciumeinstrom in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen geführt haben, wenn sie zusammen mit Hepatozyten kultiviert worden waren (Abb. 19i,j). Hervorzuheben war, dass die Aktivierung über P2XR7 entscheidend für das antigen-unabhängige Eliminieren von Hepatozyten war, da Inhibitoren gegen Pannexin I und P2XR7 die Zytotoxizität der Acetat-behandelten

---

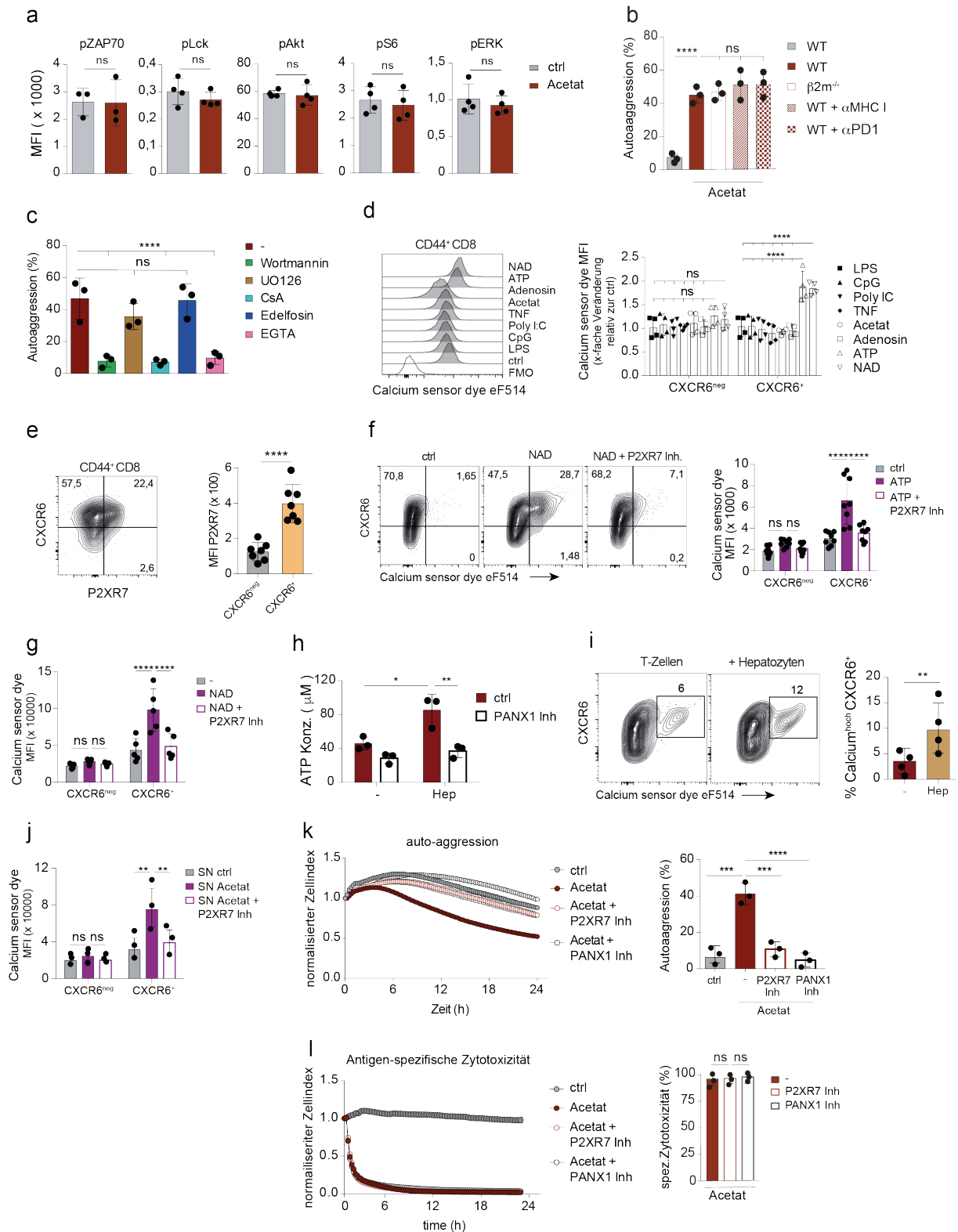
<sup>105</sup> Engl.: Extracellular Signal-regulated Kinase-1

<sup>106</sup> Engl.: Phosphoinositid-Phospholipase C gamma

#### 4. Ergebnisse

CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber Hepatozyten erfolgreich verhindert haben (Abb. 19k). Diese Form der Aktivierung spielte bei der antigen-spezifischen Immunantwort dagegen keine Rolle (Abb. 19l).

## 4. Ergebnisse



**Abb. 19: Einstrom von extrazellulärem Calcium in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist kritisch für antigen-unabhängiges Eliminieren von Hepatozyten.**

(a) Mittlere Fluoreszenzintensität von phosphorylierten Kinasen, die im T-Zellrezeptorsignalweg wichtig sind, in Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (n=4). (b) Autoaggression von Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber Hepatozyten. Einige Kokulturen von Hepatozyten und T-Zellen wurden mit blockierenden Antikörpern gegen MHC-I und PD-1 versetzt. In einem Ansatz wurden Hepatozyten aus  $\beta_2m^{-/-}$  Mäusen isoliert (n=3). (c) Autoaggression von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von Acetat

## 4. Ergebnisse

gegenüber Hepatozyten. Einige Kokulturen wurden zusätzlich mit Inhibitoren wie Wortmannin ( $10 \text{ nM}^{107}$ ), UO126 ( $100 \text{ nM}$ ), CsA ( $1 \mu\text{M}^{108}$ ), Edelfosin ( $10 \mu\text{M}$ ) oder EGTA ( $2 \text{ mM}$ ) inkubiert ( $n=3$ ). Mittlere Fluoreszenzintensität eines Farbstoffs, der intrazelluläres Calcium detektieren kann, in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe von unterschiedlichen Reagenzien für 15 Minuten ( $n=4$ ). **(e)** Mittlere Fluoreszenzintensität der P2XR7 Expression von *in vitro* differenzierten CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $n=7$ ). **(f, g)** Mittlere Fluoreszenzintensität des Calcium-sensitiven Farbstoffs in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe von ATP und NAD für 15 Minuten und in Anwesenheit eines P2XR7 Inhibitors (A-438079,  $100 \mu\text{M}$ ) ( $n=4$ ). **(h)** Bestimmung der Konzentration von ATP im Überstand von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kokultur mit Hepatozyten. In die Kultur wurde zusätzlich Acetat ( $15 \text{ mM}$ ) hinzugefügt ( $n=3$ ). **(i)** Prozentualer Anteil an Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die erhöhten Calciumeinstrom aufwiesen und die für 24 Stunden mit Hepatozyten inkubiert worden waren ( $n=4$ ). **(j)** Mittlere Fluoreszenzintensität des Calcium-sensitiven Farbstoffs in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe von Zellkulturüberstand aus den Konditionen von **(i)** und eines P2XR7 Inhibitors (A-438079,  $100 \mu\text{M}$ ) ( $n=3$ ). **(k)** Autoaggression von Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber Hepatozyten. In einigen Konditionen wurde der Kokultur Inhibitoren gegen Pannexin I ( $200 \mu\text{M}$ ) oder P2XR7 hinzugefügt ( $n=3$ ). **(l)** Spezifische Zytotoxizität von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> OT1 T-Zellen gegenüber Hepatozyten, die SIINFEKL ( $10 \text{ nM}$ ) präsentierten. In einigen Bedingungen wurden Inhibitoren gegen Pannexin I oder P2XR7 hinzugefügt. Jeder Punkt in Abbildung 21 steht für ein unabhängiges Experiment. In **(d, f-h, j)** wurde eine TWO-Way ANOVA, in **(b, c, k, l)** eine ONE-Way ANOVA und in **(a, e, i)** ein ungepaarter t-Test als Statistik verwendet.

### 4.4.4 Acetat-exponierte CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen eliminieren Hepatozyten über Fas-FasL Interaktion

CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten erhöhte Calciumkonzentrationen in Anwesenheit von Acetat, das zu einer erhöhten Sekretion von TNF führte. Erhöhte Level von TNF waren kritisch, um über verstärkte Adhäsion die Interaktion von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hepatozyten zu unterstützen. Unklar war noch, welche Effektormoleküle durch P2XR7-Aktivierung reguliert werden und welcher Mechanismus für die Eliminierung der Hepatozyten durch P2XR7-aktivierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich war. Eine kurze Exposition mit extrazellulärem ATP erhöhte die Anzahl an TNF-produzierenden CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 20a). Die Erhöhung der TNF Freisetzung war abhängig von P2XR7 und galt nicht für IFN $\gamma$  (Abb. 20a). Da keine verstärkte Degranulierung durch eATP zu beobachten war, wurde von einer zellkontakt-abhängigen zytotoxischen Effektorfunktion ausgegangen (Abb. 20b). Nur die Expression von FasL erhöhte sich auf CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der kurzen Stimulierung mit eATP (Abb. 20c). Durch die Blockade der Fas/FasL Achse über einen neutralisierenden Antikörper gegen FasL konnte die antigen-unabhängige

---

<sup>107</sup> Nanomol

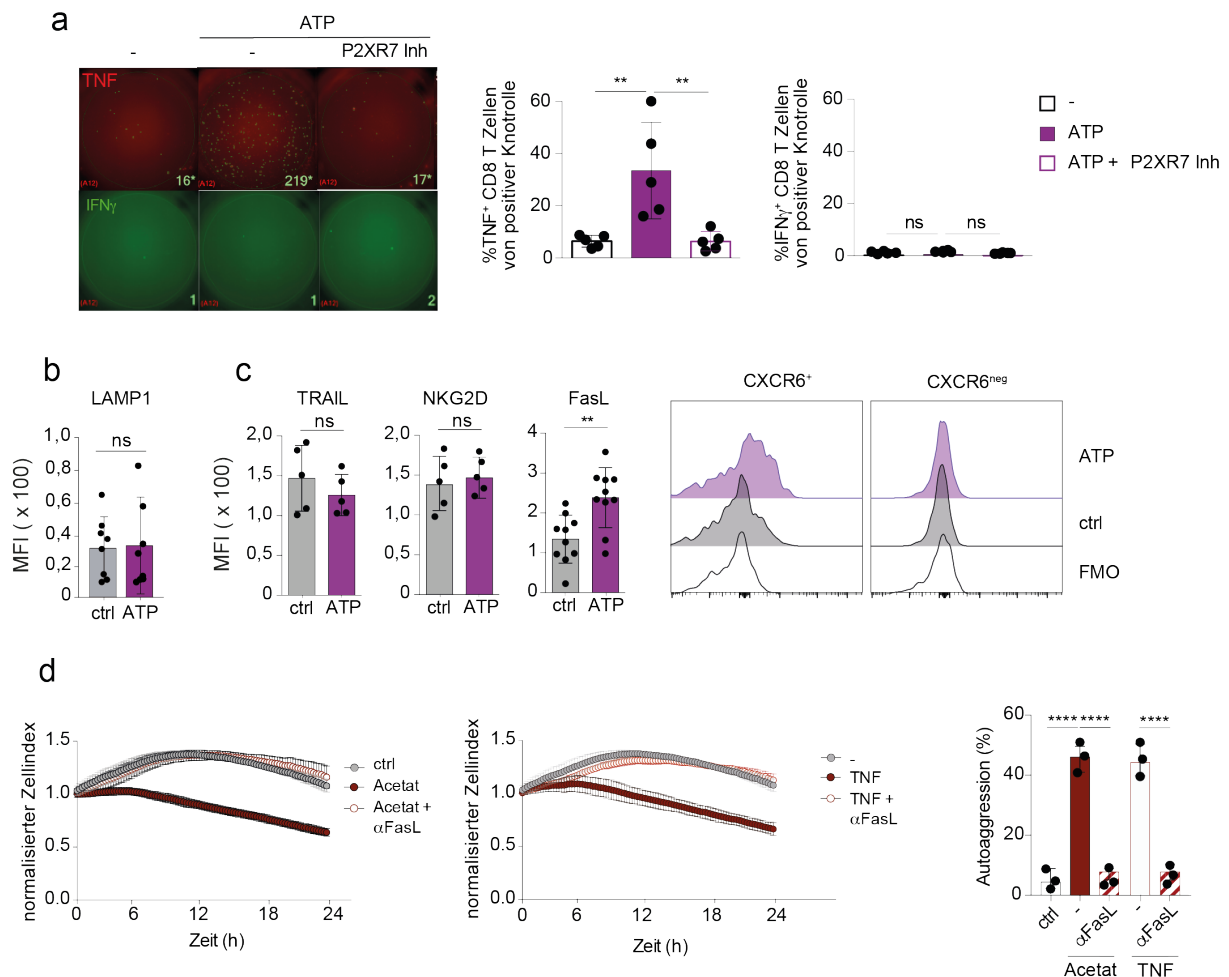
<sup>108</sup> Micromol



#### 4. Ergebnisse

Eliminierung von Hepatozyten durch Acetat-exponierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen verhindert werden (Abb. 20d). Der blockierende Antikörper konnte auch in der Kokultur von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit TNF-behandelten Hepatozyten die Zytotoxizität inhibieren (Abb. 20d).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Aktivierung von P2XR7 auf CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen zur Freisetzung spezifisch für TNF sorgt und dass gleichzeitig mehr FasL auf der Oberfläche vorhanden war. Die Fas/FasL Interaktion war schließlich die entscheidende zytotoxische Achse, die für die antigen-unabhängige Eliminierung von Hepatozyten durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen verantwortlich war.



**Abb. 20: CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen eliminieren Hepatozyten über Fas-FasL.**

(a)  $5 \times 10^4$  *in vitro* differenzierte CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 30 Minuten mit ATP (200  $\mu$ M) inkubiert. TNF<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Spots wurden quantifiziert und der Anteil an TNF<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Spots im Vergleich zur positiven Kontrolle (siehe Abb. 20) berechnet (n=5). (b,c) Mittlere Fluoreszenzintensität von membrangebundenen LAMP1 sowie FasL, NKG2D und TRAIL auf CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen, die für 15 Minuten mit ATP (200  $\mu$ M) stimuliert worden sind (n=5-10). (d) Autoaggression von Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen gegenüber Hepatozyten und von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen gegenüber TNF-vorbehandelten Hepatozyten in Anwesenheit eines blockierenden Antikörpers gegen FasL (n=3).

#### 4. Ergebnisse

Jeder Punkt in **(a-d)** steht für ein unabhängiges Experiment. In **(b,c)** wurde ein ungepaarter t-test und in **(a,d)** eine ONE-Way ANOVA als Statistik verwendet.

## 5. Diskussion

Die Anzahl der Menschen, die an einer entzündeten Fettleber leiden, nimmt stetig zu. Besonders in den westlichen Ländern, in denen die Ernährung sehr zucker- und fettreich ist, ist die Zahl der betroffenen Menschen hoch (Younossi et al., 2018). Neben einer entzündeten Leber leiden die Menschen meistens auch an einem metabolischen Syndrom, das mit systemischem Übergewicht, Diabetes und Glukosetoleranz assoziiert ist. NAFL Patienten können erfolgreich therapiert werden, weil es für die metabolischen Unregelmäßigkeiten zahlreiche wirksame Medikamente gibt (Higuera-de la Tijera & Servin-Caamano, 2015). Für NASH Patienten liegen derzeit wenige Therapieansätze vor, welche die Entzündung in der Leber ohne starke Nebenwirkungen abmildern können. Dieses Stadium der Krankheit ist jedoch kritisch, da es meistens den Ausgangspunkt für die lebensbedrohlichen Verläufe der Zirrhose oder der HCC darstellt (Ringelhan et al., 2018).

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Population an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die CXCR6, GzmB, CD69 und PD-1 exprimiert, verantwortlich für den Leberschaden bei NASH war. Da die Ausbildung dieser T-Zellen vom IL-15 Signalweg abhängig war, konnten der Leberschaden und die assoziierten Symptome mit einer anti-CD122 Therapie deutlich reduziert werden. Neben der Erforschung eines möglichen Behandlungsansatzes für NASH ging es auch darum, die molekularen Mechanismen in geweberesidenten CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu verstehen, die unter chronischer Entzündung fehlreguliert sind. Diese werden im Vergleich zu zirkulierenden T-Zellen transkriptionell unterschiedlich reguliert, um optimal an den Verbleib im Gewebe angepasst zu sein. In dieser Doktorarbeit konnte durch genetische und bioinformatische Methoden nachgewiesen werden, dass die verringerte Foxo1 Expression in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch erhöhte IL-15 und IL-21 Konzentrationen im Blut verursacht wurde, zu einem Ungleichgewicht der Gewebemöostase geführt hatte. Die Folge war eine Zunahme an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber sowie eine gesteigerte Expression von Effektormolekülen.

## 5. Diskussion

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Gewebeschäden durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer sterilen Entzündung entstanden. Autoimmune Krankheiten zeichnen sich durch autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus, die gegen ein harmloses, körpereigenes Antigen gerichtet sind (Bluestone et al., 2015). Es konnte mit einem passenden *in vitro* Zellkulturmodell gezeigt werden, dass Hepatozyten unter chronischen entzündlichen Bedingungen durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart von erhöhten Acetatkonzentrationen eliminiert wurden. Die zytotoxische Effektorfunktion der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte antigen-unabhängig über die Aktivierung des purinergen Rezeptors P2X7 und sie wurde über verstärkte Adhäsion der LFA-1/ICAM-1 Interaktion vermittelt.

Die vorliegenden Erkenntnisse zum fehlregulierten Mechanismus der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Lebergewebe bei NASH werden nachfolgend mit dem aktuellen Wissensstand in Zusammenhang gebracht und diskutiert.

### 5.1 Differenzierung der immunpathogenen CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei NASH

#### 5.1.1 Herunterregulierung von Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen bewirkt die Ausprägung eines geweberesidenten, erschöpften aber auch zytotoxischen Phänotyps

Keine Studie befasste sich bisher mit der genauen Charakterisierung von Lymphozyten in NASH, da diese Zellen bisher nicht mit einer sterilen Entzündung in der Leber in Verbindung gebracht wurden. Nur eine Arbeit hob die besondere Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in dieser Pathogenese hervor (Wolf et al., 2014). Bei der phänotypischen Analyse der Lymphozyten in der Leber von CD-HFD Mäusen fiel auf, dass besonders die Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen stark erhöht war. Trotz des fehlenden Unterschieds in ihrer Anzahl können NKT- und NK Zellen an der Pathogenese beteiligt sein. Für NKT-Zellen ist bekannt, dass sie

## 5. Diskussion

durch die Sekretion von LIGHT<sup>109</sup> die Aufnahme von Fettsäuren durch Hepatozyten begünstigen können (Wolf et al., 2014). In Zusammenarbeit mit Dominik Pfister, einem Mitarbeiter der Gruppe um Prof. Heikenwälder, konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen NKT-Zellen fehlten, weiterhin NASH aufwiesen (unveröffentlichte Daten). NKT-Zellen scheinen während einer chronischen Entzündung eher an der Entstehung von HCC beteiligt zu sein als am Gewebeschaden (Ma et al., 2018; Mossanen et al., 2019). Bei näherer Betrachtung des Phänotyps der CD8<sup>+</sup> T-Zellen fiel auf, dass sie deutlich positiv für CXCR6, GzmB, PD-1 und CD69 waren, aber keine Expression von KLRG1, CX<sub>3</sub>CR1 und CD49a, aufwiesen. Dies deutete auf einen Phänotyp hin, der dem von T<sub>rm</sub> ähnelte, obwohl diese kein CD49a exprimierten. Da CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von NASH Mäusen durch erhöhte apoptotische Eigenschaften charakterisiert sind und nicht CD49a exprimierten, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Zellen nicht ausschließlich um *bona fide* T<sub>rm</sub> handelt. Die erniedrigte Anzahl an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB oder PD-1 exprimierten, nach zweiwöchiger anti-CD122 Therapie machte die Kurzlebigkeit dieser Population deutlich. Die hohe Expression von PD-1 würde andeuten, dass es sich bei den CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen um „erschöpfte“ T-Zellen handelt. Jedoch widerlegt die hohe Expression von GzmB diese Vermutung. Die erhöhten Mengen an PD-1 auf der Oberfläche von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind vielmehr als Anpassungsmechanismus im Gewebe zu interpretieren, um keine übermäßige Pathologie anzurichten (Speiser et al., 2014). Deswegen werden geweberesidente T-Zellen auch durch erhöhte Expression von inhibitorischen Rezeptoren charakterisiert (Kumar et al., 2017; Smolders et al., 2018). In einer Studie bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis, einer chronischen Autoimmunerkrankung, zeigte sich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der synovialen Flüssigkeit klonal expandierten, obwohl sie PD-1 erhöht exprimierten (Petrelli et al., 2018). In der Leber von CD-HFD Mäusen konnte nämlich nicht nur für CXCR6<sup>+</sup>GzmB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine deutliche Korrelation mit der ALT gezeigt werden, sondern auch für CXCR6<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Zusammenhang gilt nur für CD8<sup>+</sup> T-Zellen und nicht für CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies könnte daran liegen, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht die gleichen zytotoxischen Fähigkeiten besitzen wie CD8<sup>+</sup> T-

---

<sup>109</sup> Engl.: homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes

## 5. Diskussion

Zellen. Außerdem ist das CD4/CD8 Verhältnis in der Leber niedriger als im Blut und in anderen Organen (Crispe & Mehal, 1996; Taniuchi, 2018). Die verantwortlichen Faktoren für die Ausbildung der CXCR6<sup>+</sup>GzmB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren leberspezifisch, da in benachbarten Organen keine Erhöhung dieser Population zu finden war. Diese Beobachtung schloss eine systemische Entzündung aus. Es stellte sich somit die Frage, welche leberspezifischen Faktoren für die Erhöhung der immunpathogenen CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation verantwortlich waren.

