



Technische Universität München  
Fakultät für Medizin  
Institut für Molekulare Immunologie

**Mitochondrien als Sensoren der Virus-Infektion in Hepatozyten und deren  
Rolle in der Immunüberwachung**

Sandra Lampl

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

Vorsitzende: Prof. Dr. Ulrike Protzer

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Prof. Dr. Martin Klingenspor

Die Dissertation wurde am 19.09.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 10.03.2020 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1    Adaptive Immunantwort nach Virus-Infektion der Leber.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2    TNF-vermittelte Zelltod-Signalwege.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3    Mitochondrien sind mehr als nur die Kraftwerke der Zelle .....</b>	<b>9</b>
1.3.1    Mitochondriale Respiration.....	10
1.3.2    Mitochondrien und Calcium.....	11
1.3.3    Mitochondriale Permeabilität und Zelltod .....	14
<b>1.4    Intrazelluläre Sensibilisierung von Hepatozyten als Grundlage der nicht-kanonischen CD8 T Zell Effektorfunktion .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1    Material .....</b>	<b>18</b>
2.1.1    Geräte.....	18
2.1.2    Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.3    Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.4    Puffer und Lösungen .....	23
2.1.5    Kit-Systeme.....	26
2.1.6    Antikörper .....	27
2.1.7    Primer.....	28
2.1.8    Enzyme .....	28
2.1.9    Rekombinante Proteine .....	29
2.1.10    Mauslinien .....	29
2.1.11    Zelllinien.....	29
2.1.12    Rekombinante Adenoviren .....	30
2.1.13    Plasmide .....	30
2.1.14    Computersoftware .....	31
<b>2.2    Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.2.1    Mausmodel und Haltung.....	32
2.2.2    Infektion mit Adenovirus.....	32
2.2.3    Messung der Biolumineszenz <i>in vivo</i> .....	32
2.2.4    TNF Applikation und sALT Messung.....	33
2.2.5    Applikation der Inhibitoren .....	33
2.2.6    Organentnahme.....	34

## Inhaltsverzeichnis

2.2.7	Adenovirus-Produktion und Titration.....	34
2.2.8	Proteinbestimmung.....	36
2.2.9	Caspase Assay .....	37
2.2.10	Leber-Immunhistochemie.....	37
2.2.11	Western Blot.....	37
2.2.12	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	39
2.2.12.1	DNA Isolation .....	39
2.2.12.2	RNA Isolation .....	39
2.2.12.3	cDNA Synthese .....	39
2.2.12.4	qPCR .....	39
2.2.13	Isolation von Mitochondrien aus Mauslebern.....	41
2.2.14	Mitochondrienanalyse.....	42
2.2.14.1	Lipidanalyse.....	42
2.2.14.2	Membranfluidität/Fluoreszenz-Polarisation.....	43
2.2.14.3	Messung der oxidativen Phosphorylierung.....	44
2.2.14.4	Protonen-Leck Messung.....	45
2.2.14.5	ATP Assay .....	46
2.2.14.6	Ca <sup>2+</sup> Sensitivität von Mitochondrien .....	47
2.2.15	Messung der Plasma-HBsAg und -HBeAg Werte.....	47
2.2.16	mRNA-Sequenzierung (Illumina).....	48
2.2.17	Messung der GFP-Fluoreszenzintensität.....	49
2.2.18	Statistik.....	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>TNF-vermittelte Apoptose in virus-infizierten Hepatozyten .....</b>	<b>51</b>
3.1.1	TNF induziert Apoptose in infizierten Hepatozyten ohne Beteiligung von Nekroptose .....	51
3.1.2	TNF-vermittelte Apoptose unabhängig von Caspase 8 Aktivierung .....	53
3.1.3	Mitochondrien-vermittelte Apoptose-Induktion nach Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem ER .....	55
<b>3.2</b>	<b>Virus-vermittelte Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-induzierter Apoptose .....</b>	<b>57</b>
3.2.1	Abhängigkeit der Sensibilisierung von der virus-vermittelten Genexpression.....	58
3.2.2	Analyse des mitochondrialen Lipidoms nach Virus-Infektion .....	59
3.2.3	Bioenergetische Funktionalität von Mitochondrien nach Adenovirus-Infektion.....	62
3.2.4	Mitochondrien als Sensoren der Adenovirus-Infektion in Hepatozyten.....	66

<b>3.3</b>	<b>Hepatitis B Virus (HBV) inhibiert die Mitochondrien-vermittelte Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-induzierter Apoptose .....</b>	<b>68</b>
3.3.1	Ad-HBV 1.3 Infektion verhindert TNF-induzierte Apoptose .....	69
3.3.2	Ca <sup>2+</sup> Sensitivität von Mitochondrien aus Ad-HBV 1.3 infizierten Lebern.....	73
3.3.3	HBV inhibiert aktiv die Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose .....	74
3.3.4	Transkriptionelle Signatur der HBV Replikation in Hepatozyten.....	76
3.3.5	Beteiligung von Mitophagie an der fehlenden Sensibilisierung nach Ad-HBV 1.3 Infektion.....	79
3.3.6	Relevanz der HBV Proteine für die Inhibierung der Sensibilisierung.....	82
<b>3.4</b>	<b>Rolle von Transkription und Translation für die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose .....</b>	<b>86</b>
3.4.1	Relevanz der produzierten Proteinmenge für die Sensibilisierung der Hepatozyten .....	86
3.4.2	Relevanz der RNA-Transkription und der Protein-Translation für die Sensibilisierung der Hepatozyten.....	87
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1	Mitochondrien als Sensoren der Adenovirus-Infektion in Hepatozyten.....	91
4.2	TNF-induzierte Apoptose in Adenovirus-infizierten Hepatozyten .....	95
4.3	Änderungen in der mitochondrialen Ca <sup>2+</sup> -Sensitivität ausgelöst durch virus-vermittelte Genexpression.....	97
4.4	HBV verhindert zu Stande kommen des vor-apoptotischen Zustands von Hepatozyten auf mitochondrialer Ebene.....	101
4.5	Translatonaler Ansatz zur Sensibilisierung von Ad-HBV 1.3 infizierten Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose .....	106
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	129
6.2	Abkürzungen.....	130
6.3	Tabellen.....	135
6.4	Zusätzliche Abbildung .....	145
6.5	Publikation.....	146
6.6	Vorveröffentlichungen.....	146

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der molekulare Mechanismus der Apoptose-Induktion, im Rahmen der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion, untersucht und diskutiert. Die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion basiert auf der Stimulation von virus-spezifischen CD8 T Zellen durch sinusoidale Endothelzellen (LSEC<sup>1</sup>), welche virale Antigene gebunden an MHC I Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren, ohne selbst infiziert zu sein. Daraufhin setzen die CD8 T Zellen TNF<sup>2</sup> frei, welches spezifisch in den Adenovirus (Ad-CMV-GL) oder LCMV infizierten Hepatozyten Zelltod in Form von Apoptose induziert. Diese Apoptose wird unabhängig von der Aktivierung von Caspase 8 und parallel zu einer über TNF induzierten NFκB Antwort ausgelöst. Nach der Stimulation des TNF-Rezeptor I (TNFR I) wird membran-nahes ROS<sup>3</sup> gebildet, was zur Aktivierung von Phospholipase C γ (PLCγ) führt. PLCγ katalysiert die Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), was wiederum den entsprechenden Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum (ER) stimuliert und eine Freisetzung von Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) aus dem ER induziert. Das freigesetzte Ca<sup>2+</sup> induziert eine mitochondriale Permeabilitätstransition (mPT) in infizierten Hepatozyten, woraufhin Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird und Caspase 3 aktiviert. Dadurch wird Apoptose in infizierten Hepatozyten induziert. Die Spezifität der Eliminierung von infizierten Zellen kommt dabei durch eine zell-intrinsische Sensibilisierung nach einer Virus-Infektion zustande. Die Virus-vermittelte Genexpression versetzt die Hepatozyten in einen vor-apoptotischen Zustand, charakterisiert durch eine verringerte Belastbarkeit der Mitochondrien. Diese zeigt sich durch eine verstärkte Sensitivität der Mitochondrien gegenüber Ca<sup>2+</sup>. Dadurch sinkt die benötigte Signalstärke, welche verantwortlich ist für die Induktion einer mPT. In uninfizierten Zellen hingegen, mit einer normalen Belastbarkeit der Mitochondrien, wird nach TNF-Stimulation keine mPT ausgelöst und die Zellen überleben.

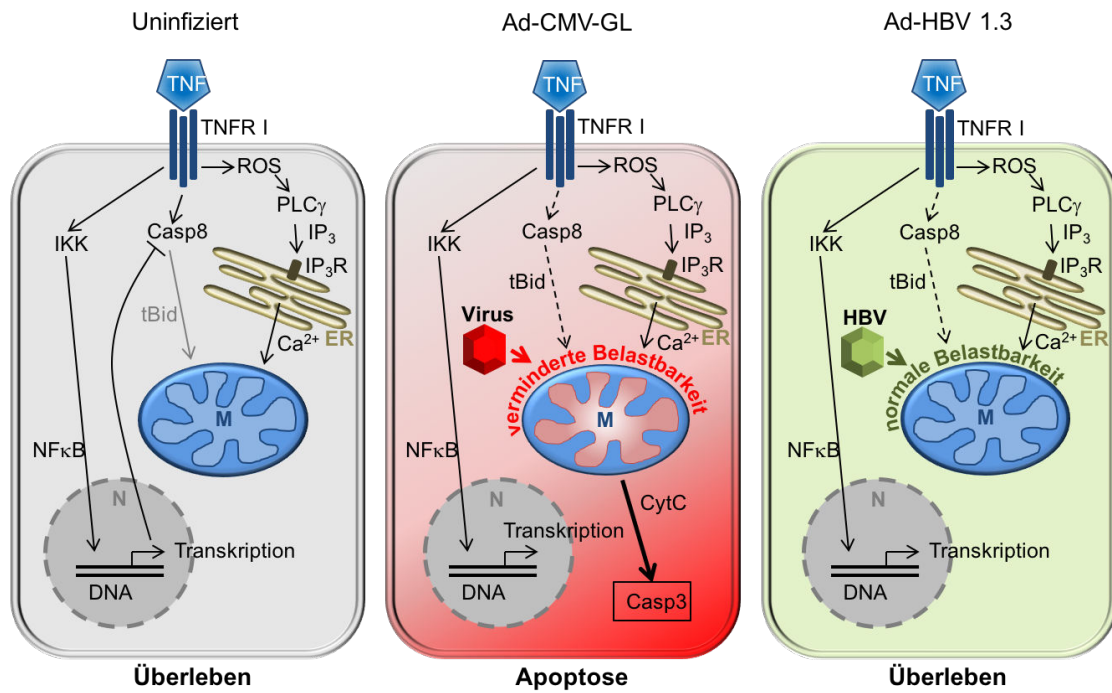
Die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion basiert somit auf einem zell-autonomen Abwehr-Mechanismus in virus-infizierten Hepatozyten, der deren spezifischen Eliminierung unabhängig von der klassischen Pathogen-Erkennung und Antigen-Präsentation in infizierten Zellen ermöglicht.