Der Vergleich der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den ND und CD-HFD Mäusen und der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen zeigte, dass CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Differenzierungszustand darstellten, der durch Gewebeständigkeit und durch erhöhter Expression von Effektormolekülen sowie inhibierenden Molekülen charakterisiert war. Eine Signatur für den T-Zellrezeptor und für den Zellzyklus konnte nicht gefunden werden. Das ist ein Indiz dafür, dass die Zunahme der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die PD-1 und GzmB exprimierten, nicht durch klonale Expansion entstanden war. Auch eine Signatur für Th17-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Damit wurde eine Beteiligung der Zellen am Gewebeschaden der Leber ausgeschlossen. Diese sind eher bei einer Vielzahl anderer autoimmuner Krankheiten entscheidend beteiligt (Yasuda et al., 2019). Durch die fehlende IL-17 Signatur können ebenso MAIT<sup>110</sup>-Zellen in der Pathogenese von NASH ausgeschlossen werden. Diese exprimieren zwar auch CXCR6, aber sezernieren größtenteils IL-17 und besitzen PLZF als identitätsgebenden Transkriptionsfaktor, der in den DEGs von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen von CD-HFD Mäusen nicht auftauchte (Rahimpour et al., 2015).

Die DEGs sowie die GSEA für beide Vergleiche ergaben einen interessanten Einblick in den Phänotyp der CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen. Um herauszufinden, welche Transkriptionsfaktoren an der Bildung dieser Population beteiligt waren, wurde eine Netzwerkanalyse von TFs durchgeführt, die in den DEGs auftraten. Für den Vergleich der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den ND und CD-HFD Mäusen und der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-

---

<sup>110</sup> Engl.: Mucosal associated invariant T cells

## 5. Diskussion

Zellen mit CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen kristallisierte sich die Herunterregulierung von *Klf2* als wichtiger Knotenpunkt heraus. Durch die Bindung von *Klf2* an vielen anderen TFs, u.a. *Bhlhe40*, *Nfatc1*, *Batf* oder *Runx3*, die alle mit Effektorantworten assoziiert sind, war die reduzierte Expression von *Klf2* ein kritischer Faktor in der Ausbildung dieser Population (Klein-Hessling et al., 2017; Kurachi et al., 2014; Lin et al., 2014; Milner et al., 2017). Andere TFs wie *Zeb2* und *T-bet*, die in terminal differenzierten CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen eine Rolle spielen, waren herunterreguliert. Damit könnten CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen als kurzlebige Effektorzellen ausgeschlossen werden (Dominguez et al., 2015). Vielmehr könnte es sich bei den CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen, die *Tcf1* herunterreguliert hatten, um differenzierte T-Zellen mit Effektorpotential handeln, die sich aus einem *Tcf1*<sup>+</sup> Zellpool gebildet hatten (Utzschneider et al., 2016). Die Herunterregulation von *Nr4a1* ist ein weiteres Indiz dafür, dass sich diese Zellen in einen gewebeschädigenden Phänotyp differenzierten, da dieser TF *Exhaustion* reguliert (J. Chen et al., 2019; Liu et al., 2019). Dass es sich bei den CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen nicht um „erschöpfte“ T-Zellen handelt, zeigte auch das Fehlen von *Maf* in der Netzwerkanalyse bzw. die niedrige hierarchische Position von TOX (Verdeil, 2016). Für einen vollständigen Überblick über alle relevanten Transkriptionsfaktoren in den CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen erfolgte eine Analyse aller bekannten TFs mit BART, um die regulatorische Bedeutung in den DEGs von CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen herauszufinden. Neben Übereinstimmungen mit der Netzwerkanalyse der TFs, die zu den DEGs gehörten, wie *Tcf7*, *Runx3* oder *Batf*, tauchten auch *Irf4* und *Foxo1* unter den signifikanten TFs auf. IRF4 könnte im Zusammenspiel mit BATF die Effektorfunktion von CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen regulieren (2014 (Kurachi et al., 2014). *Foxo1* spielt möglicherweise eine übergeordnete Rolle im Netzwerk von CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen, da *Klf2* ein direktes Zielgen von *Foxo1* ist (Malik et al., 2017). Die GSEA von bekannten *Foxo1*-abhängigen Genen ergab eine deutliche Korrelation mit den DEGs in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen von CD-HFD Mäusen. Dies unterstreicht, dass die Herunterregulierung von *Foxo1* in jenen CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen eine essentielle Rolle spielt.

## 5. Diskussion

Eine interessante Beobachtung zu den CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in CD-HFD Mäusen war, dass die deutliche Reduktion der Foxo1 Expression erst nach zwölfmonatiger NASH induzierender Diät stattfand. Die Abnahme der Foxo1 Expression korrelierte eindeutig mit einer Steigerung der Anzahl an CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen. Vermutlich kam es zwischen neun und zwölf Monaten der Diät zu erheblichen Veränderungen in der Leber, die den Anstieg an CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen ermöglichte. Die Hypothese, dass die Erkennung eines Antigens dafür verantwortlich sein könnte, konnte mit der erniedrigten Expression von Nr4a1 in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen von CD-HFD Mäusen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen von ND Mäusen ausgeschlossen werden. Die schwache Expression von Ly6C auf CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen von CD-HFD Mäusen stellt einen weiteren Beleg dafür dar, dass diese Zellen autoreaktiv waren und nicht durch immunogene Antigene aktiviert wurden (Martin et al., 2013).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich während der chronischen Entzündung in der Leber eine kurzlebige CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation ausbildete, die durch einen geweberesidenten, erschöpften und zytotoxischen Phänotyp ohne Hinweise auf klonaler Expansion charakterisiert ist. Die deutliche Herunterregulierung von Foxo1 in diesen Zellen dürfte der Ausgangspunkt für die Ausbildung der pathologischen T-Zellpopulation in der Leber der CD-HFD Mäusen sein.

### 5.1.2 IL-15 und IL-21 regulieren über die Expression von Foxo1 die Anzahl an CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber, die für den Leberschaden bei NASH verantwortlich sind

Transkriptionsfaktoren von geweberesidenten CD8<sup>+</sup> T-Zellen sorgen dafür, dass extrazelluläre Informationen in ein genetisches Programm integriert werden, sodass diese optimal an die Umgebung im Gewebe angepasst sind. Eine entscheidende Frage dieser Doktorarbeit war es herauszufinden, welche extrazellulären Signale in der Leber Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen herunterregulierten. Einzig IL-15 und IL-21, beides  $\gamma_c$ -Zytokine, die Foxo1 über die Aktivierung vom PI3K/Akt Signalweg aus dem Zellkern transportieren können, waren im Serum von CD-HFD Mäusen erhöht und waren in der Lage die Expression von Foxo1 in isolierten



## 5. Diskussion

CD44<sup>+</sup>CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen aus der Leber und Milz zu erniedrigen. Außerdem sorgte die Stimulation mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 zu einer erhöhten Expression von GzmB, PD-1 und CD69 in diesen Zellen. CD69 gilt nicht nur als Marker für T<sub>rm</sub>, sondern auch als früher Aktivierungsmarker nach T-Zellrezeptoraktivierung (Cibrian & Sanchez-Madrid, 2017). Da IL-15 ein essentielles Zytokin für die Erhaltung von T<sub>rm</sub> im Gewebe darstellt und CD69 abhängig von IL-15 hochreguliert wird, könnte eine konstante antigen-unabhängige Aktivierung von T<sub>rm</sub> notwendig für das Überleben dieser Zellen im Gewebe sein (Casey et al., 2012; Schenkel et al., 2016). Interessanterweise galt die Hochregulation von CXCR6 durch IL-15 nicht für andere Chemokinrezeptoren wie CXCR3 und CX3CR1, die vermutlich einer anderen transkriptionellen Regulation unterliegen. Auch humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut differenzierten sich durch Stimulation mit IL-15 in CXCR6<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T-Zellen. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Sebode aus Hamburg konnte in gesunden Lebern von Patienten, die einer bariatrischen Operation unterzogen worden sind, eine deutliche Population von CXCR6<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden werden, die im Blut nicht zu finden war (Dudek et al., *in preparation*). Diese Daten stimmten mit Daten einer Studie überein, die auch eine deutliche Population an CXCR6<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in humanen Lebern zeigen konnte (Pallett et al., 2017). Sie fanden heraus, dass TGF $\beta$  und IL-15 kritisch für die Ausprägung dieser Population *in vitro* ist.

Die unterschiedliche Expression der Rezeptoren für IL-15 und IL-21 auf CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen verdeutlichte, in welchen Differenzierungsstadien diese Zellen auf die Signale reagieren können. Da die Expression von CD122 größtenteils auf CXCR6<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber zu finden war, lag die Vermutung nahe, dass der IL-15 Signalweg wichtig für die Ausprägung der Zellen unter physiologischen Bedingungen ist. Dagegen war der Rezeptor für IL-21 nur auf CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert und würde erst während einer Entzündung eine größere Rolle spielen. Für beide Annahmen spricht, dass IL-21 nur in CD-HFD Mäusen nach zwölfmonatiger Diät detektierbar war, während die basalen Konzentrationen von IL-15 unter der Diät nochmals erhöht waren. Es ist bekannt, dass IL-21 unter homöostatischen Bedingungen nicht vorhanden ist (Best et al., 2013). Zu den Lymphozyten, die in der Lage sind, IL-21 sezernieren, gehören NKT-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, u. a.

## 5. Diskussion

Th17, Th9 und Tfh<sup>111</sup> Zellen (Tian & Zajac, 2016). Eine Studie beschreibt, dass IL-21, das von CD4<sup>+</sup>T-Zellen produziert wird, wichtig für eine ausreichende Expression von BATF in CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist (Xin et al., 2015). Dies könnte die erhöhte Expression von BATF in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen erklären und, zusammen mit IRF4, entscheidend für die Regulation der Effektorantworten sein. Im Gegensatz zu IL-21 ist IL-15 auch unter homöostatischen Bedingungen in der Leber zu finden und wichtig für die Erhaltung von Gedächtnis T-Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen im Gewebe (Cepero-Donates et al., 2016). Erhöhte IL-15 Konzentrationen dagegen sorgen für eine größere Anzahl an CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen. Gründe für die Zunahme dieser Zellen könnte erhöhtes Überleben, eine Zunahme in der Proliferation oder durch verstärkte Adhäsion im Gewebe verursacht sein. Expression von Bcl-2 und Ki-67 waren zwischen CXCR6<sup>+</sup> und CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen nicht unterschiedlich. Dafür zeigte die deutliche Expression von CXCR6, die reduzierte Expression von CD62L und IL-7Ra und die erhöhte Anzahl an Annexin-V positiven Zellen innerhalb der CXCR6<sup>+</sup> Population, dass ein verstärktes Zurückhalten in der Leber zusammen mit einer größeren Neubildung dieser Population, die Zunahme der Zellen in der Leber erklären könnte. Der fehlende Unterschied in der Ki-67 Expression und dem erhöhten Signal für Annexin V in der CXCR6<sup>+</sup> Population weist darauf hin, dass diese Zellen nicht durch konstante Aktivierung von Antigenen und klonale Expansion im Gewebe zurückgehalten werden (Mackay et al., 2012). Das Besondere an der Funktion von IL-15 ist, dass es im heterotrimeren Komplex mit IL-15 Rezeptor, IL-15 und IL-2R $\beta$  wirkt (Schluns & Lefrancois, 2003). In der Leber sind neben Kupffer-Zellen Ito-Zellen die Hauptquellen für die Produktion von IL-15. Aber auch Hepatozyten können über den IL-15 Rezeptor auf ihrer Oberfläche an der Weiterleitung von IL-15 Signalen beteiligt sein (Cepero-Donates et al., 2016). Kupffer-Zellen produzieren mehr IL-15, wenn sie durch mikrobielle Bestandteile wie LPS stimuliert werden (Cui et al., 2014). Das könnte die erhöhten Konzentrationen an IL-15 bei CD-HFD Mäusen erklären. Durch ein Ungleichgewicht in der Mikrobiota des Darms ist die Darmbarriere durchlässiger, was zur erhöhten Freisetzung von LPS in die Leber führt (Luther et al., 2015).

---

<sup>111</sup> Engl.: T follicular helper cells

## 5. Diskussion

Die deutliche Assoziation der Konzentration von IL-15 im Serum der Mäuse und den Mengen an Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen wirft die Frage auf, ob sie erst durch die Reduzierung der Foxo1 Aktivität im Zellkern mehr CXCR6 exprimierten. Durch pharmakologische und genetische Inhibition der Foxo1 Aktivität konnte in Lymphozyten aus der Leber und aus der Milz die Anzahl an CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen deutlich gesteigert werden. Welche Transkriptionsfaktoren für die Hochregulation von CXCR6 verantwortlich sein könnten, ist unklar. Von Foxo1 ist nur bekannt, dass es aktiv die Expression von CD62L und IL-7R reguliert, zwei wichtige Moleküle für den Verbleib von T-Zellen in lymphatischen Organen (Kerdiles et al., 2009). Da die Inaktivierung von Foxo1 zusätzlich wichtig für die Expression von CXCR6 ist, erhält Foxo1 eine bilaterale Aufgabe: ist die Foxo1 Aktivität im Zellkern hoch, verbleiben T-Zellen in lymphatischen Gefäßen, ist sie erniedrigt, wandern sie in die peripheren Organe und verbleiben dort.

Durch die Erkenntnis, dass sich die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von CD-HFD Mäusen durch verstärkte Aktivierung von IL-15 ausgebildet haben könnten, wurden CD-HFD Mäuse, die zwölf Monate lang NASH induzierende Diät erhalten hatten, mit anti-CD122 Antikörpern behandelt. Alle Tiere reagierten mit einem deutlichen Rückgang der ALT und die Anzahl an CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die GzmB oder PD-1 exprimierten, reduzierte sich auf das Niveau der ND-Mäuse. Dies war ein Hinweis dafür, dass die Ausbildung der Zellen spezifisch inhibiert wurde und dass die generelle Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Mäusen unverändert war. Ebenso wurde die Zahl der NK-Zellen deutlich dezimiert (unveröffentlichte Daten). Eine Wirkung auf die Reduktion des Leberschadens kann nicht ausgeschlossen werden. Da die Anzahl und der Phänotyp der NK-Zellen in CD-HFD Mäusen im Vergleich zu ND Mäusen jedoch nicht unterschiedlich war, wurde dieser Effekt als unbedeutend erachtet. Der Rückgang des NAS durch die anti-CD122 Therapie in CD-HFD Mäusen verdeutlicht zudem, dass CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der IL-15 Signalweg großen Einfluss auf die Pathogenese von NASH haben. Störungen im Signalweg von IL-15 kommen in vielen Krankheiten vor und dienen als Beweis dafür, dass IL-15 nicht nur in der Leber eine wichtige Rolle spielt (Cheuk et al., 2017; Easom et al., 2018; Richmond et al., 2018).

## 5. Diskussion

In Mäusen allerdings, die diese Diät sechs bzw. neun Monate erhalten hatten, war kein Effekt des anti-CD122 Antikörpers auf den Leberschaden zu beobachten. Das könnte daran liegen, dass in diesen Mäusen keine ausgeprägte Entzündung vorlag und dass der anfänglich leichte Gewebeschaden entweder durch andere Immunzellen oder durch metabolische Prozesse wie Lipotoxizität in den Hepatozyten verursacht wurde (Schuster et al., 2018). Für die erste These spricht, dass Kupffer-Zellen, inflammatorische Monozyten und neutrophile Granulozyten bekanntermaßen durch Produktion von TNF, IL-1 $\beta$  und ROS am Leberschaden bei NASH beteiligt sind (Tosello-Trampont et al., 2012; Xu et al., 2014). Das vollständige Fehlen der Symptomatik von NASH in  $\beta_2m^{-/-}$ ,  $Rag^{-/-}$  und  $TCR\beta\delta^{-/-}$  Mäusen, die eine NASH induzierende Diät erhalten hatten, könnte damit zusammen hängen, dass T-Zellen durch die Sezernierung von Chemokinen andere Immunzellen wie Monozyten, innate Lymphozyten oder neutrophile Granulozyten ins Gewebe locken können (Nishimura et al., 2009; Wolf et al., 2014). Deswegen werden geweberesidente T-Zellen in den Mittelpunkt bei der Erhaltung einer funktionierenden Homöostase im Gewebe gerückt (Gebhardt et al., 2018).

Eine Erklärung, warum sich die ALT nach der zweiwöchigen Applikation des anti-CD122 Antikörpers nicht weiter reduzierte, könnte sein, dass der Antikörper keine Wirkung auf die bereits gebildeten  $Foxo1^{low}CXCR6^{+}CD8^{+}$  T-Zellen hatte. Eine Möglichkeit, die bereits differenzierten  $Foxo1^{low}CXCR6^{+}CD8^{+}$  T-Zellen zu inhibieren, wäre die Blockade des IL-21 Rezeptors, der nur auf den  $CXCR6^{+}CD8^{+}$  T-Zellen in CD-HFD Mäusen erhöht exprimiert ist. Dies wäre ein vielversprechender Ansatz, da die Konzentration von IL-21 nur im Serum von CD-HFD Mäusen angestiegen war.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Blockade des IL-15 Signalwegs ein immuntherapeutischer Ansatz mit viel Potenzial in der Behandlung von NASH ist. Es wäre wichtig zu überprüfen, ob IL-15 bzw. IL-21 relevant für NASH bei Menschen ist. Ziel wäre, Patienten, die an NASH leiden, mit einer Kombination von FXR-Agonisten und therapeutischen Antikörpern zu behandeln. Damit wäre es möglich, nicht nur die Lipotoxizität in

## 5. Diskussion

der Hepatozyten zu verhindern, sondern auch den Gewebeschaden, der durch das Immunsystem verursacht wurde.

### 5.1.3 Acetat verstärkt die Produktion von Effektormolekülen spezifisch in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität

Von T<sub>rm</sub> ist bekannt, dass sie über eine erhöhte Expression von Effektormolekülen wie GzmB verfügen, um als erste Zellpopulation im Gewebe den Ausbruch einer wiedergekehrten Infektion einzudämmen (Amsen et al., 2018). Für die transkriptionelle Regulation der Effektorfunktion dieser Zellpopulation wurden bisher Blimp1/Hobit und RUNX3 als wichtige TFs beschrieben (Kragten et al., 2018; Milner et al., 2017). Obwohl Blimp1/Hobit als universeller TFs-Komplex für die Regulation von T<sub>rm</sub> in verschiedenen Organen charakterisiert wurde, spielten die beiden TFs in der Netzwerkanalyse der CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen eine untergeordnete Rolle (Mackay et al., 2016). Darüber hinaus liegen wenige Studien darüber vor, welche Faktoren aus der Umgebung der Organe die Effektorfunktion von T<sub>rm</sub> beeinflussen können (Amsen et al., 2018). Eine Inaktivierung von Foxo1 führt in CD8<sup>+</sup> T-Zellen generell dazu, dass T-bet nicht mehr reprimiert und dadurch die Effektorfunktion erhöht wird (Rao et al., 2012; Skon et al., 2013). Da T-bet in T<sub>rm</sub> herunterreguliert ist, wurde in dieser Doktorarbeit der Frage nachgegangen, welche zusätzlichen leberspezifischen Faktoren sich auf die Effektorfunktion von geweberesidenten T-Zellen auswirken. Einen ersten entscheidenden Hinweis, dass die Expression nicht nur von der Foxo1 Aktivität abhängig ist, zeigte die Analyse, dass die Expression von GzmB in Leber, Haut und Darm höher war als in Niere oder Lunge, obwohl die Menge an Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in allen Organen gleich war. Auffällig war, dass diese Organe mit der Mikrobiota assoziiert sind. Tatsächlich war das Niveau an GzmB der CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von keimfreien Mäusen niedriger und die Expression von Foxo1 und PD-1 nahezu unverändert. Durch die ähnliche Expression von Foxo1 in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte ein anderer Einfluss von Zytokinen auf die Effektormoleküle ausgeschlossen werden.

## 5. Diskussion

Unter den bekannten Stoffwechselprodukten stach Acetat heraus, das die GzmB Expression in CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärken konnte. Butyrat hatte keinen Einfluss auf die GzmB Expression, obwohl dieses Metabolit über Inhibierung von HDAC (Histon-Deacetylasen) auch in der Lage wäre, GzmB zu erhöhen (Luu et al., 2018). Ein möglicher Grund könnte die unterschiedlich verwendeten Konzentrationen gelegen haben. Luu et al. (2018) konnte keinen Effekt durch Acetat nachweisen, da die verwendete Konzentration von 1 mM unter den physiologischen Werten in der Leber von Mäusen liegt. Erst bei 5 mM Acetat, was der Konzentration in der Leber entspricht, konnte eine Erhöhung von GzmB in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (Balmer et al., 2016). Eine Steigerung auf 15 mM, was in der Leber von den meisten CD-HFD Mäusen vorkam, konnte die GzmB Expression nochmals verstärken. Diese Beobachtung stimmt mit weiteren Studien überein, in denen Acetat die GzmB Expression erhöhte (Qiu et al., 2019). Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass freie Fettsäuren wie Linolensäure, Oleinsäure oder Palmitinsäure keinen Einfluss auf die Expression von GzmB haben, obwohl der Fettstoffwechsel bei NASH bekanntermaßen gestört ist (Friedman et al., 2018). Neben GzmB steigerte Acetat auch die Expression von TNF in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Andere Effektormoleküle wie IFN $\gamma$ , FasL, TRAIL und NKG2D blieben dagegen unverändert. Dass Acetat keinen Einfluss auf IFN $\gamma$  hatte, steht im Widerspruch zu bisherigen Befunden (Balmer et al., 2016; Chang et al., 2013). Eine mögliche Erklärung für den Unterschied ist, dass sich die Glykolyse sowie die Aktivität von GAPDH durch in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht verändert hatte. Eine verstärkte Transkription von IFN $\gamma$  durch die fehlende Blockade am 3'UTR durch GAPDH wäre nicht möglich. Ähnlich wäre die unveränderte GAPDH Aktivität damit zu erklären (Balmer et al., 2016; Chang et al., 2013).

Die erhöhte Expression von GzmB und TNF in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Acetat erfolgte über zwei unterschiedliche Mechanismen, da sich nur die mRNA von GzmB erhöhte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte verstärkte Histon-Acetylierung sein (Araki et al., 2008). Da die HAT-Inhibitoren Curcumin und Anakardinsäure die Zunahme der Expression nur von GzmB und nicht von TNF in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Acetat blockierten und die HAT-Aktivität in diesen Zellen erhöht war, wird eine epigenetische Regulation für GzmB angenommen. Dagegen könnte die Regulation von TNF durch Acetat posttranskriptional

## 5. Diskussion

sein. Für TNF ist bekannt, dass Zellen eine vorgefertigte mRNA von TNF besitzen und diese über PKC-abhängige Induzierung zu den Polyrribosomen rekrutieren und translatieren lassen (Salerno et al., 2017). Das Erstaunliche am Effekt von Acetat war, dass die erhöhten Expressionen von GzmB und TNF nur in CD8<sup>+</sup> T-Zellen stattfanden, die erniedrigte Foxo1 Aktivität hatten. Da diese Zellen nicht mehr Acetat aufnahmen, wurden zellintrinsic Mechanismen für die gesteigerte Expression von GzmB und TNF in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit niedriger Foxo1 Aktivität angenommen. Da CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität einen erhöhten Stoffwechsel hatten, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass mehr Acetyl-CoA in den Zellen gebildet wurde. Dieses Stoffwechselprodukt ist als wichtiges Substrat und Botenstoff an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt (Pietrocola et al., 2015). Nicht nur erniedrigte Foxo1 Aktivität ist Voraussetzung für die Erhöhung von GzmB und TNF in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sondern auch eine gleichzeitige Aktivierung durch IL-15R $\alpha$ /IL-15. Dadurch könnten Signalwege in den Zellen aktiviert werden, die die entsprechenden Enzyme dazu veranlassen, die Expression von GzmB und TNF durch erhöhte Mengen an Acetyl-CoA zu induzieren. Die notwendigen Aktivierungssignale könnten T<sub>m</sub> in der Leber konstant über IL-15 erhalten.

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass speziell CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine erhöhte GzmB Expression aufweisen, und dass diese nicht nur durch erniedrigte Foxo1 Aktivität bedingt ist, sondern auch durch erhöhte Konzentrationen an Acetat in der Leber. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass bakterielle Stoffwechselprodukte eine immer wichtigere Rolle in der Immunmodulation verschiedener Zellpopulationen in denjenigen Organen einnehmen, die direkt mit der Mikrobiota assoziiert sind, wie der Darm, die Leber oder die Haut.

## 5. Diskussion

### 5.2 Mechanismus des Leberschadens durch autoaggressive CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei NASH

#### 5.2.1 Unter erhöhten Konzentrationen an Acetat eliminieren CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität Hepatozyten antigen-unabhängig

Eine entscheidende Frage der Doktorarbeit war, inwieweit Acetat unter physiologischen und entzündlichen Bedingungen die Effektorfunktion von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst, und welche Rolle dieser Effekt bei der Überwachung des Gewebes spielt.

Acetat in erhöhter Konzentration sorgte dafür, dass GzmB und TNF in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erniedrigter Foxo1 Aktivität deutlich gesteigert werden konnte. Bei der Analyse von Antigenen mit unterschiedlichen TCR-Affinitäten konnte festgestellt werden, dass Zielzellen, die Antigene mit erhöhter Affinität zum TCR präsentierten, durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von Acetat nicht effizienter eliminiert wurden. Erst bei der Präsentation sehr niedriger Konzentrationen von Antigenen oder in deren Abwesenheit wurden Zielzellen unter diesen Konditionen eliminiert. Infizierte Zellen ohne Antigen zu eliminieren, wurde bisher nur für Lymphozyten des angeborenen Immunsystems beschrieben, (Sonnenberg & Hepworth, 2019) und stellt damit eine neuartige Erkenntnis dar. Bei der Dynamik der antigen-unabhängigen Zytotoxizität fiel auf, dass das Töten der Hepatozyten nicht exponentiell ablief und dass nur maximal die Hälfte der Hepatozyten beseitigt wurde. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass bei der antigen-spezifischen Zytotoxizität alle Hepatozyten das Antigen präsentierten und eliminiert wurden. Hingegen adhärten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter Zugabe von Acetat nur auf jenen Hepatozyten, die erhöhte ICAM-1 Level aufwiesen. Dies war ein Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 in der antigen-unabhängigen Zytotoxizität gegenüber Hepatozyten eine größere Bedeutung hatte. Von beiden Molekülen war es die Expression von ICAM-1 auf Hepatozyten, die in der Kultur mit CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von erhöhten Acetat-Konzentrationen zunahm und die die adhäsiven Eigenschaften der Hepatozyten TNF-abhängig erhöhte. Tatsächlich zeigte die Analyse von proinflammatorischen Zytokinen, dass diese nur durch die Zugabe von TNF in die Kokultur



## 5. Diskussion

von IL-15R $\alpha$ /IL-15 stimulierten CXCR6 $^+$ CD8 $^+$  T-Zellen mit Hepatozyten, eliminiert werden konnten. TNF ist ein pleiotropes Zytokin, das auch in der Lage ist, über den NF- $\kappa$ B Signalweg ICAM-1 auf Hepatozyten zu erhöhen (Qin et al., 2005). Da die Expression von MHC-I in der Leber von CD-HFD Mäusen nicht angestiegen war und MHC-I defiziente Hepatozyten auch beseitigt wurden, konnte eine verstärkte tonische Aktivierung der CXCR6 $^+$ CD8 $^+$  T-Zellen als Mechanismus für die antigen-unabhängige Zytotoxizität ausgeschlossen werden. Diese unterstützte die Hypothese, dass die TNF vermittelte verstärkte Adhäsion über ICAM-1 auf Hepatozyten kritisch für das Eliminieren der Zellen war. Fraglich blieb, ob die Adhäsion von CXCR6 $^+$ CD8 $^+$  T-Zellen an Hepatozyten, die vermehrt ICAM-1 exprimierten, ausreichte, eine immunologische Synapse auszubilden. Konfokale mikroskopische Aufnahmen zeigten eindeutig, dass CXCR6 $^+$ CD8 $^+$  T-Zellen durch Acetat in Richtung der Hepatozyten polarisierten und dass sich LFA-1 an dieser Stelle konzentrierte. Bisherige Studien zeigten zwar, dass CD8 $^+$  T-Zellen eine immunologische Synapse ohne die Erkennung eines Antigens ausbilden können, dies allerdings zu keiner Ausrichtung von lytischen Granulas führte (Anikeeva et al., 2005; Somersalo et al., 2004). Außerdem wurde nachgewiesen, dass CD8 $^+$  T-Zellen eine Synapse unter antigen-unabhängigen Bedingungen effektiver formten als CD4 $^+$  T-Zellen. Dies wäre ein weiterer Indikator dafür, dass CD8 $^+$  T-Zellen eine größere Bedeutung am Leberschaden bei NASH haben könnten. Um auszuschließen, dass die antigen-unabhängige Zytotoxizität der Hepatozyten ein Artefakt vom *in vitro* System war, wurde in Zusammenarbeit mit Donato Inverso vom DKFZ (Heidelberg) durch hochauflösende, mikroskopische Bilder in der Leber von CD-HFD Mäusen *in situ* nachgewiesen, dass CD8 $^+$  T-Zellen im direkten Kontakt mit sterbenden Hepatozyten waren (unveröffentlichte Daten). Außerdem zeigten die Experimente, in denen CXCR6 $^+$  OT-1 CD8 $^+$  T-Zellen, die vor dem Transfer für 24 Stunden mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 und Acetat behandelt worden waren, dass sie das Virus unvollständig beseitigten, aber bei diesen Mäusen dennoch Leberschäden verursachten. Diese Daten bestätigen, dass sich ein antigen-unabhängiger Gewebeschaden auch *in vivo* ereignen kann.

An dieser Stelle stellte sich die Frage, ob das antigen-unabhängige Eliminieren von Gewebe- oder Immunzellen eine physiologisch relevante Bedeutung hat, oder ob es nur

## 5. Diskussion

einen Nebeneffekt einer chronischen Entzündung darstellt. Beim Bekämpfen von infizierten Zellen oder von Tumorzellen ist bekannt, dass antigen-unspezifische T-Zellen helfen können, den Infektionsherd oder den Tumor effizienter zu entfernen (J. Kim et al., 2018; Monjazeb et al., 2014). Dabei werden antigen-unspezifische T-Zellen nicht nur durch die Hilfe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert, sondern durch Zytokine aus der entzündlichen Umgebung. Bei NASH könnten IL-15 und IL-21 diese Aufgabe übernehmen. Viele Studien zeigten bisher, dass IL-15 einen TCR-ähnlichen Effekt auf T-Zellen hat (J. Kim et al., 2018; M. T. Kim & Harty, 2014). In einer chronischen Entzündungssituation wie bei NASH, bei der erhöhte Konzentrationen an IL-15 vorliegen, könnten T-Zellen den Ausbruch maligner Hepatozyten effizienter verhindern (Harjunpaa et al., 2019). Da maligne Zellen durch erhöhte Expression von inhibitorischen und adhäsiven Liganden charakterisiert sind, die intensiv mit der Umgebung interagieren, könnte die Interaktion über LFA-1 für geweberesidente T-Zellen wichtig sein, um trotz des feindlichen Milieus maligne Hepatozyten zu erkennen und zu beseitigen (Schmits et al., 1996). Kommt es jedoch zu einer verstärkten entzündeten Umgebung mit mehr CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Hepatozyten, die verstärkt ICAM-1 exprimieren, könnte der vergrößerte Gewebeschaden sogar die Entstehung von Tumorzellen fördern (Pfister et al., unveröffentlichte Daten). Da die zytotoxischen CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen gleichzeitig erhöht PD-1 und CTLA-4 exprimieren, könnte diese Tatsache erklären, warum Therapien mit Antikörper gegen PD-1 und CTLA-4 gegen HCC bislang wenig Wirkung erzielten (Zen & Yeh, 2018). Ein anderer Grund für das antigen-unabhängigen Eliminieren von Hepatozyten könnte das Freisetzen sogenannter „Find-me“ Signale von apoptotischen Hepatozyten sein, die myeloide Zellen anlocken. Diese würden eine verstärkte Entzündung der Leber verhindern, indem sie durch Phagozytose die apoptotischen Zellen effizient beseitigen (Chekeni et al., 2010; Ju & Tacke, 2016).

Geweberesidente T-Zellen sind an der Überwachung des Gewebes beteiligt und sorgen unter physiologischen Bedingungen für ein Gleichgewicht zwischen Gewebeschaden und Beseitigung von infizierten Zellen. Unter Bedingungen von NASH, in denen in der Leber erhöhte Konzentrationen an Acetat, TNF, IL-15 und IL-21 vorliegen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind, ohne die Erkennung

## 5. Diskussion

eines Antigens, Hepatozyten zu schädigen. Dabei spielt die Adhäsion über LFA-1 und ICAM-1 eine besondere Rolle. Weitere Studien müssen zeigen, ob dieser Mechanismus einen kollateralen Effekt darstellt oder sogar förderlich dafür ist, die Entstehung von Tumoren zu verhindern.

### 5.2.2 Antigen-unabhängige Zytotoxizität von Hepatozyten durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist abhängig vom Einstrom extrazellulären Calciums und von Fas/FasL Interaktion

Geweberesidente T-Zellen sind stets bestimmten Stimuli ausgesetzt, die entweder von Zytokinen, DAMPs oder tonischen Aktivierungen kommen. Jeder dieser Faktoren setzt Signale in diesen Zellen um, damit sie im Gewebe überleben und dieses unter physiologischen Bedingungen nicht angreifen (Mackay et al., 2015; Myers et al., 2017; Stark et al., 2018). In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass das Lebergewebe nur bei erhöhten Konzentrationen an IL-15 und Acetat durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen geschädigt werden konnte. Entscheidend für die TCR-unabhängige Aktivierung dieser Zellen waren PI3K, Calcineurin und extrazelluläres Calcium. Da PI3K wichtig für die Weiterleitung der Signale für IL-15 und LFA-1 ist, zeigte die Verwendung von Cyclosporin A und EGTA, dass der TCR-unabhängige Einstrom von extrazellulärem Calcium kritisch für die Zytotoxizität gegenüber Hepatozyten ist (Trebak & Kinet, 2019). Zu den Kanälen und Rezeptoren, die an der Plasmamembran den Einstrom von Calcium regulieren, gehören TRP-Kanäle, P2X Rezeptoren und spannungsabhängige Calciumkanäle. Die Gruppe an Rezeptoren auf T<sub>rm</sub>, die am besten untersucht ist, sind P2X Rezeptoren (Trebak & Kinet, 2019). Sie können durch die Erkennung von extrazellulären ATP und NAD<sup>+</sup> aktiviert werden und damit Gewebeschäden detektieren (Stark et al., 2018). Neben der Aktivierung von T-Zellen durch extrazelluläres ATP von umliegenden sterbenden Zellen, kann zell-intrinsisches ATP in einem autokrinen Kreislauf über Pannexin 1 und P2X Rezeptoren schwache T-Zellrezeptorsignale verstärken (Schenk et al., 2008). Die Verwendung von Inhibitoren für Pannexin 1 und P2XR7 bei CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von Acetat zeigte, dass sowohl die Freisetzung als auch die Erkennung von ATP ein wichtiger Schritt ist, um Hepatozyten antigen-unabhängig zu eliminieren. Bei der antigen-spezifischen Effektorfunktion spielte

## 5. Diskussion

dieser autokrine Kreislauf keine bedeutende Rolle. Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass bei der antigen-spezifischen Zytotoxizität gegenüber Hepatozyten mehr Calcium aus intrazellulären Depots freigesetzt wird (Trebak & Kinet, 2019). Es ist schwierig zu differenzieren, inwieweit die Aktivierung von P2XR7 über einen autokrinen Kreislauf einen entscheidenden Einfluss auf die Effektorfunktion von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat oder extrazelluläres ATP bzw. NAD dafür entscheidend ist. Eindeutig dagegen ist, dass erhöhte Konzentrationen an ATP im Überstand der Kultur von Acetat-behandelten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hepatozyten vorliegen und dass dieser Überstand zu einem P2XR7-abhängigen verstärkten Einstrom von Calcium in diesen Zellen führte.

Eine entscheidende Frage, die bisher unbeantwortet blieb, war, wie der Einstrom von extrazellulärem Calcium in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Umsetzung einer gesteigerten Effektorfunktion beitrug. Die Degranulation von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen war durch Acetat und eATP nicht erhöht, deswegen wurde eine gesteigerte Sekretion von GzmB ausgeschlossen. Dagegen wurden mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert, die durch eATP TNF sezernierten. Erstaunlich war, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch ohne Stimulation mit IL-15R $\alpha$ /IL-15 in der Lage waren TNF zu sezernieren. IFN $\gamma$  wurde hingegen nur nach antigen-spezifischer Aktivierung sezerniert. Ein möglicher Mechanismus wie TNF ohne TCR-Aktivierung sezerniert werden konnte, zeigte eine Studie in Makrophagen (Barbera-Cremades et al., 2017). Dabei war die Aktivierung von P2XR7 durch extrazelluläres ATP entscheidend, um die Aktivität von TACE<sup>112</sup> zu erhöhen. TACE ist für die Umsetzung des membrangebundenen TNF in ihre lösliche Form verantwortlich. Die nicht vorhandene Sekretion von IFN $\gamma$  bei der antigen-unabhängigen Aktivierung von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte durch das Fehlen einer stabilen Synapse und der Polarisation lytischer Granulas erklärt werden (Huse et al., 2006). Dabei wird beschrieben, dass die Sekretion von TNF im Vergleich zu IFN $\gamma$  diffuser ist. Die nicht zielgerichtete Sekretion von TNF soll die Umgebung für eine anstehende Infektion oder Entzündung durch Rekrutierung von inflammatorischen Zellen bzw. Aktivierung des Gewebes vorbereitet werden (Kallioli & Ivashkiv, 2016). Die basale Sekretion von TNF in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte die Präsenz von geweberesidenten T-Zellen in der Leber

---

<sup>112</sup> Engl.: TNF converting enzyme

## 5. Diskussion

durch gesteigerte Expression von ICAM-1 auf Hepatozyten oder LSECs zusätzlich unterstützen (McNamara et al., 2017). Mechanistisch gesehen, könnten die erhöhten Mengen an TNF im Serum von CD-HFD Mäusen über verstärkte Abspaltung von der Membran durch die TNF Sheddase TACE (Adam17) und Adam19 zustande gekommen sein. Transkripte für beide Enzyme waren in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei CD-HFD Mäusen erhöht. Außerdem war TNF in diesen Zellen in der RNA-Sequenzierung am stärksten herunterreguliert. Diese Beobachtung spricht zusammen mit der fehlenden Erhöhung der mRNA von TNF durch Acetat in *in vitro* differenzierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen für eine posttranslationale Regulation von TNF.

Die gesteigerte Sekretion von TNF durch Acetat und die starke Adhäsion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Hepatozyten bilden den ersten Schritt im Prozess der antigen-unabhängigen Zytotoxizität gegenüber Hepatozyten. Unklar bisher war, über welchen Mechanismus Hepatozyten tatsächlich eliminiert werden. Einzig FasL war in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung durch ATP erhöht und die Fas/FasL-Interaktion war entscheidend für die Eliminierung von Hepatozyten durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Mechanismus nimmt bei der Eliminierung von Hepatozyten eine große Rolle ein (Faletti et al., 2018). Die Beobachtungen, dass TNF in der Lage ist, Hepatozyten durch die Hochregulierung von Fas für die Apoptose durch FasL zu sensibilisieren (Feldstein, Canbay, Guicciardi, et al., 2003) und dass Apoptose in Hepatozyten über Fas in Patienten mit NASH ein charakteristisches Merkmal ist, heben die Bedeutung des Effektormechanismus weiter hervor (Feldstein, Canbay, Angulo, et al., 2003).

Die beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass in Abwesenheit von starken Aktivierungen des T-Zellrezeptors ein verstärkter Einstrom von extrazellulärem Calcium in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausreicht, um TNF zu sezernieren und Hepatozyten über FasL zu eliminieren. Die Freisetzung von DAMPs in der entzündeten Leber bei NASH könnte die antigen-unabhängige Effektorfunktion der CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auslösen und den Leberschaden verursachen.

## 5. Diskussion

### 5.2.3 Immuntherapeutische Behandlungsstrategien für den Leberschaden bei NASH

Die Pathogenese von NASH ist vielschichtig und ist mit vielen Begleiterkrankungen assoziiert (Schuster et al., 2018). Derzeitige Behandlungsoptionen zielen auf die Reduktion der Einlagerung freier Fettsäuren in den Hepatozyten ab (Friedman et al., 2018). Trotz effizienter Abnahme der Lipide innerhalb der Hepatozyten ist die Entzündung in der Leber unzureichend verbessert. Das liegt daran, dass bei der Therapie von NASH keine Behandlungsoption das Immunsystem betrifft, obwohl ihre wichtige Rolle bei NASH bekannt ist (Malehmir et al., 2019; Wolf et al., 2014).

In 5.2 wurde die Verwendung eines anti-CD122 Antikörpers zur Reduzierung des Leberschadens bei NASH diskutiert. Im Folgenden werden die Erkenntnisse aus dem Mechanismus der antigen-unabhängigen Zytotoxizität in den Kontext mit potenziell relevanten Behandlungsformen gestellt. Zusätzlich zur Applikation von anti-CD122 oder anti-IL-21R Antikörpern könnten NASH Patienten anti-TNF Antikörper wie Infliximab oder Adalimumab bekommen, um den therapeutischen Effekt zu verstärken. Beide Antikörper wurden bisher erfolgreich bei RA wie auch bei NASH Patienten angewandt (Lopetuso et al., 2018; Monaco et al., 2015). Der positive Effekt von anti-TNF Antikörpern bei NASH-Patienten könnte u.a. mit der fehlenden Adhäsion von geweberesidenten T-Zellen an Hepatozyten zu erklären sein. Andere Alternativen für die Therapie von NASH wäre die Blockade der Fas/FasL bzw. der LFA-1/ICAM-1 Interaktion. Eine systemische Blockade von FasL bzw. LFA-1 würde aber Autoimmunität fördern und wäre als zusätzliche Option ungeeignet (Nicolls & Gill, 2006; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Eine weitere Möglichkeit könnte die Blockade von P2XR7 sein, um den erhöhten Einstrom von Calcium in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und damit gesteigerte Effektorfunktion zu unterbinden. Nachteil dieser Applikation wäre die mögliche Reduktion anti-inflammatorischer Zytokine, die von Kupffer-Zellen produziert werden. Aktivierung der Kupffer-Zellen über P2XR7 induziert nicht nur die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, sondern kann über das Ektoenzym CD39, das ATP zu Adenosinmonophosphat (AMP) katalysiert, immunsuppressiv auf die Umgebung wirken (Savio et al., 2017).