---

<sup>1</sup> engl.: liver sinusoidal endothelial cells

<sup>2</sup> engl.: tumor necrosis factor

<sup>3</sup> engl.: reactive oxygen species



**Schematische Darstellung 1: Molekularer Mechanismus der Apoptose-Induktion im Rahmen der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion in Virus-infizierten Hepatozyten**

Abkürzungen (sofern nicht im Text): M - Mitochondrium, N - Zellkern/Nukleus, IKK - I $\kappa$ B Kinase Komplex, Casp - Caspase, tBid - gespaltenes (engl.: truncated) Bid, CytC - Cytochrom C

Die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion ist ein universeller Abwehr-Mechanismus, unabhängig von der Art des infizierenden Virus, der aber interessanterweise durch das Hepatitis B Virus (HBV) inhibiert wird. HBV verhindert die Etablierung eines vor-apoptotischen Zustands in den infizierten Hepatozyten, indem es die Sensibilisierung auf der Ebene der Mitochondrien umgeht. Trotz HBV Infektion (Ad-HBV 1.3) zeigen die Mitochondrien eine normale Belastbarkeit und eine TNFR I Stimulation führt nicht zur Induktion einer Apoptose. Da die virus-spezifische CD8 T Zell-Antwort zu 50 % von der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion abhängt, könnte die Inhibierung dieses Immunmechanismus mitverantwortlich sein für die Etablierung einer chronischen HBV Infektion.

## 1. Einleitung

Die Leber ist das zentrale Organ für den gesamten Stoffwechsel und somit verantwortlich für die Bereitstellung von Aminosäuren und Proteinen und für die Verwertung der aufgenommenen Nahrungsbestandteile. Um dieser Rolle gerecht zu werden, wird die Leber durch die Pfortader mit Blut versorgt, welches vom Gastrointestinal-Trakt kommt und reich an Nährstoffen ist. Dadurch ist die Leber aber auch die erste Barriere für Pathogene und Toxine, welche aus dem Gastrointestinal-Trakt ins Blut gelangen, und für deren Abbau verantwortlich. Zu diesem Zweck ist die Leber reich an innatem Immunzellen, wie dendritische Zellen, NK Zellen und NKT Zellen, sowie den leber-residenten Makrophagen, den sogenannten Kupffer-Zellen. Wegen der hohen Menge an Toxinen und Pathogenen, welche eine überschießende Immunantwort und damit schwere Organschäden auslösen können, herrscht in der Leber ein immuntolerantes Milieu wodurch die Aktivierung der Immunantworten in der Leber streng reguliert wird. Gleichzeitig soll so auch einer Immunaktivierung gegenüber aufgenommenen Nahrungsmittel-Antigenen und Eigen-Antigenen vorgebeugt werden. Dieses tolerante Milieu ist gekennzeichnet durch hohe Mengen an entzündungshemmenden Faktoren wie IL-10, TGF-beta und Arginase, welche nicht nur von Immunzellen, sondern auch von Leberzellen selbst, wie sinusoidalen Endothelzellen (LSEC<sup>4</sup>) oder Sternzellen<sup>5</sup>, gebildet werden. Somit hat die Leber ähnliche Eigenschaften wie die Lymphorgane, ist aber gleichzeitig immuntolerant (Crispe 2009, Knolle and Thimme 2014).

### 1.1 Adaptive Immunantwort nach Virus-Infektion der Leber

Hepatotrope Viren machen sich die Immuntoleranz der Leber zu Nutze um eine chronische Infektion etablieren zu können, wie beispielsweise das Hepatitis B Virus (HBV), eines der bekanntesten Vertreter der hepatotropen Viren. Nach Schätzungen der WHO<sup>6</sup> waren 2015 weltweit mehr als 250 Millionen Menschen von einer chronischen HBV Infektion betroffen. Da sich die chronische Infektion bis zu einer andauernden Leberentzündung mit den verschiedensten Folgeerkrankungen entwickeln kann, stellt die HBV Infektion eines der größten Risikofaktoren für

---

<sup>4</sup> engl.: liver sinusoidal endothelial cells

<sup>5</sup> engl.: stellate cells

<sup>6</sup> Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl.: world health organization)



## 1. Einleitung

Leberkrebs dar. Dadurch bedingt kommt es jährlich (Stand 2015) zu mehr als 800.000 Todesfällen durch Folgeerkrankungen einer HBV Infektion (WHO 2019).

Natürlich erleichtert allein das immun-tolerante Umfeld in der Leber die Persistenz eines Virus, aber HBV interagiert noch auf weiteren Ebenen mit der Immunantwort. So induziert es eine Runter-Regulation von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs<sup>7</sup>) in den infizierten Hepatozyten und unterbindet zusätzlich das Aufkommen einer innate Immunantwort auf gleich mehreren Ebenen (Zou, Wang et al. 2016, Mutz, Metz et al. 2018). Durch die fehlende innate Immunantwort auf die HBV Infektion gibt es auch keine Entzündung und die Etablierung einer effizienten adaptiven Immunantwort wird deutlich erschwert. Jedoch hängt die Eliminierung einer HBV-Infektion in der Leber hauptsächlich von der Effizienz der adaptiven Immunantwort ab und ist dabei angewiesen auf die virus-spezifischen CD8 T Zellen (Protzer, Maini et al. 2012, Guidotti, Isogawa et al. 2015). Darüber hinaus spielen auch noch weitere T Zell Populationen vor allem bei der Regulation der Immunantwort eine Rolle. So sind regulatorische T Zellen (Treg) verantwortlich für die Unterdrückung der Funktion der virus-spezifischen CD8 T Zellen, und die virus-spezifischen CD4 T Zellen unterstützen das CD8 T Zell-Priming und deren Effektorfunktion (Knolle and Thimme 2014). Durch die fehlende Entzündung und Aktivierung der innate Immunantwort ist jedoch bislang unklar, wo genau und unter Beteiligung welcher Zell-Populationen das Priming der HBV-spezifischen CD8 T Zellen stattfindet (Murata, Kawashima et al. 2018).

Hingegen bei anderen, die Leber infizierenden Viren, wie beispielsweise humane Adenoviren als Model für Leberinfektionen, findet die Aktivierung der innate und der adaptiven Immunantwort statt, welche schließlich zur Heilung der Infektion führt. Bei solchen Infektionen findet das Priming der naiven CD8 T Zellen klassisch durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs<sup>8</sup>), den dendritischen Zellen (DCs<sup>9</sup>), in den Lymphorganen statt. Die DCs reifen in den infizierten Geweben unter inflammatorischen Bedingungen nach dem Kontakt mit Antigen, und wandern dann in die sekundären Lymphorgane. Dort findet das Priming der T Zellen statt, wodurch die CD8 T Zellen virus-spezifisch werden und zu Effektor-T-Zellen differenzieren (Kurts, Robinson et al. 2010, Zhang and Bevan 2011).

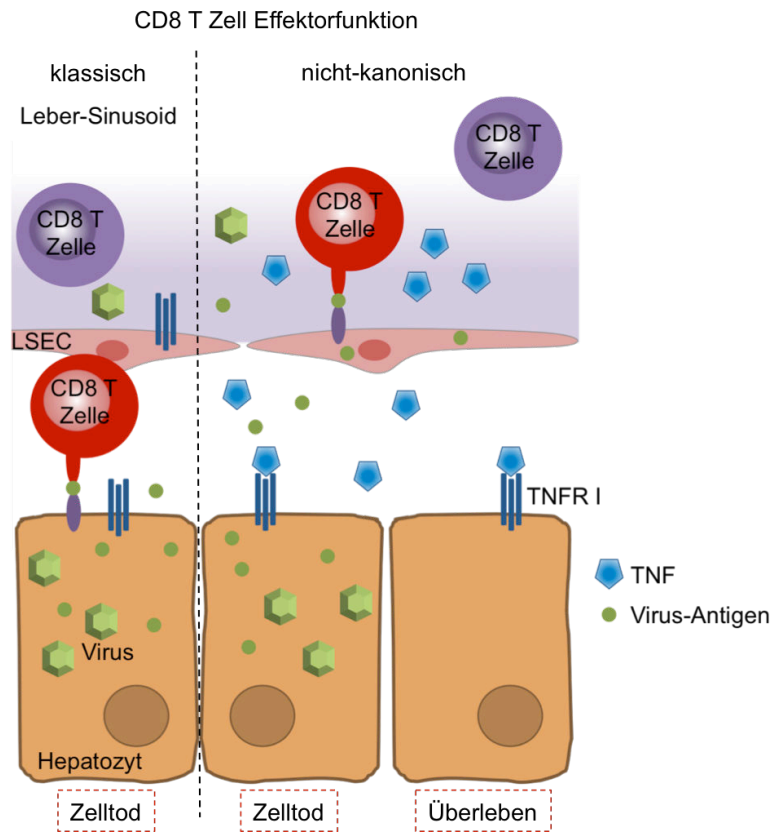
---

<sup>7</sup> engl.: pattern recognition receptors

<sup>8</sup> engl.: antigen presenting cells

<sup>9</sup> engl.: dendritic cells

## 1. Einleitung



Die Effektor CD8 T Zellen können die infizierten Hepatozyten auf drei verschiedenen Wegen bekämpfen (Knolle and Thimme 2014). Klassisch erkennen die Effektor CD8 T Zellen die infizierten Hepatozyten durch virale Antigene, präsentiert auf deren Oberfläche gebunden an MHC I<sup>10</sup> Moleküle, und induzieren daraufhin den Zelltod der infizierten Ziel-Zellen (Zhang and Bevan 2011). Dazu schüttet die T Zelle entweder Granzym und Perforin aus oder vermittelt die Apoptose durch die Bindung von Fas-Ligand an Fas auf der Zielzelle (Lowin, Hahne et al. 1994, Chavez-Galan, Arenas-Del Angel et al. 2009). Neben diesem zytolytischen Weg gibt es auch noch einen nicht-lytischen, bei welchem die virus-spezifischen CD8 T Zellen nach der Antigen-Erkennung Zytokine ausschütten. Die Zytokine, im Zusammenhang mit Hepatitis-Viren vor allem Interferon  $\gamma$ , inhibieren dann die Virus-Replikation und tragen zur Eliminierung der Virus-Infektion bei, ohne die Zellen zu zerstören (Knolle and Thimme 2014). Neben diesen Wegen, die auf einer direkten Interaktion zwischen den virus-spezifischen CD8 T Zellen und den infizierten Hepatozyten beruhen, gibt es auch noch die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion (*Schematische*

<sup>10</sup> engl.: major histocompatibility complex I

## 1. Einleitung

**Darstellung 1).** Diese basiert auf der Kreuz-Präsentation von viralen Antigenen auf nicht-infizierten LSEC, wiederum gebunden an MHC I Moleküle. Die kreuz-präsentierten Antigene werden auch von virus-spezifischen CD8 T Zellen erkannt, welche daraufhin TNF<sup>11</sup> freisetzen. Das TNF wiederum bindet an den TNF-Rezeptor I (TNFR I) auf der Oberfläche der Hepatozyten und induziert Apoptose spezifisch in den infizierten Hepatozyten (Wohlleber, Kashkar et al. 2012). Dieser Mechanismus führt auf der einen Seite zur Verstärkung der CD8 T Zell-Antwort, indem nicht jede CD8 T Zelle an einen infizierten Hepatozyten binden muss und somit mehrere infizierte Zellen durch das sekretierte TNF eliminiert werden können. Darüber hinaus können auch Viren eliminiert werden, welche die Immunantwort umgehen, indem sie die Präsentation von viralen Antigenen durch MHC I Moleküle auf den infizierten Zellen inhibieren, wie das beispielsweise bei hCMV, HIV und Adenovirus der Fall ist (Yewdell and Bennink 1999).