## 5. Diskussion

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Blockade des IL-15 Signalwegs ein vielversprechender immuntherapeutischer Ansatz in der Behandlung von NASH ist. Ob die Kombination mit anti-TNF oder mit anti-IL-21R Antikörpern die Leberentzündung bei NASH zusätzlich reduziert, müssen weitere präklinische Versuche zeigen.

## 6. Literaturverzeichnis

### 6. Literaturverzeichnis

Ahlborg, N., & Axelsson, B. (2012). Dual- and triple-color fluorospot. *Methods Mol Biol*, 792, 77-85.

Amsen, D., van Gisbergen, K., Hombrink, P., & van Lier, R. A. W. (2018). Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat Immunol*, 19(6), 538-546.

Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T. N., Thomas, V. K., Dustin, M. L., & Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(18), 6437-6442.

Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O., & Heikenwalder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(7), 411-428.

Araki, Y., Fann, M., Wersto, R., & Weng, N. P. (2008). Histone acetylation facilitates rapid and robust memory CD8 T cell response through differential expression of effector molecules (eomesodermin and its targets: perforin and granzyme B). *J Immunol*, 180(12), 8102-8108.

Balmer, M. L., Ma, E. H., Bantug, G. R., Grahlert, J., Pfister, S., Glatter, T., Jauch, A., Dimeloe, S., Slack, E., Dehio, P., Krzyzaniak, M. A., King, C. G., Burgener, A. V., Fischer, M., Develioglu, L., Belle, R., Recher, M., Bonilla, W. V., Macpherson, A. J., Hapfelmeier, S., Jones, R. G., & Hess, C. (2016). Memory CD8(+) T Cells Require Increased Concentrations of Acetate Induced by Stress for Optimal Function. *Immunity*, 44(6), 1312-1324.

Barbera-Cremades, M., Gomez, A. I., Baroja-Mazo, A., Martinez-Alarcon, L., Martinez, C. M., de Torre-Mingueta, C., & Pelegrin, P. (2017). P2X7 Receptor Induces Tumor Necrosis Factor-alpha Converting Enzyme Activation and Release to Boost TNF-alpha Production. *Front Immunol*, 8, 862.

Barreyro, F. J., Holod, S., Finocchietto, P. V., Camino, A. M., Aquino, J. B., Avagnina, A., Carreras, M. C., Poderoso, J. J., & Gores, G. J. (2015). The pan-caspase inhibitor Emricasan



## 6. Literaturverzeichnis

(IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int*, 35(3), 953-966.

Benedicto, A., Romayor, I., & Arteta, B. (2017). Role of liver ICAM-1 in metastasis. *Oncol Lett*, 14(4), 3883-3892.

Bensch, B., Johnson, A. L., Kurachi, M., Odorizzi, P. M., Pauken, K. E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L. M., Paley, M. A., Delgoffe, G. M., & Wherry, E. J. (2016). Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity*, 45(2), 358-373.

Best, J. A., Blair, D. A., Knell, J., Yang, E., Mayya, V., Doedens, A., Dustin, M. L., Goldrath, A. W., & Immunological Genome Project, C. (2013). Transcriptional insights into the CD8(+) T cell response to infection and memory T cell formation. *Nat Immunol*, 14(4), 404-412.

Bluestone, J. A., Bour-Jordan, H., Cheng, M., & Anderson, M. (2015). T cells in the control of organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest*, 125(6), 2250-2260.

Borges da Silva, H., Beura, L. K., Wang, H., Hanse, E. A., Gore, R., Scott, M. C., Walsh, D. A., Block, K. E., Fonseca, R., Yan, Y., Hippen, K. L., Blazar, B. R., Masopust, D., Kelekar, A., Vulchanova, L., Hogquist, K. A., & Jameson, S. C. (2018). The purinergic receptor P2RX7 directs metabolic fitness of long-lived memory CD8(+) T cells. *Nature*, 559(7713), 264-268.

Bottcher, J. P., Beyer, M., Meissner, F., Abdullah, Z., Sander, J., Hochst, B., Eickhoff, S., Rieckmann, J. C., Russo, C., Bauer, T., Flecken, T., Giesen, D., Engel, D., Jung, S., Busch, D. H., Protzer, U., Thimme, R., Mann, M., Kurts, C., Schultze, J. L., Kastenmuller, W., & Knolle, P. A. (2015). Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nat Commun*, 6, 8306.

Breuer, D. A., Pacheco, M. C., Washington, M. K., Montgomery, S. A., Hasty, A. H., & Kennedy, A. J. (2020). CD8(+) T cells regulate liver injury in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 318(2), G211-g224.

## 6. Literaturverzeichnis

Buck, M. D., Sowell, R. T., Kaech, S. M., & Pearce, E. L. (2017). Metabolic Instruction of Immunity. *Cell*, *169*(4), 570-586.

Casey, K. A., Fraser, K. A., Schenkel, J. M., Moran, A., Abt, M. C., Beura, L. K., Lucas, P. J., Artis, D., Wherry, E. J., Hogquist, K., Vezys, V., & Masopust, D. (2012). Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J Immunol*, *188*(10), 4866-4875.

Cepero-Donates, Y., Rakotoarivelo, V., Mayhue, M., Ma, A., Chen, Y. G., & Ramanathan, S. (2016). Homeostasis of IL-15 dependent lymphocyte subsets in the liver. *Cytokine*, *82*, 95-101.

Chang, C. H., Curtis, J. D., Maggi, L. B., Jr., Faubert, B., Villarino, A. V., O'Sullivan, D., Huang, S. C., van der Windt, G. J., Blagih, J., Qiu, J., Weber, J. D., Pearce, E. J., Jones, R. G., & Pearce, E. L. (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, *153*(6), 1239-1251.

Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., Armstrong, A. J., Penuela, S., Laird, D. W., Salvesen, G. S., Isakson, B. E., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, *467*(7317), 863-867.

Chen, G. Y., & Nunez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, *10*(12), 826-837.

Chen, J., Lopez-Moyado, I. F., Seo, H., Lio, C. J., Hempleman, L. J., Sekiya, T., Yoshimura, A., Scott-Browne, J. P., & Rao, A. (2019). NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature*, *567*(7749), 530-534.

Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, *13*(4), 227-242.

## 6. Literaturverzeichnis

Chen, Y., Zander, R., Khatun, A., Schauder, D. M., & Cui, W. (2018). Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. *Front Immunol*, 9, 2826.

Cheuk, S., Schlums, H., Gallais Serezal, I., Martini, E., Chiang, S. C., Marquardt, N., Gibbs, A., Detlofsson, E., Introini, A., Forkel, M., Hoog, C., Tjernlund, A., Michaelsson, J., Folkersen, L., Mjosberg, J., Blomqvist, L., Ehrstrom, M., Stahle, M., Bryceson, Y. T., & Eidsmo, L. (2017). CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8(+) T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity*, 46(2), 287-300.

Chu, T., Tyznik, A. J., Roepke, S., Berkley, A. M., Woodward-Davis, A., Pattacini, L., Bevan, M. J., Zehn, D., & Prlic, M. (2013). Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell Rep*, 3(3), 701-708.

Cibrian, D., & Sanchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*, 47(6), 946-953.

Clark, R. A. (2015). Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med*, 7(269), 269rv261.

Connolly, J. J., Ooka, K., & Lim, J. K. (2018). Future Pharmacotherapy for Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH): Review of Phase 2 and 3 Trials. *J Clin Transl Hepatol*, 6(3), 264-275.

Crispe, I. N., & Mehal, W. Z. (1996). Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today*, 17(11), 522-525.

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., & Ikuta, K. (2014). Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(5), 1915-1920.

Dominguez, C. X., Amezquita, R. A., Guan, T., Marshall, H. D., Joshi, N. S., Kleinstein, S. H., & Kaech, S. M. (2015). The transcription factors ZEB2 and T-bet cooperate to program

## 6. Literaturverzeichnis

cytotoxic T cell terminal differentiation in response to LCMV viral infection. *J Exp Med*, 212(12), 2041-2056.

Dreos, R., Ambrosini, G., Groux, R., Cavin Perier, R., & Bucher, P. (2017). The eukaryotic promoter database in its 30th year: focus on non-vertebrate organisms. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D51-D55.

Easom, N. J. W., Stegmann, K. A., Swadling, L., Pallett, L. J., Burton, A. R., Odera, D., Schmidt, N., Huang, W. C., Fusai, G., Davidson, B., & Maini, M. K. (2018). IL-15 Overcomes Hepatocellular Carcinoma-Induced NK Cell Dysfunction. *Front Immunol*, 9, 1009.

Faletti, L., Peintner, L., Neumann, S., Sandler, S., Grabinger, T., Mac Nelly, S., Merfort, I., Huang, C. H., Tschaharganeh, D., Kang, T. W., Heinzmann, F., D'Artista, L., Maurer, U., Brunner, T., Lowe, S., Zender, L., & Borner, C. (2018). TNFalpha sensitizes hepatocytes to FasL-induced apoptosis by NFkappaB-mediated Fas upregulation. *Cell Death Dis*, 9(9), 909.

Feldstein, A. E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L. J., Lindor, K. D., & Gores, G. J. (2003). Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 125(2), 437-443.

Feldstein, A. E., Canbay, A., Guicciardi, M. E., Higuchi, H., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2003). Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *Journal of Hepatology*, 39(6), 978-983.

Fernandez-Ruiz, D., Ng, W. Y., Holz, L. E., Ma, J. Z., Zaid, A., Wong, Y. C., Lau, L. S., Mollard, V., Cozijnsen, A., Collins, N., Li, J., Davey, G. M., Kato, Y., Devi, S., Skandari, R., Pauley, M., Manton, J. H., Godfrey, D. I., Braun, A., Tay, S. S., Tan, P. S., Bowen, D. G., Koch-Nolte, F., Rissiek, B., Carbone, F. R., Crabb, B. S., Lahoud, M., Cockburn, I. A., Mueller, S. N., Bertolino, P., McFadden, G. I., Caminschi, I., & Heath, W. R. (2016). Liver-Resident Memory CD8(+) T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection. *Immunity*, 45(4), 889-902.

## 6. Literaturverzeichnis

Fooksman, D. R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G. D., Zanin-Zhorov, A., & Dustin, M. L. (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol*, *28*, 79-105.

Freeman, B. E., Hammarlund, E., Raue, H. P., & Slifka, M. K. (2012). Regulation of innate CD8+ T-cell activation mediated by cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(25), 9971-9976.

Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*, *24*(7), 908-922.

Gaud, G., Lesourne, R., & Love, P. E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, *18*(8), 485-497.

Gebhardt, T., Palendira, U., Tschärke, D. C., & Bedoui, S. (2018). Tissue-resident memory T cells in tissue homeostasis, persistent infection, and cancer surveillance. *Immunol Rev*, *283*(1), 54-76.

Gebhardt, T., Wakim, L. M., Eidsmo, L., Reading, P. C., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol*, *10*(5), 524-530.

Gerstein, M. B., Kundaje, A., Hariharan, M., Landt, S. G., Yan, K. K., Cheng, C., Mu, X. J., Khurana, E., Rozowsky, J., Alexander, R., Min, R., Alves, P., Abyzov, A., Addleman, N., Bhardwaj, N., Boyle, A. P., Cayting, P., Charos, A., Chen, D. Z., Cheng, Y., Clarke, D., Eastman, C., Euskirchen, G., Fietze, S., Fu, Y., Gertz, J., Grubert, F., Harmanci, A., Jain, P., Kasowski, M., Lacroute, P., Leng, J. J., Lian, J., Monahan, H., O'Geen, H., Ouyang, Z., Partridge, E. C., Patacsil, D., Pauli, F., Raha, D., Ramirez, L., Reddy, T. E., Reed, B., Shi, M., Slifer, T., Wang, J., Wu, L., Yang, X., Yip, K. Y., Zilberman-Schapira, G., Batzoglou, S., Sidow, A., Farnham, P. J., Myers, R. M., Weissman, S. M., & Snyder, M. (2012). Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature*, *489*(7414), 91-100.

## 6. Literaturverzeichnis

Golden-Mason, L., Kelly, A. M., Doherty, D. G., Traynor, O., McEntee, G., Kelly, J., Hegarty, J. E., & O'Farrelly, C. (2004). Hepatic interleukin 15 (IL-15) expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development. *Clin Exp Immunol*, *138*(1), 94-101.

Gur, C., Doron, S., Kfir-Erenfeld, S., Horwitz, E., Abu-Tair, L., Safadi, R., & Mandelboim, O. (2012). Nkp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut*, *61*(6), 885-893.

Harjunpaa, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., & Fagerholm, S. C. (2019). Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, *10*, 1078.

Heydtmann, M., Lalor, P. F., Eksteen, J. A., Hubscher, S. G., Briskin, M., & Adams, D. H. (2005). CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver. *J Immunol*, *174*(2), 1055-1062.

Higuera-de la Tijera, F., & Servin-Caamano, A. I. (2015). Pathophysiological mechanisms involved in non-alcoholic steatohepatitis and novel potential therapeutic targets. *World J Hepatol*, *7*(10), 1297-1301.

Holz, L. E., Prier, J. E., Freestone, D., Steiner, T. M., English, K., Johnson, D. N., Mollard, V., Cozijnsen, A., Davey, G. M., Godfrey, D. I., Yui, K., Mackay, L. K., Lahoud, M. H., Caminschi, I., McFadden, G. I., Bertolino, P., Fernandez-Ruiz, D., & Heath, W. R. (2018). CD8(+) T Cell Activation Leads to Constitutive Formation of Liver Tissue-Resident Memory T Cells that Seed a Large and Flexible Niche in the Liver. *Cell Rep*, *25*(1), 68-79 e64.

Hombrink, P., Helbig, C., Backer, R. A., Piet, B., Oja, A. E., Stark, R., Brassler, G., Jongejan, A., Jonkers, R. E., Nota, B., Basak, O., Clevers, H. C., Moerland, P. D., Amsen, D., & van Lier, R. A. (2016). Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8(+) lung-resident memory T cells. *Nat Immunol*, *17*(12), 1467-1478.

Huppa, J. B., & Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, *3*(12), 973-983.

## 6. Literaturverzeichnis

Huse, M., Lillemeier, B. F., Kuhns, M. S., Chen, D. S., & Davis, M. M. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol*, *7*(3), 247-255.

Ju, C., & Tacke, F. (2016). Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell Mol Immunol*, *13*(3), 316-327.

Kaech, S. M., & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, *12*(11), 749-761.

Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, *12*(1), 49-62.

Kerdiles, Y. M., Beisner, D. R., Tinoco, R., Dejean, A. S., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., & Hedrick, S. M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol*, *10*(2), 176-184.

Khan, O., Giles, J. R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S. F., Patel, K. P., Werner, M. T., Huang, A. C., Alexander, K. A., Wu, J. E., Attanasio, J., Yan, P., George, S. M., Bengsch, B., Staupé, R. P., Donahue, G., Xu, W., Amaravadi, R. K., Xu, X., Karakousis, G. C., Mitchell, T. C., Schuchter, L. M., Kaye, J., Berger, S. L., & Wherry, E. J. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8<sup>(+)</sup> T cell exhaustion. *Nature*, *571*(7764), 211-218.

Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C. P., O'Carroll, S. J., du Mez, E., Angel, C. E., & Graham, E. S. (2015). Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors (Basel)*, *5*(2), 199-222.

Kim, J., Chang, D. Y., Lee, H. W., Lee, H., Kim, J. H., Sung, P. S., Kim, K. H., Hong, S. H., Kang, W., Lee, J., Shin, S. Y., Yu, H. T., You, S., Choi, Y. S., Oh, I., Lee, D. H., Lee, D. H., Jung, M. K., Suh, K. S., Hwang, S., Kim, W., Park, S. H., Kim, H. J., & Shin, E. C. (2018). Innate-like Cytotoxic Function of Bystander-Activated CD8<sup>(+)</sup> T Cells Is Associated with Liver Injury in Acute Hepatitis A. *Immunity*, *48*(1), 161-173 e165.

## 6. Literaturverzeichnis

Kim, M. T., & Harty, J. T. (2014). Impact of Inflammatory Cytokines on Effector and Memory CD8+ T Cells. *Front Immunol*, 5, 295.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*, 14(6), 377-391.

Klein-Hessling, S., Muhammad, K., Klein, M., Pusch, T., Rudolf, R., Floter, J., Qureischi, M., Beilhack, A., Vaeth, M., Kummerow, C., Backes, C., Schoppmeyer, R., Hahn, U., Hoth, M., Bopp, T., Berberich-Siebelt, F., Patra, A., Avots, A., Muller, N., Schulze, A., & Serfling, E. (2017). NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8(+) T cells. *Nat Commun*, 8(1), 511.

Kragten, N. A. M., Behr, F. M., Vieira Braga, F. A., Remmerswaal, E. B. M., Wesselink, T. H., Oja, A. E., Hombrink, P., Kallies, A., van Lier, R. A. W., Stark, R., & van Gisbergen, K. (2018). Blimp-1 induces and Hobit maintains the cytotoxic mediator granzyme B in CD8 T cells. *Eur J Immunol*, 48(10), 1644-1662.

Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*, 17(5), 306-321.

Kubes, P., & Mehal, W. Z. (2012). Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, 143(5), 1158-1172.

Kumar, B. V., Ma, W., Miron, M., Granot, T., Guyer, R. S., Carpenter, D. J., Senda, T., Sun, X., Ho, S. H., Lerner, H., Friedman, A. L., Shen, Y., & Farber, D. L. (2017). Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep*, 20(12), 2921-2934.

Kurachi, M., Barnitz, R. A., Yosef, N., Odorizzi, P. M., Dilorio, M. A., Lemieux, M. E., Yates, K., Godec, J., Klatt, M. G., Regev, A., Wherry, E. J., & Haining, W. N. (2014). The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol*, 15(4), 373-383.



## 6. Literaturverzeichnis

Lee, H. G., Lee, J. U., Kim, D. H., Lim, S., Kang, I., & Choi, J. M. (2019). Pathogenic function of bystander-activated memory-like CD4(+) T cells in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Commun*, *10*(1), 709.

Lin, C. C., Bradstreet, T. R., Schwarzkopf, E. A., Sim, J., Carrero, J. A., Chou, C., Cook, L. E., Egawa, T., Taneja, R., Murphy, T. L., Russell, J. H., & Edelson, B. T. (2014). Bhlhe40 controls cytokine production by T cells and is essential for pathogenicity in autoimmune neuroinflammation. *Nat Commun*, *5*, 3551.

Liu, X., Cooper, D. E., Cluntun, A. A., Warmoes, M. O., Zhao, S., Reid, M. A., Liu, J., Lund, P. J., Lopes, M., Garcia, B. A., Wellen, K. E., Kirsch, D. G., & Locasale, J. W. (2018). Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals. *Cell*, *175*(2), 502-513 e513.

Liu, X., Wang, Y., Lu, H., Li, J., Yan, X., Xiao, M., Hao, J., Alekseev, A., Khong, H., Chen, T., Huang, R., Wu, J., Zhao, Q., Wu, Q., Xu, S., Wang, X., Jin, W., Yu, S., Wang, Y., Wei, L., Wang, A., Zhong, B., Ni, L., Liu, X., Nurieva, R., Ye, L., Tian, Q., Bian, X. W., & Dong, C. (2019). Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature*, *567*(7749), 525-529.

Lopetuso, L. R., Mocci, G., Marzo, M., D'Aversa, F., Rapaccini, G. L., Guidi, L., Armuzzi, A., Gasbarrini, A., & Papa, A. (2018). Harmful Effects and Potential Benefits of Anti-Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha on the Liver. *Int J Mol Sci*, *19*(8).

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, *15*(12), 550.

Luther, J., Garber, J. J., Khalili, H., Dave, M., Bale, S. S., Jindal, R., Motola, D. L., Luther, S., Bohr, S., Jeoung, S. W., Deshpande, V., Singh, G., Turner, J. R., Yarmush, M. L., Chung, R. T., & Patel, S. J. (2015). Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, *1*(2), 222-232.

## 6. Literaturverzeichnis

Luu, M., Weigand, K., Wedi, F., Breidenbend, C., Leister, H., Pautz, S., Adhikary, T., & Visekruna, A. (2018). Regulation of the effector function of CD8(+) T cells by gut microbiota-derived metabolite butyrate. *Sci Rep*, *8*(1), 14430.

Ma, C., Han, M., Heinrich, B., Fu, Q., Zhang, Q., Sandhu, M., Agdashian, D., Terabe, M., Berzofsky, J. A., Fako, V., Ritz, T., Longerich, T., Theriot, C. M., McCulloch, J. A., Roy, S., Yuan, W., Thovarai, V., Sen, S. K., Ruchirawat, M., Korangy, F., Wang, X. W., Trinchieri, G., & Greten, T. F. (2018). Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science*, *360*(6391).

Ma, C., Kesarwala, A. H., Eggert, T., Medina-Echeverz, J., Kleiner, D. E., Jin, P., Stroncek, D. F., Terabe, M., Kapoor, V., ElGindi, M., Han, M., Thornton, A. M., Zhang, H., Egger, M., Luo, J., Felsher, D. W., McVicar, D. W., Weber, A., Heikenwalder, M., & Greten, T. F. (2016). NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature*, *531*(7593), 253-257.