### 1.2 TNF-vermittelte Zelltod-Signalwege

Durch TNF können verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden induziert werden, welche entweder zum Überleben der Zelle oder zu deren Tod führen (**Schematische Darstellung 2**). Dadurch hängt die Zelltod-Induktion nicht nur vom extra-zellulären Signal ab, sondern auch von den intrinsischen Gegebenheiten. Nach der Bindung von TNF an den TNFR I kommt es zur Reorganisation der intrazellulären Rezeptordomänen, wodurch TRADD<sup>12</sup> an den TNFR I binden kann (Hsu, Xiong et al. 1995). Das führt wiederum zur Rekrutierung von RIPK1<sup>13</sup>, was die Bildung des TNFR I Komplex I auslöst (Hsu, Huang et al. 1996). Anschließend wird TRAF2<sup>14</sup> rekrutiert, was die Bindung der zellulären Apoptose-Inhibitoren cIAP1<sup>15</sup> und cIAP2 zur Folge hat (Hsu, Shu et al. 1996, Mahoney, Cheung et al. 2008). Das führt weiter zur Poly-Ubiquitinierung des TNFR I Komplex I, wahrscheinlich initiiert durch cIAP1/2. Entscheidend für die folgende Aktivierung des NFκB<sup>16</sup> Signalwegs ist aber vor allem die Ubiquitinierung von RIPK1, was wiederum zur Rekrutierung des IκB<sup>17</sup> Kinase Komplex (IKK) führt (Tokunaga, Sakata et al. 2009, Brenner, Blaser et al. 2015). IKK

---

<sup>11</sup> engl.: tumor necrosis factor

<sup>12</sup> engl.: TNFR I-associated death domain

<sup>13</sup> engl.: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1

<sup>14</sup> engl.: TNF receptor-associated factor 2

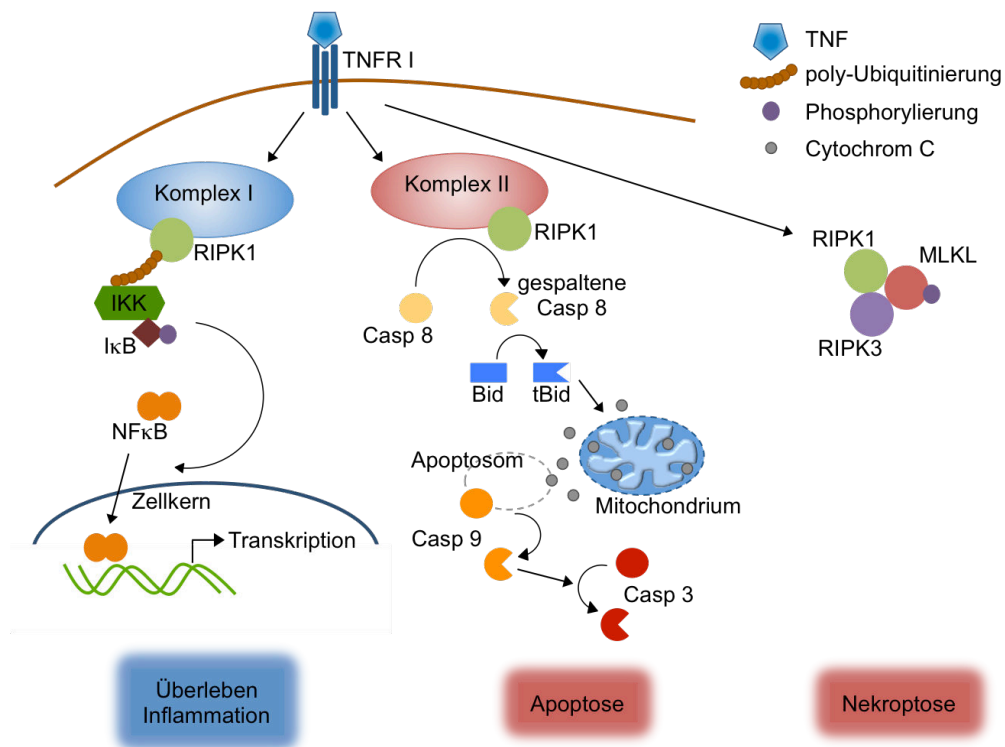
<sup>15</sup> engl.: cellular inhibitor of apoptosis 1

<sup>16</sup> engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

<sup>17</sup> engl.: inhibitor of kappa B

## 1. Einleitung

phosphoryliert den I $\kappa$ B, was dessen Abbau auslöst. Dadurch wird NF $\kappa$ B freigegeben, bestehend aus den Untereinheiten p50 und RelA<sup>18</sup>, verlagert sich in den Zellkern und kann an die DNA binden (Hoffmann and Baltimore 2006). NF $\kappa$ B kann die Expression von über 1600 Zielgenen aktivieren. Darunter befinden sich inflammatorische Zytokine, aber auch anti-apoptotische Faktoren, was zum einen eine Immunantwort einleitet, aber auch das Zellüberleben sichert (Yang 2015). Dazu wird auch die Expression des Inhibitors I $\kappa$ B aktiviert, wodurch NF $\kappa$ B seine Aktivität durch eine negative Rückkopplung selbst limitiert (Hoffmann, Levchenko et al. 2002).



**Schematische Darstellung 3: TNFR I induzierte Signalkaskaden**

Abkürzungen (sofern nicht im Text): Casp = Caspase; tBid = gespaltenes (engl.: truncated) Bid

Alternativ dazu kann die TNFR I Stimulation aber auch zum Tod der Zelle führen. Allerdings muss sich dazu anstelle des TNFR I Komplex I ein TNFR I Komplex II bilden, welcher die Aktivierung der Apoptose-induzierenden Caspasen starten kann. Der zentrale molekulare Schalter für die Bildung des jeweiligen TNFR I Komplex ist die Ubiquitinierung von RIPK1. Wenn RIPK1 de-ubiquitiniert wird oder die

<sup>18</sup> engl.: V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A (oder p65)

## 1. Einleitung

Ubiquitinierung durch fehlende cIAPs gar nicht erst stattfindet, dann bildet sich ein Komplex II, welcher sich vom TNFR I abspaltet und in das Zytosol verlagert (Li, Kobayashi et al. 2006, Brenner, Blaser et al. 2015). Durch die Bindung von FADD<sup>19</sup> wird die Pro-Caspase 8 an den Komplex rekrutiert und dort gespalten, was einer Aktivierung der Caspase 8 entspricht. Abhängig vom Zelltyp kann die Caspase 8 direkt die Effektor-Caspasen 3 und 7 spalten, oder setzt eine weitere Signalkaskade über das Mitochondrium in Gang (Brenner, Blaser et al. 2015). Dabei spaltet die Caspase 8 das Molekül Bid, welches nach der Spaltung Bax und Bak aktiviert, Mitglieder der pro-apoptischen Proteine aus der Bcl-2 Protein-Familie (Jost, Grabow et al. 2009). Bax bzw. Bak induzieren dann eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, was zur Freisetzung von Cytochrom C und weiteren pro-apoptischen Molekülen führt (Kantari and Walczak 2011, Kalkavan and Green 2018). Das Cytochrom C rekrutiert APAF1<sup>20</sup> im Zytosol und initiiert die Bildung des Apoptosoms. Das Apoptosom bindet mehrere Caspase 9 Moleküle und initiiert die Spaltung von Caspase 9, was dann wiederum die Effektor-Caspasen 3 und 7 spaltet und dadurch aktiviert (Li, Nijhawan et al. 1997, Lakhani, Masud et al. 2006, Ow, Green et al. 2008). Die Effektor-Caspasen vermitteln dann die Spaltung von über 1000 weiteren Proteinen, was entweder zu deren Aktivierung oder Abbau führt. Somit wird der für die Apoptose typische Phänotyp induziert, charakterisiert durch eine Kondensation der DNA (Pyknosis), einer Deformation des Zytoskeletts und dem Abschnüren von Plasmamembranvesikeln. Dadurch werden keine Zellbestandteile in die extrazelluläre Matrix (ECM<sup>21</sup>) freigegeben, wodurch die Apoptose einen nicht-immunogenen Zelltod darstellt (Crawford and Wells 2011, Kalkavan and Green 2018).

Während der Bildung des Apoptose Komplex II wird die Spaltung der nicht-ubiquitinierten RIPK1 eingeleitet. Sollte RIPK1 de-ubiquitiniert sein aber nicht gespalten werden können, da Caspase 8 beispielsweise noch von den Apoptose-Inhibitoren cIAP1/2 inhibiert wird, so wechselt das Zelltod-Programm zu Nekroptose (Brenner, Blaser et al. 2015). Dabei bindet RIPK3 an RIPK1 und startet die Bildung des sogenannten Nekrosoms bestehend aus Multiprotein-Komplexen von RIPK3 mit nicht-ubiquitiniertem RIPK1 (Li, McQuade et al. 2012). Dieser Komplex rekrutiert und phosphoryliert MLKL<sup>22</sup>, welches die Nekroptose initiiert (Wu, Huang et al. 2013). Der folgende nekrotische Zelltod-Phänotyp ist charakterisiert durch ein Anschwellen der Zell-Organellen, eine Ruptur der Zellmembran und eine unkontrollierte Freisetzung

---

<sup>19</sup> engl.: Fas-associated death domain

<sup>20</sup> engl.: apoptotic peptidase activating factor 1

<sup>21</sup> engl.: extra cellular matrix

<sup>22</sup> engl.: mixed lineage kinase domain like pseudokinase

## 1. Einleitung

von zellulären Bestandteilen, und beschreibt somit einen entzündungsfördernden Zelltod (Brenner, Blaser et al. 2015).

TNF kann an der Zelloberfläche an zwei TNF-Rezeptoren binden, den TNFR I und den TNFR II, wovon aber nur die Stimulation des TNFR I direkt den Zelltod induzieren kann. Die TNFR II Stimulation aktiviert den NFκB Signalweg und trägt zum Überleben der Zelle bei, jedoch ist Effizienz dieser Signalweiterleitung wahrscheinlich schwächer als die Signalweiterleitung vermittelt durch den TNFR I. Darüber hinaus ist der TNFR I auf fast jeder Zelle vorhanden, wohingegen die Expression des TNFR II beschränkt ist auf Immun- und Endothelzellen (Brenner, Blaser et al. 2015).

Wie bereits erwähnt ist die Beteiligung der Mitochondrien an der Apoptose-Induktion abhängig vom Zelltyp, und die Zellen werden demnach in Typ I und Typ II Zellen unterteilt. T-Lymphozyten sind beispielsweise Typ I Zellen, bei welchen die aktivierte Initiator-Caspase 8 direkt die Effektor Caspasen aktivieren kann. Hingegen bei Typ II Zellen, welche auch die Hepatozyten umfassen, initiiert die aktivierte Caspase 8 die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Jost, Grabow et al. 2009). Somit ist die Initiation der Apoptose in Hepatozyten nach TNF-Stimulation abhängig von der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran.

### 1.3 Mitochondrien sind mehr als nur die Kraftwerke der Zelle

Mitochondrien sind hoch-strukturierte, zelluläre Organellen, welche für die Energieversorgung der Zellen verantwortlich sind. Die Mitochondrien sind aufgebaut aus einer Doppelmembran, wobei die äußere mitochondriale Membran (OMM<sup>23</sup>) und die innere mitochondriale Membran (IMM<sup>24</sup>) den Intermembranraum (IMS<sup>25</sup>) begrenzen. Dabei ist die OMM deutlich permeabler als die IMM und beispielsweise frei durchlässig für Metaboliten, jedoch nicht für zell-schädigende Moleküle wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS<sup>26</sup>) oder Zelltod-Signale. Die IMM ist dagegen sogar weitestgehend undurchlässig für Wasser-Moleküle und Ionen. Die IMM ist in sogenannte Cristae gefalten, welche essentiell sind für die Funktion der Elektronentransportkette (ETC<sup>27</sup>), und begrenzt den Innenraum der Mitochondrien,

---

<sup>23</sup> engl.: outer mitochondrial membrane

<sup>24</sup> engl.: inner mitochondrial membrane

<sup>25</sup> engl.: inter-membrane space

<sup>26</sup> engl.: reactive oxygen species

<sup>27</sup> engl.: electron transport chain

## 1. Einleitung

die sogenannte Matrix (Pernas and Scorrano 2016). Dieser Doppelmembranaufbau und die Tatsache, dass Mitochondrien eine eigene DNA und Transkriptionsmaschinerie besitzen, erklärt sich durch ihren bakteriellen Ursprung. Als Symbionten haben sie die Zellen mit Energie versorgt (Schwartz and Dayhoff 1978, Roger, Munoz-Gomez et al. 2017), sind jedoch nicht nur als isolierte Kraftwerke in den Zellen zu betrachten. Mitochondrien haben deutlich mehr Funktionen und so dienen sie darüber hinaus als Regulatoren in zellulären Stresssituationen, Signalplattformen für die Immunaktivierung, Regulatoren des Zelltodes und sie sind in ihrer Funktion und Morphologie eng gekoppelt an das Voranschreiten des Zellzyklus (McBride, Neuspiel et al. 2006, Galluzzi, Kepp et al. 2012).

### 1.3.1 Mitochondriale Respiration

Die größte Energieausbeute aus dem Abbau eines Glukose-Moleküls wird durch die oxidative Phosphorylierung erreicht. Dazu wird die Glukose zunächst durch die Glykolyse in Pyruvat überführt. Das Pyruvat wird als Acetyl-CoA in den Krebszyklus (TCA<sup>28</sup>) eingebracht, welcher in der mitochondrialen Matrix stattfindet. Während des Krebszyklus werden zwei Kohlenstoffatome abgespalten, was die Umwandlung von Glukose in CO<sub>2</sub>-Einheiten komplettiert. Dabei werden NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> Moleküle gebildet, die Elektronen-Lieferanten für die ETC. Die ETC Komplexe I-IV liegen in der IMM und die Effizienz und Aktivität der ETC hängt von der Faltung der Cristae ab, also von der Morphologie der Mitochondrien. Von NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> werden je zwei Elektronen in die ETC über Komplex I bzw. Komplex II eingeschleust. Die Elektronen werden dann durch Redoxreaktionen über die Komplexe III und IV transportiert und schließlich auf Sauerstoff-Moleküle übertragen, welche dadurch zu H<sub>2</sub>O reduziert werden. Während des Elektronen-Transports werden parallel Protonen von der Matrix über die IMM in den IMS transportiert, wodurch sich ein Protonengradient aufbaut. Dieser Protonengradient wird durch den Komplex V, die ATP-Synthase, schrittweise abgebaut und zur Produktion von ATP verwendet. Durch die Energie, welche beim Transport eines Protons entlang des Protonengradienten zurück in die mitochondriale Matrix freigesetzt wird, wird ein Phosphat-Molekül an ADP gebunden und es entsteht ATP, die Energiewährung der Zelle (Berg 2007, Galluzzi, Kepp et al. 2012, van der Bliek, Sedensky et al. 2017). Während der Glykolyse entstehen lediglich 2 Moleküle ATP pro Glukose-Molekül, wohingegen durch die folgende oxidative Phosphorylierung nochmal 28 ATP-Moleküle pro Glukose-Molekül dazu kommen (Hinkle, Kumar et al.

---

<sup>28</sup> engl.: tricarboxylic acid cycle

## 1. Einleitung

1991). Somit hat die oxidative Phosphorylierung die deutlich effizientere Energieausbeute.

Die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien ist gekoppelt an die mitochondriale Dynamik und an zelluläre Prozesse. So entscheidet die mitochondriale Produktivität beispielsweise über das Fortschreiten des Zellzyklus (McBride, Neuspiel et al. 2006). Eine wichtige Komponente in dieser Steuerung ist die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), ein Sensor für das AMP:ATP Verhältnis in der Zelle. Die AMPK wird durch AMP aktiviert und detektiert somit einen Energiemangel in der Zelle. Nach Aktivierung steuert die AMPK sowohl die Energie-Produktion als auch den Verbrauch, beispielsweise durch die Abschaltung aufwändiger Biosynthesen (Hardie and Lin 2017). Darüber hinaus phosphoryliert die AMPK auch p53 und stabilisiert es dadurch. p53 ist ein Zellzyklus-Checkpoint Protein und sorgt nach Phosphorylierung für einen Stopp des Zellzyklus und einer Inhibition des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase (Jones, Plas et al. 2005). Dadurch wird vor dem Beginn eines neuen Zellzyklus geprüft, ob die metabolische Aktivität der Mitochondrien dafür ausreicht, und im Notfall der Zellzyklus gestoppt. Die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien wird unter anderem auch über deren Morphologie gesteuert. So ist die Faltung der Cristae entscheidend für die Aktivität der ETC. Durch Proteine wird die Faltung der Cristae stabilisiert, was die einzelnen Komplexe I-V der ETC in eine gute Position und den perfekten Abstand zueinander bringt, wodurch die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung maximiert wird (McBride, Neuspiel et al. 2006). Auch die mitochondriale Dynamik, Fusion und Teilung der Mitochondrien, bestimmt deren respiratorische Aktivität. So führt eine verstärkte Fusion der Mitochondrien zu einer Steigerung der Aktivität der oxidativen Phosphorylierung, wohingegen eine Fragmentierung der Mitochondrien mit einer verminderten mitochondrialen Produktivität einhergeht (Chen, Chomyn et al. 2005, Pich, Bach et al. 2005). Somit kann die mitochondriale Aktivität mit dem Energiebedarf der Zelle abgestimmt werden.

### 1.3.2 Mitochondrien und Calcium

Ein weiterer Faktor, der Einfluss nimmt auf die mitochondriale Aktivität und Funktionalität ist Calcium. Calcium ist ein sogenannter „Second Messenger“ in der Zelle und ist in den verschiedensten Signalwegen entscheidend. Deswegen wird die zytosolische Calcium-Konzentration streng reguliert. Normalerweise liegt Calcium im Zytosol in einer Konzentration um 100 nM vor, wohingegen die Konzentration in den



## 1. Einleitung

intrazellulären Calciumspeichern, vor allem dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in Muskelzellen, bei 100  $\mu\text{M}$  liegt. In der ECM erreicht die Calcium-Konzentration sogar 2 mM. Verschiedene Stimuli führen dann zu einem Einströmen von Calcium in das Zytosol entweder über die Plasmamembran oder aus dem ER/SR und erhöhen die zytosolische Calciumkonzentration auf bis zu 1  $\mu\text{M}$ , lokal an den Calcium-Kanälen sogar noch höher (Clapham 1995, Nowycky and Thomas 2002, Bagur and Hajnoczky 2017). Das Einströmen von Calcium kann zum einen durch Rezeptor-gekoppelte Kanäle in der Plasmamembran oder auch Calcium-gekoppelte Kanäle im ER erfolgen. Im Zytosol wird das Calcium dann von Calmodulin gebunden und aktiviert die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase, welche beispielsweise den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert und die Expression der CREB-Zielgene induziert (Clapham 1995). Somit ist Calcium als „Second Messenger“ auch beteiligt an der Induktion von Zellproliferation oder Differenzierung (Sakamoto and Frank 2009). Des Weiteren kann Calcium auch über spannungsgekoppelte Kanäle in das Zytosol gelangen, was besonders von Bedeutung ist für die Signalweiterleitung an den Synapsen zwischen Neuronen und auch an der Induktion einer Muskelkontraktion (Clapham 1995). Unabhängig von den Folgen einer Calcium-aktivierten Signalweiterleitung ist es wichtig, die Calciumkonzentration im Zytosol wieder auf den normalen Wert zu senken. Dazu wird das Calcium über Transporter wieder in das ER bzw. SR verbracht oder über die Plasmamembran in die ECM transportiert (Bagur and Hajnoczky 2017).

Bei der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle. Diese können auch sehr schnell größere Mengen Calcium aufnehmen und sind somit an der Normalisierung der Calcium-Konzentration im Zytosol beteiligt. Der bislang einzig beschriebene Calcium-Importeur für die Mitochondrien ist der mitochondriale Calcium-Uniporter (MCU), und soll für die gesamte Calcium Aufnahme in die Mitochondrien verantwortlich sein (Baughman, Perocchi et al. 2011, De Stefani, Raffaello et al. 2011). Allerdings gibt es aktuell eine Diskussion darüber, ob es nicht doch noch weitere Calcium-Importeure in den Mitochondrien gibt. Beschrieben sind bereits mindestens zwei verschiedene Aufnahme-Modi. Auf der einen Seite die Akkumulation von großen Mengen Calcium bei einer hohen extra-mitochondrialen Calcium-Konzentration und die schnelle aber transiente Aufnahme von Calcium bei einer geringeren extra-mitochondrialen Konzentration, auch bekannt als RaM<sup>29</sup> (Sparagna, Gunter et al. 1995). Dafür können

---

<sup>29</sup> engl.: rapid uptake mode

## 1. Einleitung

entweder zwei Calcium-Kanäle oder zwei unterschiedlich gesteuerte Funktionen von einem Kanal, dem MCU, verantwortlich sein (De Stefani, Rizzuto et al. 2016). In den Mitochondrien wird die hohe Calciumkonzentration abgepuffert, durch die Bindung der freien Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als unlösliches Phosphat (Nicholls and Chalmers 2004). Das Calciumphosphat wird dann in der Form von Calcium-Phosphat-Körnchen gespeichert, wobei der genaue Mechanismus über die Bildung und den Abbau dieser Körnchen noch nicht eindeutig geklärt ist (Solesio 2018). Nach der Wiederherstellung der physiologisch normalen Calciumkonzentration im Zytosol wird das Calcium aus den Mitochondrien nach und nach wieder heraus transportiert, und zurück in das ER überführt oder ganz aus der Zelle heraus transportiert. Dafür sind ein bis jetzt noch nicht identifizierter  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  Transporter und der mitochondriale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Transporter (NCLX) verantwortlich, wobei bei letzterem immer 3-4  $\text{Na}^+$  gegen ein  $\text{Ca}^{2+}$  getauscht werden (De Stefani, Rizzuto et al. 2016).