Mackay, L. K., Minnich, M., Kragten, N. A., Liao, Y., Nota, B., Seillet, C., Zaid, A., Man, K., Preston, S., Freestone, D., Braun, A., Wynne-Jones, E., Behr, F. M., Stark, R., Pellicci, D. G., Godfrey, D. I., Belz, G. T., Pellegrini, M., Gebhardt, T., Busslinger, M., Shi, W., Carbone, F. R., van Lier, R. A., Kallies, A., & van Gisbergen, K. P. (2016). Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science*, *352*(6284), 459-463.

Mackay, L. K., Rahimpour, A., Ma, J. Z., Collins, N., Stock, A. T., Hafon, M. L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S. N., Stefanovic, T., Tschärke, D. C., Heath, W. R., Inouye, M., Carbone, F. R., & Gebhardt, T. (2013). The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol*, *14*(12), 1294-1301.

Mackay, L. K., Stock, A. T., Ma, J. Z., Jones, C. M., Kent, S. J., Mueller, S. N., Heath, W. R., Carbone, F. R., & Gebhardt, T. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(18), 7037-7042.

## 6. Literaturverzeichnis

Mackay, L. K., Wynne-Jones, E., Freestone, D., Pellicci, D. G., Mielke, L. A., Newman, D. M., Braun, A., Masson, F., Kallies, A., Belz, G. T., & Carbone, F. R. (2015). T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity*, *43*(6), 1101-1111.

Mahi, N. A., Najafabadi, M. F., Pilarczyk, M., Kouril, M., & Medvedovic, M. (2019). GREIN: An Interactive Web Platform for Re-analyzing GEO RNA-seq Data. *Sci Rep*, *9*(1), 7580.

Malehmir, M., Pfister, D., Gallage, S., Szydlowska, M., Inverso, D., Kotsiliti, E., Leone, V., Peiseler, M., Surewaard, B. G. J., Rath, D., Ali, A., Wolf, M. J., Drescher, H., Healy, M. E., Dauch, D., Kroy, D., Krenkel, O., Kohlhepp, M., Engleitner, T., Olkus, A., Sijmonsma, T., Volz, J., Deppermann, C., Stegner, D., Helbling, P., Nombela-Arrieta, C., Rafiei, A., Hinterleitner, M., Rall, M., Baku, F., Borst, O., Wilson, C. L., Leslie, J., O'Connor, T., Weston, C. J., Adams, D. H., Sheriff, L., Teijeiro, A., Prinz, M., Bogeska, R., Anstee, N., Bongers, M. N., Notohamiprodjo, M., Geisler, T., Withers, D. J., Ware, J., Mann, D. A., Augustin, H. G., Vegiopoulos, A., Milsom, M. D., Rose, A. J., Lalor, P. F., Llovet, J. M., Pinyol, R., Tacke, F., Rad, R., Matter, M., Djouder, N., Kubes, P., Knolle, P. A., Unger, K., Zender, L., Nieswandt, B., Gawaz, M., Weber, A., & Heikenwalder, M. (2019). Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med*, *25*(4), 641-655.

Malik, S., Sadhu, S., Elesela, S., Pandey, R. P., Chawla, A. S., Sharma, D., Panda, L., Rathore, D., Ghosh, B., Ahuja, V., & Awasthi, A. (2017). Transcription factor Foxo1 is essential for IL-9 induction in T helper cells. *Nat Commun*, *8*(1), 815.

Man, K., & Kallies, A. (2015). Synchronizing transcriptional control of T cell metabolism and function. *Nat Rev Immunol*, *15*(9), 574-584.

Martin, B., Auffray, C., Delpoux, A., Pommier, A., Durand, A., Charvet, C., Yakonowsky, P., de Boysson, H., Bonilla, N., Audemard, A., Sparwasser, T., Salomon, B. L., Malissen, B., & Lucas, B. (2013). Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat Commun*, *4*, 2209.

## 6. Literaturverzeichnis

Martinez, G. J., Pereira, R. M., Aijo, T., Kim, E. Y., Marangoni, F., Pipkin, M. E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y. C., Crotty, S., Lamperti, E. D., Ansel, K. M., Mempel, T. R., Lahdesmaki, H., Hogan, P. G., & Rao, A. (2015). The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity*, *42*(2), 265-278.

Mathur, R., Rotroff, D., Ma, J., Shojaie, A., & Motsinger-Reif, A. (2018). Gene set analysis methods: a systematic comparison. *BioData Min*, *11*, 8.

McNamara, H. A., Cai, Y., Wagle, M. V., Sontani, Y., Roots, C. M., Miosge, L. A., O'Connor, J. H., Sutton, H. J., Ganusov, V. V., Heath, W. R., Bertolino, P., Goodnow, C. G., Parish, I. A., Enders, A., & Cockburn, I. A. (2017). Up-regulation of LFA-1 allows liver-resident memory T cells to patrol and remain in the hepatic sinusoids. *Sci Immunol*, *2*(9).

Mehta, A. K., Gracias, D. T., & Croft, M. (2018). TNF activity and T cells. *Cytokine*, *101*, 14-18.

Mieli-Vergani, G., Vergani, D., Czaja, A. J., Manns, M. P., Krawitt, E. L., Vierling, J. M., Lohse, A. W., & Montano-Loza, A. J. (2018). Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers*, *4*, 18017.

Mikulak, J., Bruni, E., Oriolo, F., Di Vito, C., & Mavilio, D. (2019). Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Frontiers in Immunology*, *10*(946).

Milner, J. J., & Goldrath, A. W. (2018). Transcriptional programming of tissue-resident memory CD8(+) T cells. *Curr Opin Immunol*, *51*, 162-169.

Milner, J. J., Toma, C., Yu, B., Zhang, K., Omilusik, K., Phan, A. T., Wang, D., Getzler, A. J., Nguyen, T., Crotty, S., Wang, W., Pipkin, M. E., & Goldrath, A. W. (2017). Runx3 programs CD8(+) T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature*, *552*(7684), 253-257.

Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P., & Feldmann, M. (2015). Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol*, *27*(1), 55-62.

Monjazeb, A. M., Tietze, J. K., Grossenbacher, S. K., Hsiao, H. H., Zamora, A. E., Mirsoian, A., Koehn, B., Blazar, B. R., Weiss, J. M., Wiltrout, R. H., Sckisel, G. D., & Murphy, W. J. (2014).

## 6. Literaturverzeichnis

Bystander activation and anti-tumor effects of CD8<sup>+</sup> T cells following Interleukin-2 based immunotherapy is independent of CD4<sup>+</sup> T cell help. *PLoS One*, 9(8), e102709.

Mossanen, J. C., Kohlhepp, M., Wehr, A., Krenkel, O., Liepelt, A., Roeth, A. A., Mockel, D., Heymann, F., Lammers, T., Gassler, N., Hermann, J., Jankowski, J., Neumann, U. P., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2019). CXCR6 Inhibits Hepatocarcinogenesis by Promoting Natural Killer T- and CD4(+) T-Cell-Dependent Control of Senescence. *Gastroenterology*, 156(6), 1877-1889 e1874.

Myers, D. R., Zikherman, J., & Roose, J. P. (2017). Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? *Trends Immunol*, 38(11), 844-857.

Narayanan, S., Surette, F. A., & Hahn, Y. S. (2016). The Immune Landscape in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immune Netw*, 16(3), 147-158.

Nicolls, M. R., & Gill, R. G. (2006). LFA-1 (CD11a) as a therapeutic target. *Am J Transplant*, 6(1), 27-36.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009). CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*, 15(8), 914-920.

O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. *Science*, 327(5969), 1098-1102.

O'Sullivan, D., van der Windt, G. J., Huang, S. C., Curtis, J. D., Chang, C. H., Buck, M. D., Qiu, J., Smith, A. M., Lam, W. Y., DiPlato, L. M., Hsu, F. F., Birnbaum, M. J., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2014). Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development. *Immunity*, 41(1), 75-88.

Pallett, L. J., Davies, J., Colbeck, E. J., Robertson, F., Hansi, N., Easom, N. J. W., Burton, A. R., Stegmann, K. A., Schurich, A., Swadling, L., Gill, U. S., Male, V., Luong, T., Gander, A.,

## 6. Literaturverzeichnis

Davidson, B. R., Kennedy, P. T. F., & Maini, M. K. (2017). IL-2(high) tissue-resident T cells in the human liver: Sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med*, *214*(6), 1567-1580.

Pallett, L. J., Gill, U. S., Quaglia, A., Sinclair, L. V., Jover-Cobos, M., Schurich, A., Singh, K. P., Thomas, N., Das, A., Chen, A., Fusai, G., Bertolotti, A., Cantrell, D. A., Kennedy, P. T., Davies, N. A., Haniffa, M., & Maini, M. K. (2015). Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. *Nat Med*, *21*(6), 591-600.

Pan, Y., Tian, T., Park, C. O., Lofftus, S. Y., Mei, S., Liu, X., Luo, C., O'Malley, J. T., Gehad, A., Teague, J. E., Divito, S. J., Fuhlbrigge, R., Puigserver, P., Krueger, J. G., Hotamisligil, G. S., Clark, R. A., & Kupper, T. S. (2017). Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. *Nature*, *543*(7644), 252-256.

Peng, M., Yin, N., Chhangawala, S., Xu, K., Leslie, C. S., & Li, M. O. (2016). Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science*, *354*(6311), 481-484.

Petrelli, A., Mijnheer, G., Hoytema van Konijnenburg, D. P., van der Wal, M. M., Giovannone, B., Mocholi, E., Vazirpanah, N., Broen, J. C., Hijnen, D., Oldenburg, B., Coffey, P. J., Vastert, S. J., Prakken, B. J., Spierings, E., Pandit, A., Mokry, M., & van Wijk, F. (2018). PD-1+CD8+ T cells are clonally expanding effectors in human chronic inflammation. *J Clin Invest*, *128*(10), 4669-4681.

Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., & Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab*, *21*(6), 805-821.

Pike Winer, L. S., & Wu, M. (2014). Rapid analysis of glycolytic and oxidative substrate flux of cancer cells in a microplate. *PLoS One*, *9*(10), e109916.

Qin, P., Borges-Marcucci, L. A., Evans, M. J., & Harnish, D. C. (2005). Bile acid signaling through FXR induces intracellular adhesion molecule-1 expression in mouse liver and human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *289*(2), G267-273.

## 6. Literaturverzeichnis

Qiu, J., Villa, M., Sanin, D. E., Buck, M. D., O'Sullivan, D., Ching, R., Matsushita, M., Grzes, K. M., Winkler, F., Chang, C. H., Curtis, J. D., Kyle, R. L., Van Teijlingen Bakker, N., Corrado, M., Haessler, F., Alfei, F., Edwards-Hicks, J., Maggi, L. B., Jr., Zehn, D., Egawa, T., Bengsch, B., Klein Geltink, R. I., Jenuwein, T., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2019). Acetate Promotes T Cell Effector Function during Glucose Restriction. *Cell Rep*, *27*(7), 2063-2074 e2065.

Rahimpour, A., Koay, H. F., Enders, A., Clanchy, R., Eckle, S. B., Meehan, B., Chen, Z., Whittle, B., Liu, L., Fairlie, D. P., Goodnow, C. C., McCluskey, J., Rossjohn, J., Uldrich, A. P., Pellicci, D. G., & Godfrey, D. I. (2015). Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J Exp Med*, *212*(7), 1095-1108.

Rao, R. R., Li, Q., Gubbels Bupp, M. R., & Shrikant, P. A. (2012). Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity*, *36*(3), 374-387.

Reading, J. L., Galvez-Cancino, F., Swanton, C., Lladser, A., Peggs, K. S., & Quezada, S. A. (2018). The function and dysfunction of memory CD8(+) T cells in tumor immunity. *Immunol Rev*, *283*(1), 194-212.

Richmond, J. M., Strassner, J. P., Zapata, L., Jr., Garg, M., Riding, R. L., Refat, M. A., Fan, X., Azzolino, V., Tovar-Garza, A., Tsurushita, N., Pandya, A. G., Tso, J. Y., & Harris, J. E. (2018). Antibody blockade of IL-15 signaling has the potential to durably reverse vitiligo. *Sci Transl Med*, *10*(450), eaam7710.

Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., & Heikenwalder, M. (2018). The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol*, *19*(3), 222-232.

Robinson, M. W., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*, *13*(3), 267-276.

Rochman, Y., Spolski, R., & Leonard, W. J. (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*, *9*(7), 480-490.

## 6. Literaturverzeichnis

Rosato, P. C., Beura, L. K., & Masopust, D. (2017). Tissue resident memory T cells and viral immunity. *Curr Opin Virol*, 22, 44-50.

Salerno, F., Paolini, N. A., Stark, R., von Lindern, M., & Wolkers, M. C. (2017). Distinct PKC-mediated posttranscriptional events set cytokine production kinetics in CD8(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(36), 9677-9682.

Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., Robuck, P. R., & Nash, C. R. N. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, 362(18), 1675-1685.

Savio, L. E. B., de Andrade Mello, P., Figliuolo, V. R., de Avelar Almeida, T. F., Santana, P. T., Oliveira, S. D. S., Silva, C. L. M., Feldbrugge, L., Csizmadia, E., Minshall, R. D., Longhi, M. S., Wu, Y., Robson, S. C., & Coutinho-Silva, R. (2017). CD39 limits P2X7 receptor inflammatory signaling and attenuates sepsis-induced liver injury. *J Hepatol*, 67(4), 716-726.

Schenk, U., Westendorf, A. M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E., & Grassi, F. (2008). Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal*, 1(39), ra6.

Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Casey, K. A., Beura, L. K., Pauken, K. E., Vezys, V., & Masopust, D. (2016). IL-15-Independent Maintenance of Tissue-Resident and Boosted Effector Memory CD8 T Cells. *J Immunol*, 196(9), 3920-3926.

Schluns, K. S., & Lefrancois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*, 3(4), 269-279.

Schmits, R., Kundig, T. M., Baker, D. M., Shumaker, G., Simard, J. J., Duncan, G., Wakeham, A., Shahinian, A., van der Heiden, A., Bachmann, M. F., Ohashi, P. S., Mak, T. W., & Hickstein, D. D. (1996). LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med*, 183(4), 1415-1426.



## 6. Literaturverzeichnis

Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M., & Feldstein, A. E. (2018). Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *15*(6), 349-364.

Seminara, N. M., & Gelfand, J. M. (2010). Assessing long-term drug safety: lessons (re) learned from raptiva. *Semin Cutan Med Surg*, *29*(1), 16-19.

Shalapour, S., Lin, X. J., Bastian, I. N., Brain, J., Burt, A. D., Aksenov, A. A., Vrbanac, A. F., Li, W., Perkins, A., Matsutani, T., Zhong, Z., Dhar, D., Navas-Molina, J. A., Xu, J., Loomba, R., Downes, M., Yu, R. T., Evans, R. M., Dorrestein, P. C., Knight, R., Benner, C., Anstee, Q. M., & Karin, M. (2017). Inflammation-induced IgA<sup>+</sup> cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature*, *551*(7680), 340-345.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, *13*(11), 2498-2504.

Sharpe, A. H., & Pauken, K. E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*, *18*(3), 153-167.

Siska, P. J., & Rathmell, J. C. (2016). Metabolic Signaling Drives IFN- $\gamma$ . *Cell Metab*, *24*(5), 651-652.

Skon, C. N., Lee, J. Y., Anderson, K. G., Masopust, D., Hogquist, K. A., & Jameson, S. C. (2013). Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol*, *14*(12), 1285-1293.

Smolders, J., Heutinck, K. M., Fransen, N. L., Remmerswaal, E. B. M., Hombrink, P., Ten Berge, I. J. M., van Lier, R. A. W., Huitinga, I., & Hamann, J. (2018). Tissue-resident memory T cells populate the human brain. *Nat Commun*, *9*(1), 4593.

Somersalo, K., Anikeeva, N., Sims, T. N., Thomas, V. K., Strong, R. K., Spies, T., Lebedeva, T., Sykulev, Y., & Dustin, M. L. (2004). Cytotoxic T lymphocytes form an antigen-independent ring junction. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(1), 49-57.

## 6. Literaturverzeichnis

Sonnenberg, G. F., & Hepworth, M. R. (2019). Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, *19*(10), 599-613.

Speiser, D. E., Utzschneider, D. T., Oberle, S. G., Munz, C., Romero, P., & Zehn, D. (2014). T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat Rev Immunol*, *14*(11), 768-774.

Stark, R., Wesselink, T. H., Behr, F. M., Kragten, N. A. M., Arens, R., Koch-Nolte, F., van Gisbergen, K., & van Lier, R. A. W. (2018). T RM maintenance is regulated by tissue damage via P2RX7. *Sci Immunol*, *3*(30), eaau1022.

Strasser, A., Jost, P. J., & Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, *30*(2), 180-192.

Suzuki, A., McCall, S., Choi, S. S., Sicklick, J. K., Huang, J., Qi, Y., Zdanowicz, M., Camp, T., Li, Y. X., & Diehl, A. M. (2006). Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity. *J Hepatol*, *45*(3), 410-418.

Syn, W. K., Agboola, K. M., Swiderska, M., Michelotti, G. A., Liaskou, E., Pang, H., Xie, G., Philips, G., Chan, I. S., Karaca, G. F., Pereira Tde, A., Chen, Y., Mi, Z., Kuo, P. C., Choi, S. S., Guy, C. D., Abdelmalek, M. F., & Diehl, A. M. (2012). NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, *61*(9), 1323-1329.

Takamura, S. (2018). Niches for the Long-Term Maintenance of Tissue-Resident Memory T Cells. *Front Immunol*, *9*, 1214.

Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu Rev Immunol*, *36*, 579-601.

Thomson, A. W., & Knolle, P. A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*, *10*(11), 753-766.

Tian, Y., & Zajac, A. J. (2016). IL-21 and T Cell Differentiation: Consider the Context. *Trends Immunol*, *37*(8), 557-568.

## 6. Literaturverzeichnis

Tosello-Trampont, A. C., Landes, S. G., Nguyen, V., Novobrantseva, T. I., & Hahn, Y. S. (2012). Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production. *J Biol Chem*, *287*(48), 40161-40172.

Trebak, M., & Kinet, J. P. (2019). Calcium signalling in T cells. *Nat Rev Immunol*, *19*(3), 154-169.

Tse, S. W., Radtke, A. J., Espinosa, D. A., Cockburn, I. A., & Zavala, F. (2014). The chemokine receptor CXCR6 is required for the maintenance of liver memory CD8(+) T cells specific for infectious pathogens. *J Infect Dis*, *210*(9), 1508-1516.

Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *14*(7), 397-411.

Utzschneider, D. T., Charmoy, M., Chennupati, V., Pousse, L., Ferreira, D. P., Calderon-Copete, S., Danilo, M., Alfei, F., Hofmann, M., Wieland, D., Pradervand, S., Thimme, R., Zehn, D., & Held, W. (2016). T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8(+) T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity*, *45*(2), 415-427.

Vaeth, M., & Feske, S. (2018). NFAT control of immune function: New Frontiers for an Abiding Trooper. *F1000Res*, *7*, 260.

Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. A. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol*, *7*, 147.

Verdeil, G. (2016). MAF drives CD8(+) T-cell exhaustion. *Oncoimmunology*, *5*(2), e1082707.

Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., Friedman, S. L., Diago, M., & Romero-Gomez, M. (2015). Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, *149*(2), 367-378 e365; quiz e314-365.

Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*, *15*(6), 388-400.

## 6. Literaturverzeichnis

Wang, X., Tian, Z., & Peng, H. (2020). Tissue-resident memory-like ILCs: innate counterparts of T(RM) cells. *Protein Cell*, *11*(2), 85-96.

Wang, Z., Civelek, M., Miller, C. L., Sheffield, N. C., Guertin, M. J., & Zang, C. (2018). BART: a transcription factor prediction tool with query gene sets or epigenomic profiles. *Bioinformatics*, *34*(16), 2867-2869.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, *356*(6367), 314-317.

Wolf, M. J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., Lorentzen, A., Einer, C., Schulz, S., Clavel, T., Protzer, U., Thiele, C., Zischka, H., Moch, H., Tschop, M., Tumanov, A. V., Haller, D., Unger, K., Karin, M., Kopf, M., Knolle, P., Weber, A., & Heikenwalder, M. (2014). Metabolic activation of intrahepatic CD8<sup>+</sup> T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell*, *26*(4), 549-564.

Wu, H., Liao, W., Li, Q., Long, H., Yin, H., Zhao, M., Chan, V., Lau, C. S., & Lu, Q. (2018). Pathogenic role of tissue-resident memory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, *17*(9), 906-911.

Xin, G., Schauder, D. M., Lainez, B., Weinstein, J. S., Dai, Z., Chen, Y., Esplugues, E., Wen, R., Wang, D., Parish, I. A., Zajac, A. J., Craft, J., & Cui, W. (2015). A Critical Role of IL-21-Induced BATF in Sustaining CD8-T-Cell-Mediated Chronic Viral Control. *Cell Rep*, *13*(6), 1118-1124.

Xu, R., Huang, H., Zhang, Z., & Wang, F. S. (2014). The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell Mol Immunol*, *11*(3), 224-231.

Yang, W., Tao, Y., Wu, Y., Zhao, X., Ye, W., Zhao, D., Fu, L., Tian, C., Yang, J., He, F., & Tang, L. (2019). Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat Commun*, *10*(1), 1076.