Calcium wird von den Mitochondrien aber nicht nur aufgenommen, um die zytosolischen Calcium-Signale zu regulieren, viel mehr wird auch die mitochondriale Aktivität durch Calcium gesteuert. So kann  $\text{Ca}^{2+}$  gleich drei mitochondriale Dehydrogenasen aktivieren, die Pyruvat-Dehydrogenase, die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase und die Isocitrat-Dehydrogenase, welche allesamt Reaktionen katalysieren die geschwindigkeitsbestimmend sind für die Bereitstellung von Elektronen für die ETC (Denton, Randle et al. 1972, Rutter and Denton 1988). Dadurch kann  $\text{Ca}^{2+}$  die Produktivität und Aktivität der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung zur Energieproduktion steigern (De Stefani, Rizzuto et al. 2016). An speziellen Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien, den sogenannten MAMs<sup>30</sup>, kann sogar Calcium ausgetauscht werden, ohne die zytosolische Calciumkonzentration merklich zu verändern (Rizzuto, Pinton et al. 1998). Der Kontakt wird nicht durch eine Verbindung der Membrane hergestellt, sondern entsteht durch die Interaktion von mitochondrialen und ER-Proteinen. Eine Vielzahl dieser Proteine ist an der zellulären Calcium-Homöostase beteiligt, wodurch Calcium fast direkt vom ER in die Mitochondrien fließen kann. Calcium strömt durch den  $\text{IP}_3\text{R}$  aus dem ER und wird direkt über VDAC und MCU in die mitochondriale Matrix transportiert. VDAC ist ein Kanal in der OMM, welcher durchgängig ist für Ionen und MCU ist der Calcium-Transporter in der IMM. Ein direkter Fluss von Calcium in die Mitochondrien erhöht aber nicht nur die mitochondriale Aktivität, sondern kann bei einem andauernden hohen Calcium-Import auch zu einer mitochondrialen

---

<sup>30</sup> engl.: mitochondria associated membranes

## 1. Einleitung

Permeabilitätstransition (mPT) mit folgender Induktion des Zelltods führen (Sassano, van Vliet et al. 2017, Szymanski, Janikiewicz et al. 2017).

### 1.3.3 Mitochondriale Permeabilität und Zelltod

Die meisten Zelltod-Wege gehen mit der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran einher (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). Der wohl bekannteste Zelltod-Weg, die Apoptose, ist in Typ II Zellen, zu denen auch die Hepatozyten zählen, abhängig von der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Dazu wird über proapoptische Bcl-2 Proteine eine Permeabilisierung der OMM herbeigeführt, was dann die Freisetzung von Cytochrom C aus dem IMS auslöst und folglich die Apoptose induziert (Kantari and Walczak 2011). Darüber hinaus kann durch ein starkes Calcium-Signal in den Mitochondrien die mPT eingeleitet werden. Dabei bindet  $\text{Ca}^{2+}$  in der mitochondrialen Matrix an CyclophilinD, was die Öffnung der mPT-Pore zur Folge hat. Nach der Öffnung der mPT-Pore kann einerseits auch Cytochrom C freigesetzt werden und Apoptose wird eingeleitet. Aber es kommt auch zum Einströmen von Ionen und Wasser in die mitochondriale Matrix, was zu einem kompletten Verlust der mitochondrialen Integrität führt. Dadurch kann auch ein Zelltod eingeleitet werden, der phänotypisch der Nekrose entspricht (Kroemer, Galluzzi et al. 2007, Rasola and Bernardi 2011). Die Zusammensetzung der mPT-Pore ist bisher nicht genau bekannt. Ursprünglich wurde eine Kombination aus VDAC in der OMM und ANT in der IMM postuliert, deren Öffnung über CyclophilinD gesteuert wird. Allerdings erscheint aktuell eine Beteiligung der C-Untereinheiten der ATP-Synthase in der IMM bei der Bildung der mPT-Pore am wahrscheinlichsten. Jedoch kann ANT als Baustein der mPT-Pore nicht komplett ausgeschlossen werden (Amodeo, Solesio et al. 2017, Bonora, Morganti et al. 2017).

Neben den beschriebenen Wegen der Zelltod-Induktion über eine Permeabilisierung der Mitochondrien sind auch noch weitere Zelltod-Signalwege bekannt bei welchen die Mitochondrien, ihre Funktion und Integrität, eine zentrale Rolle spielen. Dazu zählen die Autophagie, ROS-vermittelten Stresszustände sowie die Pyroptose, und die mitotische Katastrophe (Kroemer, Galluzzi et al. 2007, Galluzzi, Vitale et al. 2018).

## 1. Einleitung

### 1.4 Intrazelluläre Sensibilisierung von Hepatozyten als Grundlage der nicht-kanonischen CD8 T Zell Effektorfunktion

Wohlleber et al. beschrieben 2012 die nicht-kanonische CD8 T Zell Effektorfunktion als substantiellen Teil der adaptiven Immunantwort zur Heilung einer hepatischen Virus-Infektion. Dieser Mechanismus basiert auf der Erkennung von kreuz-präsentierten viralen Antigenen durch virus-spezifische CD8 T Zellen, in deren Folge die T Zellen TNF freisetzen, was wiederum spezifisch in den infizierten Hepatozyten zum Zelltod führt (*Schematische Darstellung 1*). Es konnte gezeigt werden, dass die nicht-kanonische CD8 T Zell Effektorfunktion 50 % der gesamten CD8 T Zell Effektorfunktion bei der Bekämpfung von hepatischen Virus-Infektionen in der Maus ausmacht (Wohlleber, Kashkar et al. 2012). Somit stellt sie nicht nur einen Backup-Weg im Falle einer Inhibierung der klassischen CD8 T Zell Effektorfunktion oder der Antigenpräsentation durch MHC I Moleküle auf den infizierten Hepatozyten dar, sondern generell einen festen Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Allerdings ist dieser Mechanismus abhängig von einer intrazellulären Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermitteltem Zelltod nach der Virus-Infektion, da TNF allein nicht zwischen infizierten und nicht-infizierten Hepatozyten differenzieren kann.

Der zugrundeliegende Mechanismus der Effektorfunktion und auch der Sensibilisierung wurde bereits teilweise in der Veröffentlichung von Wohlleber et al. sowie in der Doktorarbeit von Dr. Marianne Janas untersucht und beschrieben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der TNF-vermittelte Zelltod nur über die Stimulation von TNFR I erfolgt. Weder ist TNFR II daran beteiligt, noch kann der Zelltod in den infizierten Hepatozyten durch andere TNF-ähnlichen Zelltod-Liganden induziert werden. Auch wird die Zelltod-Induktion direkt von TNF ausgelöst und nicht durch einen sekundären Effekt über eine weitere Aktivierung von Immunzellen wie B Zellen, NK Zellen oder Granulozyten (Wohlleber, Kashkar et al. 2012, Janas 2015). Bislang weitestgehend unbekannt ist aber die intrazelluläre Signalweiterleitung nach einer Stimulation durch TNF, welche final zum Zelltod des infizierten Hepatozyten führt. Auch ist die molekulare Grundlage der Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten gegenüber TNF-vermitteltem Zelltod noch nicht identifiziert. Jedoch können bereits viele potentielle Ursachen für die Sensibilisierung ausgeschlossen werden. So gibt es weder einen Unterschied in der TNFR I Expression in infizierten und nicht-infizierten Hepatozyten, noch in der Expression von zellulären Apoptose-Inhibitoren. Generell konnte bislang kein Unterschied in den Proteinen, beteiligt an

## 1. Einleitung

der TNFR I vermittelten Signalweiterleitung, detektiert werden, weder auf Transkriptom noch auf Proteom-Ebene, weder für pro- noch für anti-apoptotische Proteine. Auch ist ein eventuell nach der Infektion auftretender zellulärer Stress nicht an der Sensibilisierung beteiligt (Janas 2015, und nicht-publizierte Daten).

In der vorliegenden Arbeit soll zum einen die TNF-induzierte Signalkaskade, welche schließlich zum Zelltod der infizierten Hepatozyten führt, identifiziert werden. Auch ist die Form des stattfindenden Zelltodes, beispielsweise Apoptose oder Nekroptose, Gegenstand der Arbeit. Des Weiteren soll die molekulare Grundlage der Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermitteltem Zelltod nach Virus-Infektion untersucht werden. Hierzu gibt es bereits erste Hinweise, dass Mitochondrien sowohl am TNF-vermittelten Zelltod, als auch an der Sensibilisierung beteiligt sind. Die zu prüfende Hypothese ist, dass Mitochondrien durch eine Virus-Infektion in ihrer Funktion verändert werden, was einen vor-apoptotischen Zustand der Zelle bedingt. Nach dem TNF-Signal wird dann, abhängig von der mitochondrialen Signalübersetzung, der Zelltod spezifisch in den infizierten Hepatozyten ausgelöst.

Die beschriebene, nicht-kanonische CD8 T Zell Effektorfunktion ist an der Heilung einer Adenovirus Infektion, als Modelinfektion für die Leber, sowie an der Heilung einer LCMV Infektion beteiligt (Wohlleber, Kashkar et al. 2012). Das Adenovirus und das LCMV gehören zu zwei unterschiedlichen Virus-Gattungen und haben weder in ihrem Aufbau oder in ihren Genomen, noch in ihrer Biologie viele Gemeinsamkeiten. So handelt es sich bei dem Adenovirus um ein unbehülltes DNA-Virus mit DNA-Replikation im Zellkern, und bei LCMV um ein behülltes RNA-Virus dessen gesamte Replikation im Zytoplasma stattfindet (Emonet, Urata et al. 2011, Hoeben and Uil 2013). Trotz aller Unterschiede führen aber beide Viren nach Infektion zu einer Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der nicht-kanonischen CD8 T Zell Effektorfunktion um eine generelle Funktion handelt, welche unabhängig vom Virus an der Heilung einer Leber-Infektion beteiligt ist. Deswegen stellt sich die Frage, ob ein gut an die Leber angepasstes Virus, wie beispielsweise HBV, auch unter Beteiligung der nicht-kanonischen CD8 T Zell Effektorfunktion vom Immunsystem bekämpft und ausgelöscht wird. Das würde zum einen die generelle Funktionalität und elementare Beteiligung dieses Mechanismus an der adaptiven Immunantwort unterstreichen und auch eine weitere Ebene in der Immunantwort auf eine HBV Infektion darstellen. Da bei einer chronischen HBV Infektion das Immunsystem versagt und die vorhandenen virus-spezifischen T Zellen nicht funktional und erschöpft (*exhausted T cells*) sind, wird aktuell an mehreren möglichen immun-basierten Therapien für eine chronische

## 1. Einleitung

HBV-Infektion geforscht, welche auf einer Re-Aktivierung des Immunsystems basieren (Willimsky, Protzer et al. 2013, Schinazi, Ehteshami et al. 2018, Kosinska, Moeed et al. 2019). Eine Beteiligung der nicht-kanonischen CD8 T Zell Effektorfunktion an der Bekämpfung einer HBV Infektion würde somit eine weitere Basis für eine Immun-basierte antivirale Therapie-Strategie gegen eine HBV Infektion darstellen. Folglich soll in der vorliegenden Arbeit die nicht-kanonische CD8 T Zell Effektorfunktion auch im Zusammenhang mit einer HBV Infektion untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blotter Semi-Dry	TransBlot® Turbo™	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
CO <sub>2</sub> Inkubator	HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
Dehydrierung	Leica ASP300S	Leica Biosystems, Nussloch
Diagnostik HBV	ARCHITECT i System	Abbott, Abbott Park, IL/USA
Elektrophorese-Kammer (Western Blot)	Criterion™ Cell	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Energieeinheit	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Färbeautomat	Bondmax Rx™	Leica Biosystems, Nussloch
Feinwaage	Analysenwaage ABS	Kern & Sohn, Balingen
Fluoreszenz- Spektrometer	Fluoreszenz-Spektrometer FP-8300	Jasco Deutschland, Pfungstadt
Flux-Analysator	Seahorse XF <sup>e</sup> 96 Extracellular Flux Analyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA
Imaging-System	ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
<i>In-vivo</i> -Imaging-System	IVIS® Lumina LT Series III	Caliper Lifesciences, Rüsselsheim
Massenspektrometer	maXis II LC-QToF gekoppelt mit UPLC	Bruker Daltonics, Billerica, MA/USA
Motor für Potter	EUROSTAR 40 digital	IKA®-Werke, Staufen
Objektträger-Scanner	Aperio AT2	Leica Biosystems, Nussloch
Oxygraph	Oroboros O2k	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
PCR-Cycler	ProFlex PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA/USA

## 2. Material und Methoden

Perfusionspumpe	Masterflex® L/S® Digital Standard Drive	Cole-Parmer, Vernon Hills, IL/USA
pH-Meter	inoLab® pH 7110	WTW (Xylem Analytics), Weilheim
Plattenphotometer	- Tecan Spark 10M - Tecan Infinite M1000 Pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Potter-Elvehjem	Potter Elvehjem PTFE Pistill und Glasröhrchen	Merck, Darmstadt
qPCR	LightCycler® 480 II	Roche, Basel, Schweiz
Reflotron	Reflotron® Plus	Roche, Basel, Schweiz
RNA-Sequenzierung	NextSeq 500	Illumina, San Diego CA/USA
Steril-Bench	Heraeus® HERASafe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
TPP <sup>+</sup> Elektrode	TPP <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> Elektrode	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Ultraschallwasserbad	Sonorex Digitec	Bandelin electronic, Berlin
Ultrazentrifugen	- Avanti J-25I - Optima LE-80K	Beckman Coulter, Brea, CA/USA
Vakuumzentrifuge	Concentrator plus	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	- Heraeus® Fresco 17 - Heraeus® Multifuge X3R Rotanta 460 RC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA Andreas Hettich, Tuttlingen

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96well Platten	Microplate, 96well, F-Bottom, chimney-well: - white, lumitrac - µ-clear, black	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Österreich
ALT-Teststreifen	Reflotron GPT Teststreifen	Roche, Basel, Schweiz
Blut-Lanzetten	Supra Blutlanzetten	megro, Wesel
Blut-Röhrchen	Microvette® 500 LH-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
Dialysekammer	Slide-a-Lyzer® G2 Dialysis Cassettes 10K MWCO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA



## 2. Material und Methoden

ESI Tune Mix	ESI Tuning Mix for ion trap	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA
Glas-Röhrchen	High-strength centrifuge tubes (15 ml, 30 ml)	Kimble Chase, Rockwood, TN/USA
Hamilton-Spritzen	O2k Titration Set	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Insulinspritzen	Omnican® Insulinspritzen	B.Braun, Melsungen
Kanülen (20G, 22G, 27G)	Sterican® Injektionskanülen	B.Braun, Melsungen
Kapillaren zur Blutentnahme	HIRSCHMANN® ringcaps® Li-Heparin 32 µl	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
qPCR 384well-Platten	LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white	Roche, Basel, Schweiz
Seahorse 96well Platte	XF96 cell culture microplates	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA
Seahorse XF <sup>96</sup> Cartridge	Extracellular Flux Assay Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA
UPLC-Säule	UPLC C18 CORTECS – 2.1 x 150 mm, 1,6 µm	Waters Corporation, Milford, MA/USA
UZ-Röhrchen	Ultra-Clear™ Tubes (17 ml)	Beckman Coulter, Brea, CA/USA
Western Blot Gel	AnykD™ Criterion™ TGX™ Precast Gel	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Western Blot Membran	Midi-PVDF TransBlot® Turbo™ Transfer-Pack	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
0,9% NaCl (isotonische Kochsalzlösung)	Deltamedica, Reutlingen
1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Acetonitril LiChrosolv®	Merck Millipore, Darmstadt
ADP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Ameisensäure	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA
Ammoniumformiat	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA

## 2. Material und Methoden

AntimycinA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt
ATP (aus ATP Detektions-Kit)	Roche, Basel, Schweiz
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Bromphenoblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
BSA	AppliChem, Darmstadt
BSA (Fettsäure-frei)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
CCCP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
CsCl	AppliChem, Darmstadt
Cyclosporin A (für Mitochondrien Assay)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Cyclosporin A (Sandimmun® 50 mg/ml Lösung), in vivo Applikation	Novartis, Basel, Schweiz
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
DTT	AppliChem, Darmstadt
Edelofosine	Tocris Bioscience, Bristol, UK
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
$\text{H}_2\text{O}$ (qPCR)	Roche, Basel, Schweiz
$\text{H}_3\text{PO}_4$ (Phosphat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
HCl	AppliChem, Darmstadt
Heparin	B.Braun, Melsungen
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
KCl	AppliChem, Darmstadt
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	AppliChem, Darmstadt
KOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Carlsbad, CA/USA
Luziferin-K-Salz	PJK, Kleinblittersdorf

## 2. Material und Methoden

Malat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Malonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	AppliChem, Darmstadt
Milchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
MOPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
MTBE LiChrosolv®	Merck Millipore, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	AppliChem, Darmstadt
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Nigericin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Nonident P-40	AppliChem, Darmstadt
Oligomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Pefablock	Carl Roth, Karlsruhe
Percoll™	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt
Protease-Inhibitor (IB), cOmplete, EDTA-free	Roche, Basel, Schweiz
Protease-Inhibitor (RIPA), cOmplete tablets mini	Roche, Basel, Schweiz
Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Q-VD-OPh	Biomol, Hamburg
Rhodamin 123	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Rizinusöl	Merck, Darmstadt
Rotenon	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
SBI-0206965	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI/USA
SDS	AppliChem, Darmstadt
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
Succinat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Sucrose	AppliChem, Darmstadt
Tes	Carl Roth, Karlsruhe

## 2. Material und Methoden

Tetraphenylphosphonium-Chlorid (TPP <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
XF Calibrant pH 7,4	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4  von Biochrom GmbH (Berlin)
TE Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA pH 8,0
Viruspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7,8 (mit NaOH)
10x CsCl-Puffer	100 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM Tris-NaOH pH 7,8
CsCl Lösungen:	je 100 ml mit 10 ml 10x CsCl Puffer
1,25 CsCl	36,16 g CsCl
1,34 CsCl	51,20 g CsCl
1,40 CsCl	62,00 g CsCl
Dialysepuffer	3 % Sucrose 150 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) pH 7,8

## 2. Material und Methoden

RIPA	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 % Nonident P-40 1 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS pH 7,4 (mit HCl)  1 Tablette/ 10 ml Proteaseinhibitoren (frisch dazugeben)
HEB	25 mM HEPES (pH 7,4) 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA  1 mM Pefablock (frisch dazugeben) 1 µg/ml Aprotinin (frisch dazugeben) 1 µg/ml Leupeptin
Isolationspuffer IB (++)	220 mM Mannitol 80 mM Sucrose 10 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 1 mM EDTA (pH 7,4) pH 7,4 (mit KOH)  0,5 % BSA (fettsäurefrei, frisch dazugeben) 1 Tablette/ 50 ml Proteaseinhibitoren (fettsäurefrei, frisch dazugeben)
Isolationspuffer IP	300 mM Sucrose 5 mM TES 0,2 mM EGTA pH 7,2 (mit KOH)
Isolationspuffer IPP	300 mM Sucrose 10 mM TES 0,2 mM EGTA pH 6,9 (mit KOH)  0,1 % BSA (fettsäurefrei, frisch dazugeben)

## 2. Material und Methoden

Eluent A2	Acetonitril-Wasser-Gemisch (60/40) 10 mM Ammoniumformiat 0,1% Ameisensäure  hergestellt von Frau Dr. Constanze Müller (Helmholtz-Zentrum München, Neuherberg, Deutschland)
Swelling Puffer	200 mM Sucrose 10 mM MOPS-Tris (pH 7,4) 5 mM Succinat (pH 7,0) 1 mM Phosphat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 7,4) 10 $\mu\text{M}$ EGTA (pH 7)  2 $\mu\text{M}$ Rotenon (frisch dazugeben)
MAS	70 mM Sucrose 220 mM Mannitol 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5 mM $\text{MgCl}_2$ 2 mM HEPES 1 mM EGTA pH 7,2 (mit KOH)  0,3 % BSA (fettsäurefrei, frisch dazugeben)
KHE	120 mM KCl 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 3 mM HEPES 1 mM EGTA pH 7,2 (mit KOH)  0,3 % BSA (fettsäurefrei, frisch dazugeben)
2x Proteinauftragspuffer	0,58 M Sucrose 4 % SDS 0,04 % Bromphenolblau 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)  60 mg/ml DTT (frisch dazugeben)

## 2. Material und Methoden

SDS Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure
TBST	20 mM Tris 137 mM NaCl pH 7,6 (mit HCl)  0,1 % (v/v) Tween 20 (frisch dazugeben)

### 2.1.5 Kit-Systeme

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
ARCHITECT HBeAg	Abbott Laboratories, Sligo, Irland
ARCHITECT HBsAg	Abbott Laboratories, Sligo, Irland
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche, Basel, Schweiz
Bond Polymer Refine Detection	Leica Biosystems, Nussloch
Bond Polymer Refine Red Detection	Leica Biosystems, Nussloch
Caspase-Glo® Assay (3/7 und 8)	Promega, Madison, WI/USA
DAB Lösung und Puffer	Dako, Carpinteria, CA/USA
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
ECL™ Select Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Nextera XT Kit	Illumina, San Diego CA/USA
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Düren
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	Bioline Reagents, London, UK
SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Takyon™ NoRox SYBR® MasterMix dTTP Blue	Eurogentec, Lüttich, Belgien