## 6. Literaturverzeichnis

Yasuda, K., Takeuchi, Y., & Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol*, *41*(3), 283-297.

Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *15*(1), 11-20.

Zen, Y., & Yeh, M. M. (2018). Hepatotoxicity of immune checkpoint inhibitors: a histology study of seven cases in comparison with autoimmune hepatitis and idiosyncratic drug-induced liver injury. *Mod Pathol*, *31*(6), 965-973.

Zhou, Q., Liu, M., Xia, X., Gong, T., Feng, J., Liu, W., Liu, Y., Zhen, B., Wang, Y., Ding, C., & Qin, J. (2017). A mouse tissue transcription factor atlas. *Nat Commun*, *8*, 15089.

Zuba-Surma, E. K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., Lillard, J. W., Jr., & Ratajczak, M. Z. (2007). The ImageStream System: a key step to a new era in imaging. *Folia Histochem Cytobiol*, *45*(4), 279-290.

Zundler, S., Becker, E., Spocinska, M., Slawik, M., Parga-Vidal, L., Stark, R., Wiendl, M., Atreya, R., Rath, T., Leppkes, M., Hildner, K., Lopez-Posadas, R., Lukassen, S., Ekici, A. B., Neufert, C., Atreya, I., van Gisbergen, K., & Neurath, M. F. (2019). Hobit- and Blimp-1-driven CD4(+) tissue-resident memory T cells control chronic intestinal inflammation. *Nat Immunol*, *20*(3), 288-300.

## 7. Anhang

### 7. Anhang

#### 7.1 Tabellen

**Tab. 1:** DEGs (log<sub>2</sub>FC=0,66) von CXCR6<sup>+</sup> Zellen aus CD-HFD Mäusen vs. CXCR6<sup>+</sup> aus ND Mäusen

Gen	log <sub>2</sub> FoldChange	Regulation	pvalue	padj
Maf	3,207649643	Hoch	1,94E-26	5,71E-23
Pdcd1	3,061853621	Hoch	9,17E-43	8,09E-39
Il10	3,045974198	Hoch	1,39E-16	6,43E-14
Ctla4	2,904537872	Hoch	4,50E-25	7,94E-22
Adgrg1	2,759208119	Hoch	1,17E-16	5,72E-14
Coch	2,60312232	Hoch	1,45E-11	3,28E-09
Tigit	2,53317987	Hoch	1,14E-17	6,73E-15
Havcr2	2,447511013	Hoch	8,49E-12	2,02E-09
Rgs16	2,418639286	Hoch	1,72E-17	9,17E-15
Penk	2,410458957	Hoch	1,49E-10	2,79E-08
Ttn	2,361747424	Hoch	4,92E-13	1,40E-10
Csf1	2,249783695	Hoch	4,85E-10	8,38E-08
Tox	2,21736889	Hoch	3,45E-26	7,60E-23
Perp	2,11880779	Hoch	8,16E-09	1,18E-06
Ica1	2,107704657	Hoch	4,52E-08	5,75E-06
Neb	2,103045397	Hoch	4,56E-08	5,75E-06
Ikzf2	1,980414572	Hoch	4,47E-08	5,75E-06
Tox2	1,97850638	Hoch	3,05E-07	3,16E-05
Glrx	1,956883239	Hoch	3,74E-15	1,37E-12
Trps1	1,902519484	Hoch	2,40E-08	3,20E-06
Lag3	1,901260207	Hoch	1,29E-07	1,45E-05
Gzmk	1,868663112	Hoch	3,79E-22	4,18E-19
Ier3	1,868575559	Hoch	8,69E-18	5,48E-15
Gm4956	1,805373518	Hoch	1,59E-06	1,35E-04
Batf	1,79566938	Hoch	4,09E-15	1,44E-12
Ier5l	1,785235912	Hoch	2,75E-06	2,14E-04
Izumo1r	1,77654626	Hoch	1,16E-08	1,63E-06
2310031A07Rik	1,764926871	Hoch	4,13E-06	3,04E-04
Plscr1	1,755082803	Hoch	2,03E-07	2,19E-05
04. Sep	1,723331489	Hoch	1,58E-06	1,35E-04
Tnfrsf4	1,72107665	Hoch	8,53E-06	5,79E-04
Tcrg-C4	1,667019798	Hoch	2,05E-08	2,83E-06
Prdm1	1,64716072	Hoch	1,09E-07	1,28E-05
Hist1h1b	1,638318767	Hoch	1,14E-05	7,10E-04
Ifi27l2a	1,617099581	Hoch	5,30E-15	1,80E-12
Lax1	1,589143132	Hoch	3,17E-12	8,48E-10
Podnl1	1,575533053	Hoch	1,38E-06	1,22E-04
Serpina3f	1,527155461	Hoch	2,04E-05	1,19E-03
Car2	1,521205892	Hoch	8,00E-05	3,68E-03
Entpd1	1,520665669	Hoch	4,26E-10	7,51E-08
Gm33782	1,515559605	Hoch	1,03E-05	6,60E-04
Litaf	1,507628528	Hoch	6,43E-10	1,07E-07

## 7. Anhang

Chst2	1,494403122	Hoch	1,10E-04	4,82E-03
Samsn1	1,471329251	Hoch	1,56E-07	1,69E-05
Nap1l3	1,426312082	Hoch	2,27E-04	9,22E-03
Rgs1	1,394543884	Hoch	3,57E-15	1,37E-12
Syt11	1,393817978	Hoch	2,51E-06	1,99E-04
Tnfsf13b	1,381544805	Hoch	3,53E-04	1,31E-02
Nr4a2	1,349583331	Hoch	4,08E-11	8,77E-09
Sh2d2a	1,337038561	Hoch	5,60E-19	4,49E-16
Sdcbp2	1,331971804	Hoch	1,04E-04	4,59E-03
Adam19	1,324733677	Hoch	1,04E-07	1,26E-05
Eea1	1,322011343	Hoch	1,11E-07	1,29E-05
Icos	1,316431174	Hoch	1,03E-05	6,60E-04
Mir155hg	1,310801512	Hoch	7,06E-04	2,38E-02
Hip1	1,308430501	Hoch	1,29E-04	5,56E-03
Sh2d1a	1,305217572	Hoch	8,01E-12	1,96E-09
Igkc	1,303480399	Hoch	1,53E-06	1,33E-04
Dapk2	1,295234217	Hoch	5,02E-05	2,49E-03
Tnfrsf9	1,292599326	Hoch	7,55E-04	2,49E-02
Casp3	1,291681509	Hoch	6,46E-05	3,03E-03
Hist1h1c	1,288070903	Hoch	8,79E-11	1,72E-08
Il10ra	1,283501235	Hoch	5,09E-10	8,64E-08
Baz1a	1,279350679	Hoch	3,04E-05	1,65E-03
Bhlhe40	1,275268996	Hoch	1,77E-17	9,17E-15
Arap2	1,26917431	Hoch	4,41E-07	4,37E-05
Chn2	1,259348291	Hoch	1,40E-04	5,97E-03
Hist1h1e	1,249548877	Hoch	3,10E-06	2,36E-04
Osgin1	1,246604465	Hoch	2,18E-04	8,93E-03
Chst12	1,24164563	Hoch	1,30E-05	7,99E-04
Hist1h2ai	1,234106677	Hoch	1,42E-03	4,05E-02
Tbc1d4	1,228215258	Hoch	1,40E-03	3,98E-02
Tmem2	1,216162695	Hoch	1,60E-03	4,43E-02
Isg20	1,211678473	Hoch	4,16E-04	1,51E-02
Galm	1,184551764	Hoch	1,79E-03	4,77E-02
Agpat4	1,155946899	Hoch	1,35E-03	3,93E-02
Eomes	1,147805515	Hoch	5,98E-05	2,88E-03
Tspan3	1,134526587	Hoch	4,54E-05	2,29E-03
Ube2l6	1,13193142	Hoch	9,44E-04	2,95E-02
Serpina3g	1,127167067	Hoch	4,44E-05	2,25E-03
Glmn	1,115423353	Hoch	1,84E-03	4,86E-02
Cd38	1,110647318	Hoch	2,46E-04	9,88E-03
Abi3	1,104859013	Hoch	1,71E-05	1,03E-03
Crem	1,103148295	Hoch	7,52E-04	2,48E-02
Ptpn11	1,102139809	Hoch	1,40E-04	5,97E-03
Bcl2a1d	1,087998696	Hoch	6,39E-05	3,03E-03
Sart3	1,087275609	Hoch	7,51E-04	2,48E-02
Agfg1	1,083787213	Hoch	3,15E-04	1,20E-02
Cblb	1,075901292	Hoch	2,67E-05	1,48E-03
Mphosph6	1,072579377	Hoch	1,09E-04	4,80E-03
Chchd10	1,071846461	Hoch	5,46E-04	1,92E-02
Aim2	1,055543536	Hoch	1,37E-03	3,96E-02
Cd27	1,054762599	Hoch	1,70E-10	3,12E-08
Ccl5	1,054333326	Hoch	5,20E-23	6,55E-20
Fyn	1,034639135	Hoch	4,45E-11	9,14E-09

## 7. Anhang

Rgs3	1,022745801	Hoch	3,01E-04	1,15E-02
Prkch	1,001229636	Hoch	3,18E-04	1,20E-02
Skil	0,995056345	Hoch	1,53E-03	4,28E-02
Nedd9	0,985464674	Hoch	2,89E-04	1,13E-02
Mxd1	0,958070586	Hoch	1,21E-03	3,66E-02
Kif13b	0,957785934	Hoch	1,68E-03	4,59E-02
Stat3	0,944643975	Hoch	8,07E-06	5,56E-04
Rpa2	0,936421051	Hoch	5,91E-05	2,86E-03
Abcb9	0,935503951	Hoch	5,34E-04	1,89E-02
Gpr65	0,931647916	Hoch	7,91E-04	2,56E-02
Crbn	0,928511681	Hoch	7,08E-04	2,38E-02
AW112010	0,916165207	Hoch	1,82E-11	4,01E-09
Tnfrsf18	0,913418568	Hoch	8,03E-07	7,70E-05
Rab19	0,905127785	Hoch	5,46E-04	1,92E-02
Sptlc2	0,893989009	Hoch	3,62E-04	1,34E-02
Nkg7	0,886826516	Hoch	8,68E-21	7,66E-18
Stard3nl	0,880139138	Hoch	5,70E-04	1,99E-02
Serpinb6b	0,879583855	Hoch	7,59E-04	2,49E-02
Sub1	0,853979018	Hoch	2,80E-09	4,19E-07
Cd82	0,8538152	Hoch	1,54E-06	1,33E-04
Baiap3	0,849222746	Hoch	2,83E-05	1,55E-03
Acadl	0,845166138	Hoch	6,36E-04	2,18E-02
Ctsb	0,837642769	Hoch	4,22E-06	3,08E-04
Agpat3	0,829109699	Hoch	2,55E-04	1,01E-02
Hilpda	0,822330258	Hoch	1,77E-03	4,73E-02
Cd28	0,818440005	Hoch	8,86E-06	5,92E-04
S100a11	0,806661072	Hoch	1,60E-09	2,47E-07
Vps37b	0,805148296	Hoch	8,04E-06	5,56E-04
1700020114Rik	0,79702108	Hoch	6,25E-04	2,16E-02
Dusp1	0,796183047	Hoch	2,84E-07	3,02E-05
Nfatc1	0,795104357	Hoch	3,26E-04	1,22E-02
Ccr5	0,792222585	Hoch	9,38E-05	4,20E-03
Rabgap1l	0,76508269	Hoch	9,92E-04	3,06E-02
Bcl2a1b	0,756503365	Hoch	7,81E-04	2,55E-02
Ctla2a	0,756501937	Hoch	2,14E-05	1,24E-03
Efhd2	0,754851807	Hoch	4,08E-05	2,13E-03
Rbl2	0,748831907	Hoch	1,35E-03	3,93E-02
Prf1	0,748703893	Hoch	8,29E-05	3,77E-03
Kmt2a	0,743125592	Hoch	1,72E-03	4,63E-02
Cd3e	0,738587403	Hoch	1,05E-11	2,44E-09
Runx3	0,731205464	Hoch	7,19E-04	2,40E-02
Itm2c	0,730577858	Hoch	1,72E-04	7,17E-03
Reps1	0,71217136	Hoch	9,07E-04	2,85E-02
Arl6ip1	0,704890836	Hoch	1,33E-06	1,19E-04
Cd3g	0,699513211	Hoch	7,57E-08	9,28E-06
IL-21r	0,695444412	Hoch	4,95E-05	2,47E-03
Lime1	0,675094672	Hoch	9,11E-07	8,55E-05
Id2	0,672621764	Hoch	5,68E-05	2,77E-03
Slc3a2	0,66186622	Hoch	3,36E-06	2,49E-04
Gimap7	0,660706474	Hoch	9,24E-06	6,04E-04
Ifngr1	-0,662509824	Runter	1,30E-05	7,99E-04
Bzw2	-0,674792725	Runter	8,11E-04	2,61E-02
Rpl29	-0,678449753	Runter	6,44E-06	4,58E-04



## 7. Anhang

Plec	-0,68345177	Runter	8,78E-04	2,77E-02
Gpr183	-0,688883278	Runter	1,33E-03	3,90E-02
Tbx21	-0,693393829	Runter	9,47E-04	2,95E-02
Nfkbia	-0,710846644	Runter	3,27E-06	2,45E-04
Gpx1	-0,714343972	Runter	2,96E-04	1,14E-02
Gm19585	-0,714353281	Runter	1,64E-03	4,53E-02
Gm10443	-0,728375547	Runter	1,19E-05	7,42E-04
Cd69	-0,730220334	Runter	5,24E-06	3,79E-04
Atp1b3	-0,744549762	Runter	2,41E-06	1,93E-04
Gramd3	-0,765312822	Runter	8,99E-05	4,05E-03
Ptpn6	-0,771901404	Runter	4,20E-05	2,18E-03
Prdx6	-0,784320268	Runter	7,94E-06	5,56E-04
Glipr2	-0,821091496	Runter	7,08E-05	3,29E-03
Snord13	-0,826416623	Runter	3,52E-05	1,87E-03
Arl4c	-0,837952696	Runter	1,06E-03	3,25E-02
Gm10076	-0,840062116	Runter	1,08E-05	6,78E-04
Rasa3	-0,841130041	Runter	1,22E-04	5,32E-03
Iqgap2	-0,843098152	Runter	2,46E-04	9,88E-03
Fmc1	-0,844731382	Runter	1,76E-03	4,73E-02
Tmsb10	-0,858116163	Runter	5,81E-18	3,94E-15
Egr1	-0,866198539	Runter	1,70E-03	4,61E-02
Hvcn1	-0,873233341	Runter	8,21E-04	2,63E-02
Rcsd1	-0,875356199	Runter	1,09E-03	3,34E-02
Atp11b	-0,876639669	Runter	6,29E-04	2,17E-02
Zfp36l1	-0,887178731	Runter	1,65E-06	1,39E-04
Kcnn4	-0,89263359	Runter	2,90E-04	1,13E-02
Gm2682	-0,91299573	Runter	2,99E-04	1,15E-02
Snhg8	-0,926675874	Runter	3,85E-07	3,90E-05
Ahnak	-0,930532188	Runter	3,30E-08	4,34E-06
Nsmce1	-0,941357403	Runter	7,86E-04	2,56E-02
Gm26917	-0,947040505	Runter	1,94E-04	8,03E-03
Ap1g2	-0,950663012	Runter	4,16E-04	1,51E-02
Evl	-0,950880149	Runter	1,01E-06	9,14E-05
Slc12a7	-0,954394509	Runter	1,31E-03	3,86E-02
Cdkn2d	-0,976742461	Runter	9,24E-06	6,04E-04
Atp2b1	-0,977425011	Runter	1,01E-05	6,53E-04
Nr4a1	-0,982100393	Runter	4,26E-07	4,27E-05
Itgb1	-0,983345263	Runter	2,81E-06	2,16E-04
Epsti1	-1,000003635	Runter	7,16E-10	1,15E-07
Clec2i	-1,082662109	Runter	6,98E-04	2,36E-02
Card19	-1,093299811	Runter	2,88E-04	1,13E-02
Zfp36	-1,100071405	Runter	1,40E-09	2,21E-07
Gadd45g	-1,129463384	Runter	1,12E-03	3,40E-02
Satb1	-1,142810449	Runter	1,69E-03	4,60E-02
Nfkbid	-1,14536767	Runter	2,32E-05	1,32E-03
Tnfaip8l2	-1,147051331	Runter	6,25E-05	3,00E-03
Pdlim1	-1,161416503	Runter	2,20E-04	8,99E-03
Tagln2	-1,177794735	Runter	3,30E-12	8,56E-10
Pim1	-1,178647774	Runter	1,28E-06	1,15E-04
IL-2	-1,194328278	Runter	1,35E-03	3,93E-02
Prdx4	-1,205053802	Runter	1,75E-03	4,71E-02
Klrb1f	-1,217488929	Runter	1,52E-03	4,27E-02
Fcgr2b	-1,221520821	Runter	1,36E-03	3,93E-02

## 7. Anhang

Il6ra	-1,222833188	Runter	1,27E-03	3,81E-02
Arhgap18	-1,224654003	Runter	6,97E-04	2,36E-02
Slco3a1	-1,225031503	Runter	1,28E-03	3,82E-02
Mir7050	-1,228885041	Runter	1,49E-03	4,21E-02
Ms4a4c	-1,232621502	Runter	1,83E-05	1,09E-03
Rgcc	-1,234817316	Runter	2,86E-05	1,56E-03
Edaradd	-1,256844485	Runter	1,12E-03	3,40E-02
Slc11a2	-1,263065272	Runter	2,92E-04	1,13E-02
Eef2kmt	-1,26635497	Runter	4,53E-04	1,62E-02
Rara	-1,269880005	Runter	2,96E-04	1,14E-02
Klra3	-1,272361607	Runter	4,64E-04	1,65E-02
Tespa1	-1,276694957	Runter	2,56E-05	1,43E-03
Nrm	-1,276840144	Runter	5,72E-04	1,99E-02
Tnfsf14	-1,289303458	Runter	2,46E-04	9,88E-03
Lgals3	-1,290590135	Runter	1,07E-08	1,52E-06
Klra13-ps	-1,293099872	Runter	1,01E-04	4,52E-03
Pcsk4	-1,297686979	Runter	7,91E-04	2,56E-02
Rgs10	-1,301098586	Runter	5,30E-06	3,80E-04
Pik3ip1	-1,314158787	Runter	2,80E-05	1,55E-03
Acss2	-1,317931814	Runter	5,27E-05	2,58E-03
Klrb1c	-1,325621607	Runter	2,75E-04	1,09E-02
Fosb	-1,325906057	Runter	2,36E-05	1,33E-03
Zeb2	-1,347043128	Runter	3,48E-04	1,30E-02
Vim	-1,35795424	Runter	1,27E-13	4,16E-11
Snora24	-1,364931874	Runter	3,90E-05	2,05E-03
P2rx7	-1,368668525	Runter	4,06E-04	1,48E-02
Plin3	-1,36895076	Runter	2,05E-04	8,44E-03
Klf2	-1,370911498	Runter	1,09E-23	1,61E-20
Lef1	-1,38152832	Runter	8,26E-07	7,84E-05
Pag1	-1,382234524	Runter	3,55E-04	1,32E-02
Itgb7	-1,387611386	Runter	4,42E-11	9,14E-09
Cx3cr1	-1,396570607	Runter	1,71E-06	1,41E-04
Klrk1	-1,399356621	Runter	2,29E-12	6,30E-10
Emb	-1,401544146	Runter	1,07E-07	1,28E-05
Itga1	-1,416534749	Runter	5,23E-05	2,58E-03
Bmyc	-1,433054789	Runter	1,46E-04	6,18E-03
Hspa1a	-1,472255977	Runter	6,72E-05	3,14E-03
Cmah	-1,477637704	Runter	2,42E-05	1,36E-03
Anxa1	-1,481155917	Runter	1,21E-04	5,28E-03
Fcgrt	-1,486004888	Runter	3,55E-05	1,88E-03
Gcnt2	-1,490234336	Runter	7,60E-05	3,51E-03
Nsg2	-1,499298918	Runter	4,43E-05	2,25E-03
Gzmm	-1,522026334	Runter	2,36E-06	1,91E-04
Jun	-1,52855984	Runter	3,79E-13	1,12E-10
Plac8	-1,530497427	Runter	6,78E-06	4,78E-04
Xcl1	-1,531817959	Runter	1,68E-06	1,40E-04
Dnajc15	-1,539411194	Runter	1,36E-18	1,00E-15
Il18rap	-1,54749952	Runter	2,76E-06	2,14E-04
Il18r1	-1,557550395	Runter	5,90E-07	5,78E-05
Cd226	-1,592640851	Runter	2,98E-07	3,13E-05
Fos	-1,599639202	Runter	2,60E-15	1,04E-12
Sh3bp5	-1,684258869	Runter	2,28E-06	1,86E-04
Gab3	-1,713146244	Runter	3,15E-07	3,23E-05