## 2. Material und Methoden

### 2.1.6 Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Nummer/Lot</b>	<b>Verd.</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Western Blot – Primärantikörper</b>				
Beclin-1	D40C5	3495/1	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
BNIP3L/Nix	D4R4B	12396/2	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Caspase 3	polyklonal	9662/15 oder 16	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Caspase 8	1G12	ALX-804-447- C100/L30012	1000	Enzo Life Sciences, Lörrach
GAPDH	D16H11	5174/6	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
gespaltene Caspase 8	polyklonal	9429/2	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
LC3A	D50G8	4599/1	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Parkin	Prk8	4211/7	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
<b>Western Blot – Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt)</b>				
Kanninchen (leichte Kette)	5A6-1D10	211-032-171/ 130846	20.000	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK
Maus (leichte Kette)	Polyklonal	115-035-174/ 129518	20.000	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK
Ratte	polyklonal	112-035-003	20.000	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK
<b>Hexontitration (HRP-gekoppelt)</b>				
Hexon	polyklonal	PA1-73054	200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA



## 2. Material und Methoden

<b>Immunhistochemie</b>				
gespaltene Caspase 3	polyklonal	9661	150	Cell Signaling Technology, Frankfurt
GFP	polyklonal	20R-GR011	2500	Fitzgerald Industries, Acton MA/USA
HBV core	polyklonal	RB-1413	50	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA/USA

### 2.1.7 Primer

<b>Gen/Ziel-sequenz</b>	<b>Sequenz (5'&gt;3') Forward</b>	<b>Sequenz (5'&gt;3') Reverse</b>	<b>Annealing Temperatur</b>
AdV	TAAGCGACGGATGTGG	CCACGTAAACGGTCAAAG	58 °C
E1A	GTGCCCCATTAACCAGTT	GGCGTTTACAGCTCAAGTCC	60 °C
E2A	GAAATTACGGTGATGAACCCG	CAGCCTCCATGCCCTTCTCC	60 °C
Fiber	GGAGACAAAACCTAAACCTGTA ACAC	TCCCATGAAAATGACATAGAG TATGC	60 °C
GFP	GACGACGGCAACTACAAGAC	GTCCTCCTTGAAGTCGATGC	60 °C
HBV	GTTGCCCGTTTGTCTCTAAT TC	GGAGGGATACATAGAGGTTC TTGA	58 °C
HBV S Antigen	TTCCAGGATCCTCAACC	GCCCACTCCCATAGGAATTT	60 °C

### 2.1.8 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix	TE Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
PacI_FD	10x FD-Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
Maxima RT Polymerase	5x RT Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA

## 2. Material und Methoden

### 2.1.9 Rekombinante Proteine

<b>Protein</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
mTNF (rekombinantes murines TNF)	PMC3013	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Carlsbad, CA/USA

### 2.1.10 Mauslinien

Alle Mauslinien haben einen C57BL/6J Hintergrund.

<b>Linie</b>	<b>Herkunft</b>
C57BL/6J (Wildtyp, Inzuchtstamm)	Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), oder Zuchtüberschuss der eigenen Maushaltung des Instituts für molekulare Immunologie (IMI)
MLKL <sup>-/-</sup>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Philipp Jost (III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München)
Casp8 <sup>flox/flox</sup>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Philipp Jost (III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München)

### 2.1.11 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>
HEK-293 (ATCC® CRL-1573™)	ATCC, Manassas, VA/USA
Medium:	
DMEM mit Glucose (GIBCO)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
+ 10 % FCS	PAN-Biotech, Aidenbach
+ 2 mM Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
+ 100 U/ml Penicillin/ 0,1 mg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA

## 2. Material und Methoden

### 2.1.12 Rekombinante Adenoviren

<b>Adenovirus</b>	<b>Expressionskassette</b>
Ad-CMV-GL	CMV-Promotor; eGFP (G) und Luziferase (L) (gekoppelt durch eine T2A-Site) als Markergene
Ad-CMV-GCL	CMV-Promotor; eGFP, Cre-Rekombinase (C), Luziferase (alle gekoppelt durch eine T2A-Site)
Ad-ctrl	kein Gen kodiert
Ad-HBV 1.3	HBV 1.3 Überlängen-Konstrukt; das Adenovirus fungiert als Shuttle für das HBV-Genom
Ad-HBV 1.3 core KO	HBV 1.3 Überlängen-Konstrukt mit Stopp-Codon nach dem Start-Codon der core Sequenz, somit Knockout des core Proteins
Ad-HBV 1.3 x KO	HBV 1.3 Überlängen-Konstrukt mit Stopp-Codon nach dem Start-Codon der x Sequenz, somit Knockout des x Proteins
Ad-HBV 1.3 KO	HBV 1.3 Überlängen-Konstrukt mit Stopp-Codon nach den Start-Codons von jeder kodierenden Sequenz, somit ein Knockout aller HBV Proteine
Ad-CMV/GFP-HBV	CMV-Promotor vor eGFP und unabhängig davon das HBV 1.3 Überlängenkonstrukt
Ad-TTR-GL	TTR-Promotor; eGFP und Luziferase (gekoppelt durch eine T2A-Site)
Ad-GFP	CMV-Promotor; eGFP
Ad-GFP w/o ATG	CMV-Promotor; eGFP mit Mutation von jedem Start-Codon (ATG) in der Sequenz von eGFP in ein Stopp-Codon

### 2.1.13 Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Herkunft</b>
Gateway™ pENTR™ 11	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
Gateway™ pAd/PL-DEST™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA
pAdTrack	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Protzer (Institut für Virologie, Technische Universität München)

## 2. Material und Methoden

### 2.1.14 Computersoftware

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Endnote X9.1.1	Thomson Reuters, Toronto, Kanada
Excel für Mac 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA
i-control 2.0	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Illustrator CS5	Adobe, San José, CA/USA
Image Lab, Version 5.2	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Lightcycler 480 Software 1.5.1.62 SP2	Roche, Basel, Schweiz
Living Image 4.3.1	Caliper Lifesciences, Rüsselsheim
Oroboros DatLab V6.1	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Prism 5.0a für Mac	GraphPad Software, San Diego, CA/USA
R	R Foundation, Wien, Österreich
Seahorse XFReader96 Version 1.2	Agilent Technologies, Santa Clara, CA/USA
SPARKCONTROL	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Word für Mac V15.31	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA

## 2. Material und Methoden

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Mausmodel und Haltung

C57BL/6J Mäuse wurden von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Für die Experimente wurden männliche Tiere zwischen 6 und 10 Wochen verwendet. Zusätzlich wurden auch Tiere aus dem Zuchtüberschuss der AG Knolle verwendet. Alle Tiere wurden unter spezifisch pathogen-freien (SPF) Bedingungen und nach den Regeln der FELASA<sup>31</sup>-Richtlinien gehalten. Die transgenen Mauslinien MLKL<sup>-/-</sup> und Casp8<sup>flox/flox</sup> wurden von Prof. Dr. Philipp Jost (III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München) bereitgestellt.

#### 2.2.2 Infektion mit Adenovirus

Die Mäuse wurden mit einem replikations-defizienten Adenovirus infiziert (*siehe 2.2.7 Adenovirus-Produktion und Titration*). Dazu wurde der Virus direkt nach dem Auftauen in isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) verdünnt, auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  bzw.  $1 \times 10^7$  IFU/ $\mu$ l (genaue Dosis siehe Experiment). Den Mäusen wurden dann je 100  $\mu$ l der Viruslösung *i.v.* über die Schwanzvene injiziert (entweder  $5 \times 10^8$  IFU/Maus oder  $1 \times 10^9$  IFU/Maus).

#### 2.2.3 Messung der Biolumineszenz *in vivo*

Zur Quantifizierung der Infektion *in vivo* wurde einen Tag nach der Infektion mit einem Adenovirus, welcher für das Markergen Luziferase kodiert, die Biolumineszenz in den Tieren gemessen. Die Expression der Luziferase korreliert direkt mit der applizierten Virusmenge und war somit ein Maß für die Infektion (abhängig vom applizierten Virus bzw. dem verwendeten Promotor). So konnte der Erfolg und die Effizienz der Infektion über die Bestimmung der Biolumineszenz gemessen werden. Dazu wurde den Mäusen 5 Minuten vor der Messung 100 mg/kg KG D-Luciferin-K-Salz in PBS *i.p.* injiziert. Für die Messung wurden die Mäuse mit 2,5% Isofluran narkotisiert. Die Messung selbst wurde mit einem IVIS Lumina LT-Series III durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Living Image-Software.

---

<sup>31</sup> engl.: Federation of European Laboratory Animal Science Associations

## 2. Material und Methoden

### 2.2.4 TNF Applikation und sALT Messung

An Tag 2 nach Infektion mit Adenovirus wurde den Mäusen 400 ng/Maus murines TNF *i.v.* über die Schwanzvene appliziert. Das TNF induzierte Zelltod in den infizierten Hepatozyten. Für die Messung des Zelltods in der Leber *in vivo* wurde den Mäusen vor TNF Applikation und 4 Stunden nach Applikation jeweils 32 µl Blut durch Punktion der *vena facialis* entnommen und das Level der Alaninaminotransferase im Serum (sALT) bestimmt. Der sALT Wert wurde mit Hilfe von Reflotron GPT Teststreifen in einem Reflotron-Analyse-System gemessen.

### 2.2.5 Applikation der Inhibitoren

Für einzelne Fragestellungen wurden den Mäusen verschiedene Inhibitoren vor der sALT Messung appliziert. Q-VD-Oph, ein Pan-Caspase-Inhibitor, wurde den Mäusen in einer Dosis von 10 mg/kg KG in 40 µl 50% DMSO in isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) *i.p.* verabreicht. Kontrollmäusen wurde 40 µl 50% DMSO in NaCl *i.p.* verabreicht. Edelfosine, ein PLC $\gamma$  Inhibitor, wurde den Mäusen in einer Dosis von 30 mg/kg KG in 100 µl PBS *i.v.* verabreicht. Kontrollmäusen wurde 100 µl PBS *i.v.* verabreicht. CyclosporinA ist ein Cyclophilin-Inhibitor, und inhibiert auch die mitochondriale Permeabilitätstransition (mPT<sup>32</sup>) (Halestrap, Connern et al. 1997). CyclosporinA wurde den Mäusen in einer Dosis von 75 mg/kg KG in 100 µl Ethanol (15,2%) und Rizinusöl *i.p.* verabreicht. Kontrollmäusen wurde 100 µl Ethanol (15,2%) in Rizinusöl *i.p.* verabreicht. Q-VD-Oph, Edelfosine und CyclosporinA, sowie die Kontrolllösungen wurden den Mäusen jeweils 30 Minuten vor der TNF-Applikation an Tag 2 nach der Infektion verabreicht.