## 7. Anhang

Map3k8	-1,721204592	Runter	9,73E-07	9,00E-05
Aqp9	-1,721656056	Runter	8,64E-06	5,82E-04
Klhl6	-1,743223109	Runter	7,25E-11	1,45E-08
S1pr1	-1,745748268	Runter	3,30E-13	1,01E-10
Klrc1	-1,76475274	Runter	9,74E-11	1,87E-08
Tcf7	-1,800035974	Runter	2,61E-13	8,22E-11
Nt5e	-1,813439138	Runter	2,74E-06	2,14E-04
Ass1	-1,825578784	Runter	6,16E-07	5,98E-05
Jaml	-1,867521267	Runter	6,91E-10	1,13E-07
Sell	-1,883701155	Runter	6,47E-12	1,63E-09
Tdrp	-1,891965806	Runter	9,80E-07	9,00E-05
Ccr7	-1,900749233	Runter	4,90E-08	6,09E-06
Ly6c2	-2,019633281	Runter	8,25E-40	3,64E-36
S1pr5	-2,064422345	Runter	2,39E-08	3,20E-06
Kcnj8	-2,097332131	Runter	4,66E-09	6,86E-07
Klra9	-2,341870199	Runter	2,09E-10	3,77E-08
IL-7r	-2,410574535	Runter	5,00E-22	4,90E-19
Adgrg5	-2,431535438	Runter	1,29E-15	5,42E-13
Tnf	-2,499834283	Runter	1,72E-16	7,57E-14

**Tab. 2:** DEGs (log<sub>2</sub>FC=0,66) in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen

Gen	log <sub>2</sub> FoldChange	Regulation	pvalue	padj
Adgrg1	2,86192818	Hoch	3,72E-18	1,11E-15
Cxcr6	2,853918101	Hoch	5,99E-54	3,05E-50
Osgin1	2,41215669	Hoch	2,35E-11	3,42E-09
Tcrg-C4	2,352715982	Hoch	1,10E-17	3,11E-15
Chn2	2,270117354	Hoch	3,88E-11	5,48E-09
Csf1	2,188349069	Hoch	2,89E-10	3,68E-08
Cd160	2,049138845	Hoch	9,37E-18	2,73E-15
Podnl1	1,9358856	Hoch	5,40E-09	5,50E-07
Pdcd1	1,89014015	Hoch	1,53E-29	1,41E-26
2900026A02Rik	1,879583012	Hoch	8,85E-07	5,66E-05
Cd244a	1,844688066	Hoch	5,34E-07	3,60E-05
Tcrg-C2	1,820461846	Hoch	4,86E-08	4,15E-06
Susd3	1,720070453	Hoch	1,07E-09	1,17E-07
Entpd1	1,707425245	Hoch	3,96E-13	7,47E-11
Rgs1	1,664874587	Hoch	1,88E-14	4,08E-12
Fgl2	1,651506881	Hoch	9,46E-08	7,89E-06
Ccl3	1,638640657	Hoch	1,05E-25	6,29E-23
ApoE	1,638314179	Hoch	5,34E-06	2,81E-04
Ier5l	1,630894753	Hoch	1,51E-05	7,04E-04
Asb2	1,625955488	Hoch	1,27E-05	6,06E-04
Nr4a2	1,612331296	Hoch	1,24E-20	4,69E-18
Pvrig	1,584580997	Hoch	3,23E-05	1,34E-03
Glmn	1,581556339	Hoch	1,29E-05	6,11E-04
Sh2d2a	1,562420569	Hoch	4,88E-34	6,21E-31
Dapk2	1,559134979	Hoch	7,35E-07	4,77E-05
Ica1	1,540333391	Hoch	3,35E-05	1,37E-03
Actn2	1,533221213	Hoch	9,35E-06	4,57E-04
Litaf	1,494306692	Hoch	4,96E-11	6,82E-09

## 7. Anhang

Glrx	1,487198505	Hoch	3,24E-10	3,97E-08
Neb	1,486047378	Hoch	7,65E-05	2,75E-03
Hip1	1,482690224	Hoch	9,96E-06	4,83E-04
Gzmb	1,472591549	Hoch	7,76E-27	5,27E-24
Cd7	1,44406749	Hoch	3,83E-23	2,05E-20
Cd38	1,4320123	Hoch	6,06E-08	5,14E-06
Maf	1,370848521	Hoch	2,93E-08	2,57E-06
Gzma	1,3705854	Hoch	6,37E-05	2,34E-03
Sytl2	1,343753463	Hoch	3,54E-06	1,97E-04
Wbp1	1,323353764	Hoch	1,20E-06	7,38E-05
Itih5	1,305874288	Hoch	6,26E-04	1,66E-02
Gm14029	1,304932448	Hoch	3,23E-05	1,34E-03
Soat2	1,301452829	Hoch	6,59E-04	1,73E-02
Lax1	1,289881958	Hoch	1,47E-11	2,23E-09
Tigit	1,289128398	Hoch	2,24E-07	1,72E-05
Tnfsf13b	1,284365821	Hoch	7,56E-04	1,92E-02
Chst2	1,282680633	Hoch	7,79E-04	1,96E-02
Abi3	1,278168048	Hoch	2,51E-07	1,88E-05
Gm33782	1,277217036	Hoch	1,08E-04	3,65E-03
Efhd2	1,274849596	Hoch	3,55E-12	6,02E-10
Tox2	1,274208442	Hoch	6,60E-04	1,73E-02
Gm26614	1,273504953	Hoch	8,62E-04	2,13E-02
Setbp1	1,272756304	Hoch	5,90E-04	1,58E-02
Trgv2	1,2658456	Hoch	5,88E-04	1,57E-02
Ctla4	1,261072109	Hoch	2,02E-05	8,97E-04
Nap1l3	1,246937941	Hoch	1,08E-03	2,56E-02
Aplp1	1,24330592	Hoch	7,86E-04	1,97E-02
Cish	1,239496808	Hoch	6,48E-07	4,25E-05
Gabarapl1	1,235228624	Hoch	3,91E-04	1,12E-02
Lag3	1,229298428	Hoch	2,14E-04	6,57E-03
Rgs3	1,226685409	Hoch	9,50E-06	4,63E-04
Cipc	1,221837661	Hoch	2,27E-05	9,96E-04
Ptger4	1,207561893	Hoch	6,36E-06	3,29E-04
Dusp2	1,201720194	Hoch	9,21E-05	3,17E-03
Eif4e3	1,1991565	Hoch	2,40E-04	7,21E-03
Clspn	1,175177023	Hoch	1,78E-03	3,97E-02
Il10	1,172247335	Hoch	1,89E-03	4,16E-02
Gm36723	1,170051129	Hoch	1,86E-03	4,12E-02
Coch	1,16204983	Hoch	1,08E-03	2,56E-02
Padi2	1,151939174	Hoch	7,13E-06	3,63E-04
Zbtb38	1,143866034	Hoch	8,07E-05	2,85E-03
Serpina3g	1,142123275	Hoch	4,32E-13	7,99E-11
Gm4956	1,130490542	Hoch	1,90E-03	4,16E-02
Gm47586	1,126665473	Hoch	1,97E-03	4,24E-02
Hist1h1b	1,124465033	Hoch	1,58E-03	3,60E-02
Gzmk	1,115524918	Hoch	1,54E-20	5,59E-18
Hist1h1d	1,115083317	Hoch	2,33E-03	4,88E-02
Arhgap10	1,111670605	Hoch	3,87E-04	1,11E-02
Dtx1	1,104161531	Hoch	7,72E-04	1,95E-02
Gpr65	1,09613044	Hoch	9,06E-06	4,50E-04
Chst12	1,094413276	Hoch	1,87E-05	8,44E-04
Gm5881	1,087287176	Hoch	5,68E-04	1,53E-02
Hist1h1c	1,082472996	Hoch	2,58E-07	1,92E-05

## 7. Anhang

Tox	1,080689632	Hoch	7,19E-10	8,31E-08
Nedd9	1,06824217	Hoch	3,17E-05	1,32E-03
Litr4b	1,067515842	Hoch	3,49E-05	1,41E-03
Plk3	1,067217078	Hoch	4,76E-04	1,32E-02
Slc16a6	1,037646064	Hoch	1,94E-03	4,21E-02
Agfg1	1,036307129	Hoch	3,84E-04	1,11E-02
Bhlhe40	1,034332288	Hoch	2,47E-17	6,61E-15
Rab19	1,034298473	Hoch	4,11E-05	1,62E-03
AW112010	1,024192781	Hoch	1,21E-21	5,34E-19
Ttn	1,00859161	Hoch	2,24E-04	6,84E-03
Isg20	1,007575527	Hoch	1,99E-03	4,26E-02
Syt11	0,987382923	Hoch	2,37E-04	7,15E-03
Id2	0,983549387	Hoch	2,71E-06	1,56E-04
Cd3g	0,962781863	Hoch	2,24E-27	1,63E-24
Dusp6	0,950576913	Hoch	1,99E-03	4,26E-02
Fyn	0,946641684	Hoch	5,64E-10	6,67E-08
Nmb	0,945762052	Hoch	9,11E-04	2,23E-02
Inpp5b	0,943156718	Hoch	1,21E-04	4,04E-03
Ikzf3	0,929361838	Hoch	6,00E-06	3,12E-04
Cers4	0,926082509	Hoch	1,05E-03	2,53E-02
Prdm1	0,920064611	Hoch	7,73E-04	1,95E-02
Ccl5	0,906505013	Hoch	8,01E-34	9,06E-31
Isg15	0,899797457	Hoch	4,47E-04	1,26E-02
Hilpda	0,893599997	Hoch	4,62E-04	1,29E-02
Stard3nl	0,886284785	Hoch	3,76E-04	1,09E-02
Aplp2	0,872437676	Hoch	9,23E-04	2,25E-02
Ifng	0,870817743	Hoch	3,17E-05	1,32E-03
Lasp1	0,86663112	Hoch	3,81E-05	1,52E-03
Ccdc82	0,862330047	Hoch	2,70E-04	8,09E-03
Gbp9	0,861963893	Hoch	2,25E-03	4,72E-02
Slc3a2	0,86027326	Hoch	4,57E-11	6,37E-09
Mphosph6	0,849753071	Hoch	1,25E-03	2,92E-02
Nkg7	0,849742928	Hoch	1,61E-34	2,34E-31
Baiap3	0,849666833	Hoch	8,06E-06	4,04E-04
Cyb5r3	0,845758836	Hoch	1,07E-04	3,65E-03
Fbxl12	0,822271209	Hoch	2,09E-03	4,44E-02
Rgs16	0,820376743	Hoch	1,67E-04	5,36E-03
Kif13b	0,820368014	Hoch	1,43E-03	3,30E-02
Cd82	0,806352268	Hoch	1,06E-07	8,55E-06
Tnfrsf1b	0,805895944	Hoch	5,15E-04	1,41E-02
Bcl2a1b	0,798572967	Hoch	6,40E-05	2,34E-03
Reps1	0,797292131	Hoch	6,57E-05	2,39E-03
Runx3	0,795399604	Hoch	9,63E-05	3,30E-03
Cd3e	0,794933892	Hoch	1,15E-20	4,51E-18
Ccl4	0,771615965	Hoch	3,12E-09	3,31E-07
Gimap1os	0,767754266	Hoch	1,13E-03	2,67E-02
Dok2	0,767121219	Hoch	8,80E-05	3,06E-03
Hist1h1e	0,760640223	Hoch	1,50E-03	3,44E-02
Gimap7	0,760616611	Hoch	5,76E-09	5,75E-07
Arhgap9	0,754143254	Hoch	7,48E-06	3,79E-04
Ucp2	0,747544149	Hoch	5,33E-05	2,01E-03
Ptbp3	0,742843823	Hoch	8,91E-04	2,18E-02
Adam19	0,735011376	Hoch	3,30E-04	9,71E-03

## 7. Anhang

Cetn2	0,727924496	Hoch	5,45E-04	1,49E-02
Il10ra	0,724475306	Hoch	2,26E-04	6,88E-03
Gng2	0,722559666	Hoch	5,82E-04	1,56E-02
Atp6v0a2	0,718935248	Hoch	1,93E-03	4,21E-02
Batf	0,718270926	Hoch	7,08E-05	2,55E-03
Serpinb6b	0,71325337	Hoch	1,16E-03	2,72E-02
S100a6	0,708729822	Hoch	4,64E-15	1,10E-12
Akna	0,707391748	Hoch	7,93E-05	2,81E-03
Cd8a	0,702370982	Hoch	7,44E-13	1,35E-10
Cst7	0,696527944	Hoch	9,25E-08	7,78E-06
Prf1	0,691321951	Hoch	3,35E-05	1,37E-03
Ccr5	0,681344557	Hoch	8,16E-04	2,03E-02
Dusp1	0,677839114	Hoch	3,00E-06	1,70E-04
S100a4	0,666511949	Hoch	1,73E-03	3,86E-02
Rnf166	0,665396385	Hoch	4,30E-04	1,21E-02
Rpl29	-0,661850577	Runter	2,00E-07	1,55E-05
Rpl35	-0,66570062	Runter	2,59E-08	2,36E-06
Glipr2	-0,673151055	Runter	5,34E-05	2,01E-03
Rps18	-0,673611227	Runter	3,69E-14	7,67E-12
Tmsb10	-0,67619978	Runter	2,14E-17	5,88E-15
Hsd11b1	-0,681304925	Runter	1,98E-04	6,15E-03
Itgb1	-0,685089767	Runter	3,86E-04	1,11E-02
Gm3511	-0,688042523	Runter	5,57E-05	2,09E-03
Il17ra	-0,692602822	Runter	8,16E-04	2,03E-02
Cnp	-0,706746657	Runter	5,22E-05	1,99E-03
Serp1	-0,708426279	Runter	1,93E-04	6,08E-03
Gm10443	-0,709290259	Runter	1,00E-06	6,30E-05
Ly6e	-0,718061756	Runter	8,41E-15	1,90E-12
Rps19-ps6	-0,718611811	Runter	2,33E-08	2,16E-06
Epsti1	-0,721917782	Runter	3,38E-06	1,90E-04
AC154667.2	-0,726644438	Runter	5,15E-05	1,97E-03
Acp5	-0,734427148	Runter	5,06E-05	1,95E-03
Rps19	-0,742422953	Runter	1,67E-14	3,70E-12
Slfn1	-0,745298916	Runter	1,71E-03	3,85E-02
C1qbp	-0,747054004	Runter	4,79E-04	1,33E-02
Jun	-0,797965121	Runter	5,78E-06	3,02E-04
Ahnak	-0,798969542	Runter	1,35E-09	1,47E-07
Myc	-0,803931578	Runter	1,11E-03	2,63E-02
Evi2a	-0,80535076	Runter	1,10E-03	2,62E-02
Zfp36	-0,806904212	Runter	3,82E-07	2,68E-05
Macf1	-0,809440598	Runter	1,70E-07	1,34E-05
Nptn	-0,825306329	Runter	1,40E-03	3,24E-02
Ctss	-0,835098434	Runter	9,06E-06	4,50E-04
Ifngr1	-0,842963072	Runter	1,02E-11	1,63E-09
S1pr4	-0,850257339	Runter	4,96E-07	3,39E-05
Rnf138	-0,854326413	Runter	2,11E-06	1,24E-04
Selenop	-0,857728829	Runter	1,91E-03	4,18E-02
Ikbke	-0,859750953	Runter	1,82E-03	4,04E-02
Rasa3	-0,860464306	Runter	1,82E-05	8,21E-04
Vim	-0,860916805	Runter	5,39E-09	5,50E-07
Itgb7	-0,875339661	Runter	3,79E-06	2,08E-04
Zfp3611	-0,88239035	Runter	5,14E-07	3,49E-05
AI506816	-0,889094203	Runter	4,74E-04	1,32E-02

## 7. Anhang

Smc4	-0,892329586	Runter	4,23E-06	2,29E-04
Pik3r5	-0,892816585	Runter	9,37E-04	2,28E-02
Syngn2	-0,899967659	Runter	1,95E-05	8,70E-04
Stx7	-0,908151127	Runter	2,25E-03	4,72E-02
Fcgrt	-0,909356171	Runter	1,97E-03	4,24E-02
Gm7730	-0,917830352	Runter	5,54E-04	1,50E-02
Stk38	-0,923862128	Runter	2,02E-04	6,26E-03
Bzw2	-0,927303371	Runter	1,63E-06	9,79E-05
Nfkbia	-0,927990193	Runter	6,09E-10	7,13E-08
Gm5812	-0,940526151	Runter	8,89E-04	2,18E-02
Atp1b3	-0,950829096	Runter	1,19E-11	1,87E-09
Rexo2	-0,951660472	Runter	4,92E-06	2,62E-04
Atp2b1	-0,952807239	Runter	5,71E-06	3,00E-04
Kcnn4	-0,955242743	Runter	2,30E-05	1,00E-03
Gm10076	-0,965894284	Runter	1,04E-07	8,49E-06
Crlf3	-0,966414737	Runter	1,43E-05	6,72E-04
Klrg1	-0,968333165	Runter	2,26E-03	4,73E-02
Unc93b1	-0,968422137	Runter	6,87E-04	1,78E-02
Rcsd1	-0,974422906	Runter	1,08E-04	3,65E-03
Tnfaip8l2	-0,985865767	Runter	6,33E-04	1,67E-02
Dgka	-0,986094583	Runter	3,67E-08	3,17E-06
Gm2682	-0,992527758	Runter	2,41E-05	1,05E-03
Golm1	-1,001593548	Runter	2,76E-04	8,21E-03
Arl5c	-1,005212067	Runter	6,86E-04	1,78E-02
Impdh2-ps	-1,007583929	Runter	1,75E-05	8,00E-04
Txndc5	-1,010588363	Runter	2,63E-04	7,91E-03
Foxp1	-1,029984847	Runter	1,65E-05	7,57E-04
Pim1	-1,038892977	Runter	2,09E-05	9,21E-04
Atp11b	-1,048821499	Runter	4,07E-06	2,22E-04
Klf3	-1,050756698	Runter	1,52E-05	7,06E-04
Gm2a	-1,061094749	Runter	3,72E-05	1,49E-03
Klrc1	-1,063290116	Runter	9,15E-05	3,16E-03
Gramd3	-1,067537803	Runter	2,08E-10	2,68E-08
Ssh2	-1,072883486	Runter	7,21E-04	1,85E-02
Xcl1	-1,084014612	Runter	1,02E-06	6,36E-05
Slc11a2	-1,088770043	Runter	1,89E-03	4,16E-02
H2-DMA	-1,093001433	Runter	8,87E-05	3,07E-03
Fos	-1,111225252	Runter	1,94E-10	2,53E-08
Mpnd	-1,113048042	Runter	1,32E-03	3,08E-02
P2ry14	-1,127985659	Runter	2,10E-03	4,46E-02
Apex1	-1,138428871	Runter	5,57E-04	1,51E-02
Scimp	-1,14524377	Runter	2,37E-03	4,93E-02
Klf2	-1,145407778	Runter	3,99E-22	1,84E-19
Clybl	-1,148563582	Runter	2,02E-03	4,31E-02
Gpx1	-1,151176646	Runter	1,24E-13	2,39E-11
Kbtbd11	-1,15998881	Runter	9,26E-06	4,55E-04
Fam241a	-1,16006547	Runter	2,17E-03	4,58E-02
Nek1	-1,160616825	Runter	2,38E-03	4,95E-02
Psap	-1,160723293	Runter	2,49E-14	5,28E-12
Aaed1	-1,162583858	Runter	3,66E-04	1,07E-02
Ass1	-1,183188576	Runter	1,58E-03	3,60E-02
Klf7	-1,190402603	Runter	1,77E-03	3,94E-02
Irf2bp2	-1,198628465	Runter	1,71E-03	3,85E-02

## 7. Anhang

Gramd4	-1,20115656	Runter	1,20E-03	2,80E-02
Cd209a	-1,203994332	Runter	1,16E-03	2,72E-02
Cd209d	-1,204291119	Runter	1,63E-03	3,69E-02
Icam2	-1,219271264	Runter	2,99E-05	1,26E-03
St6gal1	-1,223312574	Runter	1,35E-03	3,14E-02
Flt3	-1,239305552	Runter	8,88E-04	2,18E-02
Rgcc	-1,24063869	Runter	2,74E-05	1,18E-03
Ctsz	-1,247560983	Runter	6,20E-07	4,13E-05
Dnajc15	-1,247707398	Runter	8,41E-15	1,90E-12
Il18r1	-1,251060786	Runter	4,60E-05	1,79E-03
Slc17a9	-1,252231812	Runter	7,81E-04	1,96E-02
Trem12	-1,265361979	Runter	4,68E-04	1,31E-02
Tifa	-1,271108181	Runter	6,63E-04	1,73E-02
Slamf6	-1,288936266	Runter	1,26E-05	6,03E-04
1700025G04Rik	-1,293092427	Runter	7,21E-04	1,85E-02
Sh3bgr	-1,293841103	Runter	5,48E-04	1,50E-02
Klhdc2	-1,3015536	Runter	6,53E-04	1,72E-02
Klra7	-1,302896852	Runter	1,51E-04	4,90E-03
Tagln2	-1,306523523	Runter	1,49E-22	7,23E-20
Gzmm	-1,314440784	Runter	1,43E-05	6,72E-04
Sidt1	-1,327080916	Runter	2,66E-07	1,96E-05
Paqr5	-1,336719163	Runter	3,75E-04	1,09E-02
Adgrg5	-1,337606653	Runter	5,08E-05	1,95E-03
Tmem108	-1,339194473	Runter	4,61E-04	1,29E-02
Pkig	-1,341434059	Runter	4,05E-04	1,16E-02
Gpr183	-1,3492325	Runter	7,57E-14	1,54E-11
Sh3bp5	-1,365020554	Runter	8,13E-05	2,86E-03
S1pr5	-1,374416662	Runter	2,12E-04	6,55E-03
Gadd45g	-1,378452254	Runter	2,07E-05	9,17E-04
Ccnd1	-1,382246858	Runter	2,80E-04	8,29E-03
Napsa	-1,383727559	Runter	1,39E-04	4,58E-03
Slamf9	-1,384463303	Runter	2,79E-04	8,29E-03
H2-Eb1	-1,391804369	Runter	1,23E-06	7,47E-05
Fes	-1,395489466	Runter	2,19E-04	6,73E-03
Pltp	-1,395692168	Runter	8,17E-05	2,87E-03
Bst2	-1,400575391	Runter	4,59E-12	7,66E-10
Klra17	-1,402979083	Runter	2,30E-04	6,98E-03
H2-Aa	-1,406713418	Runter	2,83E-11	4,06E-09
Scpep1	-1,409059831	Runter	1,32E-04	4,36E-03
Fcrla	-1,426929074	Runter	1,82E-04	5,76E-03
Rnd3	-1,432400068	Runter	1,49E-04	4,85E-03
Hmgn3	-1,445950054	Runter	1,54E-04	4,99E-03
Atp2a1	-1,449399635	Runter	1,42E-04	4,64E-03
Map3k8	-1,45349856	Runter	2,92E-05	1,24E-03
Tbc1d8	-1,467974212	Runter	1,05E-04	3,60E-03
Gab3	-1,495876599	Runter	1,08E-05	5,17E-04
Ms4a4c	-1,499455763	Runter	3,99E-10	4,84E-08
Bcl11a	-1,504947934	Runter	7,89E-05	2,81E-03
Pik3ip1	-1,506122692	Runter	2,40E-07	1,81E-05
Plbd1	-1,507184141	Runter	7,90E-05	2,81E-03
Pcsk4	-1,519972645	Runter	6,74E-05	2,44E-03
Rgs10	-1,520983687	Runter	1,91E-08	1,85E-06
Blnk	-1,531760202	Runter	6,12E-05	2,28E-03



## 7. Anhang

Eepd1	-1,558945724	Runter	4,50E-05	1,76E-03
Clec12a	-1,561039199	Runter	4,47E-05	1,75E-03
Klra13-ps	-1,568652699	Runter	2,25E-07	1,73E-05
Cd300c	-1,571973322	Runter	3,61E-05	1,45E-03
Lyn	-1,582537977	Runter	3,49E-05	1,41E-03
Pdlim1	-1,585666258	Runter	2,34E-08	2,16E-06
Lair1	-1,591764963	Runter	6,82E-06	3,49E-04
Satb1	-1,608634285	Runter	1,13E-06	7,01E-05
Klhl6	-1,624633663	Runter	1,24E-10	1,68E-08
Upb1	-1,648575617	Runter	1,62E-05	7,45E-04
Cybb	-1,667890947	Runter	1,07E-05	5,17E-04
Ighm	-1,669911904	Runter	1,54E-18	4,74E-16
H2-DMb1	-1,688074864	Runter	6,59E-06	3,39E-04
Id3	-1,69183756	Runter	3,06E-07	2,23E-05
Aff3	-1,692275295	Runter	9,13E-06	4,51E-04
Kmo	-1,746139652	Runter	4,95E-06	2,62E-04
Nt5e	-1,752973703	Runter	4,51E-06	2,43E-04
AC140186.1	-1,759210049	Runter	3,16E-06	1,79E-04
Lef1	-1,759721835	Runter	3,17E-12	5,46E-10
Nucb2	-1,767439234	Runter	2,79E-06	1,60E-04
Ncf1	-1,798660035	Runter	2,53E-06	1,47E-04
Ly6c2	-1,803297838	Runter	1,04E-59	1,06E-55
Tcf4	-1,805678203	Runter	1,18E-06	7,31E-05
Irf8	-1,809627716	Runter	6,48E-19	2,06E-16
Bmyc	-1,819900986	Runter	2,37E-07	1,80E-05
Emb	-1,838469876	Runter	4,85E-16	1,20E-13
Fcer1g	-1,83974773	Runter	3,09E-10	3,83E-08
Cmah	-1,866864561	Runter	4,62E-09	4,84E-07
Ppfa4	-1,948010608	Runter	3,50E-07	2,49E-05
Ly86	-1,958575151	Runter	1,99E-07	1,55E-05
H2-Ab1	-1,968010871	Runter	7,89E-26	5,02E-23
Plaur	-1,969049412	Runter	1,17E-07	9,41E-06
S1pr1	-1,985641662	Runter	3,61E-21	1,53E-18
Grn	-1,991321427	Runter	1,69E-16	4,30E-14
Ramp1	-2,003645855	Runter	1,42E-07	1,13E-05
Tsc22d1	-2,090118478	Runter	1,01E-09	1,12E-07
Smim5	-2,106802248	Runter	3,39E-08	2,95E-06
Spib	-2,121410849	Runter	2,72E-08	2,43E-06
Tdrp	-2,125262947	Runter	1,98E-08	1,90E-06
Cd74	-2,133636064	Runter	3,51E-38	7,15E-35
Tcf7	-2,160137253	Runter	1,15E-22	5,86E-20
Il6ra	-2,271341709	Runter	1,11E-12	1,98E-10
Nsg2	-2,292983498	Runter	1,87E-12	3,29E-10
IL-7r	-2,306488875	Runter	1,36E-23	7,71E-21
Atp1b1	-2,33645647	Runter	4,63E-10	5,55E-08
Alox5ap	-2,427969493	Runter	1,86E-11	2,74E-09
Ccr9	-2,429395213	Runter	1,43E-10	1,89E-08
Mpeg1	-2,503730825	Runter	1,83E-11	2,73E-09
Ctsl	-2,54522743	Runter	1,07E-16	2,80E-14
Rnase6	-2,632901729	Runter	1,22E-13	2,39E-11
Ccr7	-2,734011652	Runter	3,13E-35	5,31E-32
Klk1	-2,742016581	Runter	1,05E-13	2,10E-11
Iglc3	-2,74356864	Runter	1,88E-15	4,55E-13

## 7. Anhang

Dapl1	-2,767024896	Runter	1,03E-20	4,21E-18
Sell	-2,797607451	Runter	9,67E-48	3,28E-44
Plac8	-3,056423304	Runter	3,17E-31	3,23E-28
Pld4	-3,060713442	Runter	4,33E-19	1,42E-16
Cox6a2	-3,142431025	Runter	1,12E-19	3,80E-17
Ctsh	-3,246244108	Runter	8,89E-20	3,12E-17
Ly6d	-3,512583182	Runter	1,92E-29	1,62E-26
Tyrobp	-3,680207274	Runter	2,51E-42	6,40E-39
Siglech	-3,720123336	Runter	4,99E-28	3,91E-25

**Tab. 3:** Vorgeschaltete TFs in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen im Vergleich zu CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen aus ND-Mäusen

TF	Statistik	pvalue	zscore	max_auc	re_rank	irwin_hall_pvalue
PAX5	6,492	4,23E-11	3,402	0,935	0,006	7,87E-07
TCF3	4,281	9,31E-06	3,022	0,925	0,019	2,92E-05
SATB1	3,826	6,52E-05	3,134	0,911	0,024	5,93E-05
ETS1	5,501	1,89E-08	2,436	0,926	0,025	7,44E-05
IKZF1	5,978	1,13E-09	3,343	0,89	0,026	8,00E-05
IRF4	7,98	7,33E-16	2,495	0,896	0,033	1,61E-04
RAG2	5,298	5,86E-08	2,12	0,916	0,038	2,45E-04
FOXP3	3,802	7,17E-05	2,319	0,912	0,039	2,70E-04
PAXIP1	2,389	8,45E-03	2,925	0,908	0,047	4,56E-04
EBF1	3,774	8,03E-05	3,763	0,869	0,048	4,93E-04
SPI1	10,067	3,86E-24	1,794	0,899	0,048	4,93E-04
RAG1	5	2,87E-07	1,266	0,917	0,06	9,86E-04
TCF7	2,637	4,18E-03	2,923	0,882	0,06	9,86E-04
ELF1	2,753	2,95E-03	1,728	0,919	0,063	1,11E-03
SPIB	2,237	1,27E-02	2,534	0,897	0,063	1,15E-03
FLI1	4,426	4,81E-06	1,357	0,9	0,065	1,22E-03
STAT3	5,456	2,44E-08	2,043	0,866	0,069	1,48E-03
CBFB	2,478	6,61E-03	2,256	0,889	0,07	1,56E-03
FOXO1	2,809	2,48E-03	1,994	0,89	0,07	1,56E-03
RUNX3	3,261	5,56E-04	2,154	0,871	0,072	1,69E-03
IRF8	5,154	1,28E-07	1,849	0,868	0,074	1,82E-03
BATF	3,787	7,61E-05	1,997	0,861	0,079	2,21E-03
TCF7L1	1,664	4,81E-02	2,954	0,885	0,085	2,72E-03
BHLHE41	2,298	1,08E-02	1,792	0,89	0,088	3,09E-03
ZMIZ1	2,126	1,68E-02	3,086	0,853	0,089	3,16E-03
AURKB	1,688	4,57E-02	1,951	0,907	0,091	3,36E-03
RUNX1	3,225	6,30E-04	1,318	0,881	0,091	3,36E-03
STAT6	3,726	9,75E-05	1,462	0,869	0,091	3,36E-03
STAT1	6,699	1,05E-11	1,137	0,865	0,093	3,65E-03
BCL11B	2,074	1,91E-02	3,101	0,848	0,096	3,95E-03
ELF4	2,733	3,14E-03	1,196	0,888	0,097	4,10E-03
AICDA	2,088	1,84E-02	2,415	0,855	0,101	4,59E-03
BACH2	2,563	5,19E-03	2,472	0,842	0,101	4,68E-03
IRF1	3,991	3,28E-05	1,623	0,844	0,104	5,12E-03
GATA3	2,777	2,74E-03	2,436	0,836	0,107	5,50E-03
POLR3A	1,567	5,85E-02	2,229	0,871	0,112	6,41E-03
REPIN1	1,508	6,58E-02	2,885	0,854	0,114	6,73E-03
GABPA	2,872	2,04E-03	0,66	0,892	0,116	6,95E-03

## 7. Anhang

CAVIN3	2,311	1,04E-02	0,777	0,89	0,124	8,64E-03
IFNG	1,819	3,45E-02	1,1	0,883	0,127	9,31E-03
HES1	3,511	2,23E-04	0,449	0,873	0,129	9,58E-03

**Tab. 4:** Vorgeschaltete TFs in CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CXCR6<sup>-</sup> T-Zellen aus CD-HFD Mäusen

TF	statistic	pvalue	zscore	max auc	re rank	Irwin hall pvalue
SATB1	4,134	1,78E-05	3,478	0,935	0,017	2,37E-05
GATA3	4,568	2,46E-06	3,567	0,918	0,021	4,25E-05
STAT3	6,238	2,22E-10	2,559	0,937	0,021	4,25E-05
FOXP3	4,182	1,44E-05	2,702	0,941	0,023	5,47E-05
BATF	6,281	1,68E-10	3,01	0,899	0,027	9,20E-05
IRF4	9,638	2,76E-22	3,03	0,89	0,028	9,84E-05
ETS1	5,342	4,61E-08	2,267	0,945	0,029	1,05E-04
RUNX3	3,628	1,43E-04	2,465	0,927	0,035	1,90E-04
CBFB	2,74	3,08E-03	2,784	0,944	0,037	2,33E-04
FLI1	4,895	4,92E-07	1,795	0,945	0,044	3,87E-04
RUNX1	4,109	1,99E-05	2,069	0,927	0,044	3,87E-04
FOXO1	2,926	1,72E-03	2,269	0,919	0,052	6,18E-04
RAG1	4,982	3,14E-07	1,236	0,927	0,063	1,15E-03
TBX21	2,145	1,60E-02	3,989	0,877	0,064	1,18E-03
BRD4	6,151	3,86E-10	0,908	0,954	0,065	1,25E-03
IKZF1	4,556	2,61E-06	1,962	0,881	0,067	1,36E-03
RAG2	4,946	3,78E-07	1,589	0,895	0,068	1,40E-03
STAT4	2,051	2,02E-02	3,906	0,877	0,068	1,44E-03
TCF7	2,634	4,22E-03	2,916	0,87	0,069	1,48E-03
BACH2	2,756	2,93E-03	2,875	0,867	0,07	1,52E-03
PARP14	3,284	5,11E-04	1,764	0,9	0,073	1,73E-03
ELF1	2,577	4,99E-03	1,435	0,936	0,078	2,11E-03
STAT6	3,171	7,61E-04	1,19	0,898	0,091	3,36E-03
BCL11B	2,035	2,09E-02	3,012	0,849	0,095	3,87E-03
BRD2	3,535	2,04E-04	0,77	0,905	0,096	3,95E-03
STAT1	6,33	1,23E-10	1,02	0,865	0,096	4,02E-03
POU2F1	1,572	5,80E-02	3,161	0,868	0,099	4,42E-03
JUND	1,554	6,01E-02	2,129	0,896	0,104	5,03E-03
IRF1	3,864	5,58E-05	1,575	0,842	0,11	5,99E-03
POLR3A	1,587	5,63E-02	2,323	0,872	0,111	6,09E-03
RORC	1,885	2,97E-02	2,921	0,84	0,112	6,30E-03
TP53	3,613	1,52E-04	0,431	0,888	0,121	8,01E-03
EP300	1,441	7,47E-02	1,522	0,916	0,122	8,26E-03
GABPA	2,84	2,26E-03	0,531	0,89	0,124	8,51E-03
LEF1	2,402	8,15E-03	0,391	0,916	0,127	9,17E-03
CAVIN3	2,28	1,13E-02	0,664	0,888	0,128	9,44E-03
SPI1	4,644	1,71E-06	0,904	0,84	0,128	9,44E-03
E2F4	3,26	5,57E-04	0,452	0,879	0,129	9,58E-03
TCF3	2,661	3,90E-03	1,578	0,834	0,13	9,86E-03

7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1: Entstehung des Leberschadens durch autoaggressive CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei NASH.</b> .....	8
<b>Abb. 2: Überblick über die immuntoleranten Mechanismen in der Leber.</b> .....	11
<b>Abb. 3: Transkriptionelle Regulation der T<sub>rm</sub> Differenzierung.</b> .....	14
<b>Abb. 4: Metabolische Regulation von Zytokinen in Effektor T-Zellen.</b> .....	21
<b>Abb. 5: Kommunikation zwischen Immunzellen und Lebergewebe in NASH.</b> .....	24
<b>Abb. 6: Immunphänotypische Charakterisierung von Lymphozyten in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen.</b> .....	66
<b>Abb. 7: Immunphänotypische Charakterisierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen.</b> .....	68
<b>Abb. 8: Bioinformatische Analyse der RNA-Sequenzierung von sortierten CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Milz und Leber von ND und CD-HFD Mäusen.</b> .....	71
<b>Abb. 9: Immunphänotypische Charakterisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ND und CD-HFD Mäusen.</b> .....	73
<b>Abb. 10: Bioinformatischen Analyse des Netzwerks von Transkriptionsfaktoren in sortierten CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CXCR6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber von CD-HFD Mäusen.</b> .....	76
<b>Abb. 11: Regulation von CXCR6 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen über Foxo1 Aktivität.</b> .....	78
<b>Abb. 12: Regulation von Foxo1 in CD44<sup>+</sup> T-Zellen durch IL-15R<math>\alpha</math>/IL-15 und IL-21.</b> .....	80
<b>Abb. 13: Expression der Rezeptoren von IL-15 und IL-21 auf CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber.</b> .....	81
<b>Abb. 14: Anti-CD122 Therapie in CD-HFD Mäusen blockiert die Ausbildung der pathologischen CXCR6<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen.</b> .....	83
<b>Abb. 15: Die kurzkettige Fettsäure Acetate erhöht die GzmB Expression von CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber.</b> .....	85
<b>Abb. 16: Mechanismus der Erhöhung von Effektormolekülen durch Acetat in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen.</b> .....	88
<b>Abb. 17: Nach Inkubation mit Acetat eliminieren CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen Zielzellen antigen-unabhängig.</b> .....	92
<b>Abb. 18: Antigen-unabhängiges Eliminieren von Hepatozyten durch CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist abhängig von TNF und LFA-1.</b> .....	95
<b>Abb. 19: Einstrom von extrazellulärem Calcium in CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist kritisch für antigen-unabhängiges Eliminieren von Hepatozyten.</b> .....	99
<b>Abb. 20: CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen eliminieren Hepatozyten über Fas-FasL.</b> .....	101

## 7. Anhang

### 7.3 Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Begriff</b>
2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxyglucose
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
Akt	Proteinkinase B
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosin-monophosphat
APC	antigen-presenting cells
ASH	alcoholic steatohepatitis
ATP	Adenosintriphosphat
BART	Binding analysis for regulation of transcription
BATF	Basic Leucine Zipper ATF-Like
Blimp1	PR domain zinc finger protein 1
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD	Cluster of differentiation
CD-HFD	choline-deficient high fat diet
CD62L	L-selectin
cDNA	complementary DNA
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CRAC	Calcium release-activated channel
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CX3CR1	fractalkine receptor
CXCL16	CXC-Motiv-Chemokin 16
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
CXCR6	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 6
DAMP	damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	dendritic cell
DEG	Differentially expressed gene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
ECAR	Extracellular acidification rate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EGFR2	Epidermal growth factor receptor 2
EOMES	Eomesodermin
ERK	Extracellular regulated kinase 1

## 7. Anhang

FABP4	Fatty acid binding protein 4
FABP5	Fatty acid binding protein 5
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FasL	Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 6
FCS	Fetal calf serum
FDR	False discovery rate
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FOXO1	Forkhead box protein O1
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBSS	Gey's balanced salt solution
GFP	Green fluorescent protein
GzmB	Granzyme B
GSEA	Gene set enrichment analysis
HBSS	Hank's balanced salt solution
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC	Histon-Deacetylasen
HMGB1	High mobility group box 1
Hobit	Homolog of Blimp-1 In T-Cell
HRP	Horse radish peroxidase
HSP60	Heat shock protein 60
ICAM	Intercellular adhesion molecule 1
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgA	Immunglobulin A
IL-10	Interleukin 10
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
JNK	Janus-Kinase
KC	Kupffer cell
KLF2	Krüppel-like factor 2
LAG-3	Lymphocyte-activation protein 3
LAT	Linker for activation of T cells
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LDHA	Laktatdehydrogenase
LFA-1	Leucocyte function associated molecule-1
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cell
MACS	Magnetic activating cell sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBq	Megabecquerel
mCi	Millicurie
MDSC	Myeloid derived suppressor cell

## 7. Anhang

MHC I	Major histocompatibility class I
mRNA	messenger RNA
MSigDB	Molecular signature data base
mTOR	mammalian target of TOR complex
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver diseases
NAS	NAFLD activity score
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NES	Normalized enrichment score
ND	Normal diet
NFAT	Nuclear factor of activated T-cell
NFkB	Nuclear factor kappa beta
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T like
Nr4a1	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
OCR	Oxygen consumption rate
OVA	Ovalbumin
P2XR7	P2X-Purinozeptor 7
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat buffered saline
PCA	Principal component analysis
PD-1	Proammed death protein 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PlatE	Platinum E
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRR	Pattern-Recognition Receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
Runx3	Runt-related transcription factor 3
S1PR1	Sphingosin receptor 1
SCFA	Short chain fatty acids
SHP2	Src homology region 2
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
T-bet	T-box transcription factor
Tcf7	Transcription factor 7
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TIGIT	T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains
Th17	T helper cells 17
TLR4	Toll-like receptor 4

## 7. Anhang

TLR9	Toll-like receptor 9
TOX	Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TSO	template-switch Oligonukleotide
UMI	Unique molecular identifier
UTR	untranslated region
Zap70	Zeta-chain-associated protein kinase 70



## 7. Anhang

### 7.4 Vorveröffentlichungen

Dudek M., Knolle P.A. "Foxo1-activity controls CD8 T cell effector function and prevents liver immune pathology during viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis."

Poster auf der *European Congress of Immunology (ECI)*, 2018, Amsterdam, Niederlande.

Dudek, M., Pfister, D., Kallin, N., Donakonda, S., Wohlleber, D., Heikenwälder, M., Knolle, P.A. "Foxo1-activity controls effector function of CXCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and prevents liver immune pathology during viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis."

Poster auf der Jahrestagung der *German Association of the Study of the Liver (GASL)*, 2019, Heidelberg, Deutschland

Dudek, M., Pfister, D., Donakonda, S., Öllinger R., Rad Roland., Heikenwälder, M., Knolle, P.A. „Autoaggression of Foxo1<sup>low</sup>CXCR6<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> T cells causing liver pathology in NASH.“

Vortrag auf der Jahrestagung der *European Association of the Study of the Liver (EASL)*, 2019, Wien, Österreich.

Dudek, M., Pfister, D., Donakonda, S., Öllinger, R., Rad, Roland., Filpe, P., Lohse A., Heikenwälder, M., Knolle, P.A. „Autoaggression of Foxo1<sup>low</sup>CXCR6<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> T cells causing liver pathology in NASH.“

Vortrag auf der Jahrestagung der *Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI)*, 2019, München, Deutschland.

Dudek, M., Pfister, D., Donakonda, S., Öllinger, R., Rad Roland., Filpe, P., Sebolde, M., Heikenwälder, M., Knolle, P.A. "Autoaggression of Foxo1<sup>low</sup>CXCR6<sup>+</sup>PD-1<sup>hi</sup> CD8 T cells cause liver pathology in NASH."

Poster auf der Jahrestagung der *German Association of the Study of the Liver (GASL)*, 2020, Mainz, Deutschland.