SBI-0206965, ein Inhibitor der Autophagie durch direkte Inhibierung der ULK1 (Egan, Chun et al. 2015), wurde den Mäusen einen Tag vor der Infektion und einen Tag nach der Infektion, was auch einem Tag vor der TNF-Behandlung entspricht, verabreicht. Der Inhibitor wurde den Mäusen jeweils in einer Dosis von 50 mg/kg KG pro Tag in 20 µl DMSO *i.p.* verabreicht (Lu, Zhu et al. 2018). Kontrolltieren wurde sowohl einen Tag vor der Infektion als auch einen Tag nach der Infektion 20 µl DMSO *i.p.* verabreicht.

---

<sup>32</sup> engl.: mitochondrial permeability transition

## 2. Material und Methoden

### 2.2.6 Organentnahme

Für die biochemischen und immunhistochemischen Analysen der Leber wurde den Mäusen zwei Tage nach Infektion bzw. nach den sALT Messungen die Leber entnommen. Dazu wurden die Mäuse mit 2,5% Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation erlöst.

### 2.2.7 Adenovirus-Produktion und Titration

Rekombinante, replikations-defiziente Adenoviren Serotyp 5 der zweiten Generation (Deletion der E1 und E3 Proteine) wurden mit Hilfe der Gateway® Technologie generiert (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurden die Expressionskassetten mit den entsprechenden Transgenen eGFP, CBG99-Luziferase und Cre-Rekombinase unter der Kontrolle entweder des CMV Promotor oder des TTR-Promotor, oder dem HBV 1.3 Überlängenkonstrukt und den entsprechenden Knockouts, oder ohne ein Transgen synthetisiert und in den Gateway® pENTR™ 11 Dual Selection Vector kloniert. Anschließend wurden die pENTR™ 11 Vektoren mit den Expressionskassetten in den pAd/PL-DEST™ Gateway® Vector rekombiniert, in einer *in vitro* Reaktion durch Verwendung des LR Clonase® Enzyme Mix nach dem Protokoll des Herstellers.

### Transfektion und Virusvermehrung

Für die Produktion der rekombinanten, replikations-defizienten Adenoviren wurde zunächst der Vektor pAd/PL-DEST™ mit der entsprechenden Expressionskassette durch einen PacI Verdau linearisiert. Dabei wurden alle Gene für eine Produktion des Vektors in Bakterien entfernt. Das linearisierte Konstrukt wurde dann mit Hilfe von Lipofectamine 2000 in HEK293 Zellen transfiziert. Dazu wurden 3 µg des linearisierten Vektors in 500 µl DMEM Medium verdünnt. Parallel wurden 2,5 µl Lipofectamine 2000 pro 1 µg Plasmid-DNA auch in 500 µl DMEM Medium verdünnt. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Reaktionsmix wurde dann auf die HEK293 Zellen (T25 Flasche, 50% konfluent) mit Transfektionsmedium (DMEM, 3% FCS) aufgetropft. HEK293 Zellen haben das Gen für die E1 Proteine des Adenovirus in ihr Genom integriert und eignen sich dadurch für die Replikation der Adenoviren. Die transfizierten Zellen wurden täglich beobachtet und wenn nötig auf eine größere Zellkulturplatte überführt, bis die Zellen sich aufgrund der Virusproduktion abrundeten und von der Platte ablösten. Die Zellen

## 2. Material und Methoden

wurden vorsichtig vom Plattenboden gelöst durch Anschlagen der Platte. Die Zellen wurden samt dem Medium gesammelt und durch drei Freeze/Thaw-Zyklen aufgebrochen. Dazu wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut. Anschließend wurde der Zell-Debris abzentrifugiert (3360 x g, 10 min, RT) und der Überstand für die Infektion von mehreren Platten HEK293 Zellen verwendet. Der Überstand aus einer T175 Zellkulturflasche wurde auf 20 15cm-Zellkulturplatten mit HEK293 Zellen (80% konfluent, Medium: DMEM, 10% FCS, 1% Glutamin) verteilt. Nach ca. 48 Stunden lösten sich die Zellen ab und wurden vom Boden abgekratzt und gesammelt. Die Zellen wurden pelletiert (840 x g, 5 min, RT) und in 6 ml Viruspuffer resuspendiert. Alle Zellen wurden dabei vereint. Durch erneute drei Freeze/Thaw-Zyklen wurden die Zellen aufgebrochen und der Virus freigesetzt. Der Zelldebris wurde wieder durch Zentrifugation abgetrennt (3360 x g, 10 min, RT).

### Viruskonzentration und Dialyse

Die Viruslösung wurde nun über eine Dichtegradienten-Zentrifugation weiter aufgereinigt und konzentriert. Dazu wurde die Viruslösung auf 8,5 ml mit Viruspuffer aufgefüllt und auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten, bestehend aus 3,5 ml 1.4 CsCl-Lösung und 3,5 ml 1.25 CsCl-Lösung, geschichtet. Es wurden immer zwei Röhrchen gegeneinander austariert bevor die Ultrazentrifuge bestückt wurde. Der Virus wurde dann für 1 Stunde bei 30.000 rpm und 10 °C unter Vakuum zentrifugiert (Bremse und Beschleunigung auf „low“). Das Röhrchen wurde vorsichtig mit einer Kanüle angestochen und die bläulich-weiße Adenovirus-Bande bei ca.  $\frac{1}{3}$  des Röhrchens abgenommen. Für die zweite Ultrazentrifugation wurden 11 ml der 1.34 CsCl-Lösung mit jeweils 5 ml der Viruslösung überschichtet. Dazu wurde die Viruslösung auf 5 ml mit Viruspuffer aufgefüllt. Die zweite Zentrifugation fand bei einer Geschwindigkeit von 30.000 rpm, bei 10 °C und im Vakuum für 18 Stunden statt (Bremse und Beschleunigung auf „low“). Durch die lange Zentrifugation ist ein stufenloser Cäsiumchlorid-Gradient entstanden und der Virus konnte sehr präzise von Verunreinigungen getrennt werden. Die bläulich-weiße Adenovirus-Bande wurde wieder mit einer Kanüle abgenommen. Für die *in vivo* Anwendung wurde nun noch das enthaltene Cäsiumchlorid durch Dialyse entfernt. Dazu wurde die Virus-Lösung in eine Dialysekammer überführt und in 1L Dialysepuffer dialysiert. Der erste Dialyseschritt dauerte 30 Minuten bei 4 °C unter leichtem Rühren. Anschließend wurde der Puffer gewechselt und die Virus-Lösung für 4x 1 Stunde in je 1L



## 2. Material und Methoden

Dialysepuffer dialysiert. Die Adenovirus-Lösung wurde aus der Kammer geholt und für die Lagerung bei -80 °C aliquotiert.

### Hexontitration

Der Virus-Titer wurde durch eine Hexontitration bestimmt. Dazu wurden HEK293 Zellen in poly-Lysin beschichteten 24-well Platten ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/24-well), in DMEM mit 10% FCS und 1% Glutamin. Eine Stunde später wurde der Adenovirus in verschiedenen Verdünnungen zu den Zellen gegeben. Der Adenovirus wurde stufenweise in einer 10-fachen Verdünnungsreihe in DMEM verdünnt und die Verdünnungen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  für die Titration verwendet. Die Verdünnungen wurden alle im Duplikat pipettiert und wiederum im Duplikat auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für ca. 36 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit eiskaltem Methanol für 20 Minuten bei -20 °C fixiert, und 3x mit 1% BSA/PBS gewaschen. Der anti-Hexon Antikörper wurde 1:200 in 1% BSA/PBS verdünnt und die Zellen wurden für 1 Stunde bei RT mit dem Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen. Um die Färbung zu entwickeln wurden die Zellen für 10 Minuten bei RT mit DAB-Lösung verdünnt in DAB-Puffer (Agilent Technologies) inkubiert und wiederum 3x mit PBS gewaschen, um die Färbung zu stoppen. Anschließend wurden die infizierten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt, um die infektiösen Viruspartikel pro ml Lösung (IFU/ml) zu bestimmen.

### 2.2.8 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Leberlysaten und Mitochondriensuspensionen wurde das DC Protein-Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden für die Messungen noch weiter verdünnt (*siehe entsprechendes Experiment*) und je 5 µl in ein Well einer 96well-Platte pipettiert. Dazu wurden dann 25 µl Lösung A und 200 µl Lösung B pipettiert. Nach 20-30 Minuten Inkubation bei RT wurde die Absorption der Lösung bei 750 nm gemessen. Zur absoluten Konzentrationsbestimmung wurde eine BSA Standardreihe mit bekannter Konzentration von 0,25 µg/µl bis 2 µg/µl im jeweiligen Puffer angesetzt und gemessen.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.9 Caspase Assay

Für die Bestimmung der Caspase Aktivität in der Leber, sowohl Caspase 3/7 als auch Caspase 8, wurde ein 2x2x2mm Stück aus der Mitte des linken Leberlappens in 200 µl HEB Puffer homogenisiert. Anschließend wurde der Zelldebris abzentrifugiert (17.000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand für eine Proteinbestimmung 1:20 in HEB Puffer verdünnt (*siehe 2.2.8 Proteinbestimmung*). Die Proben wurden in HEB Puffer jeweils auf eine Konzentration von 40 ng/µl eingestellt. Die Caspase Aktivität wurde mit Hilfe des entsprechenden Lumineszenz-basierten Caspase-Glo® Assay bestimmt, nach dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden das Caspase-Glo® Substrat mit dem Caspase-Glo® Buffer gemischt um das Caspase-Glo® Reagent zu erhalten. 30 µl Caspase-Glo® Reagent wurden dann mit 30 µl Proteinprobe (1,2 µg pro Ansatz) gemischt. Die durch Caspase Aktivität entstehende Lumineszenz wurde in einem Tecan Spark-Plattenphotometer nach 40 Minuten Inkubationszeit gemessen (Integrationszeit 1 s).

### 2.2.10 Leber-Immunhistochemie

Die Histochemie wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie (Technische Universität München) unter der Leitung von Dr. Katja Steiger und mit Hilfe von Anne Jacob durchgeführt. Teile der Mauslebern aus dem linken Leberlappen und dem Lobus caudatus wurden für 48 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert, und anschließend dehydriert. Nach dem Einbetten in Paraffin wurden 2 µm dünne Schnitte angefertigt und für die Färbungen entparaffiniert. Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit einem BondMax Rx<sup>m</sup> durchgeführt und primäre Antikörper für GFP, gespaltene Caspase 3 und HBV core Protein wurden verwendet. Die Antikörperbindung wurde mit Sekundärantikörpern und DAB oder Fast Red angefärbt und die Schnitte mit Hematoxylin gegengefärbt (Kits: Bond Polymer Refine Detection und Bond Polymer Refine Red Detection, Leica Biosystems).

### 2.2.11 Western Blot

Für die Western Blot Analyse wurden 3x3x3mm Stücke Lebergewebe in je 200 µl RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren homogenisiert und lysiert. Um das Gewebe komplett aufzuschließen und die DNA zu fragmentieren, wurden die Proben zusätzlich für 7 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Im Anschluss wurde der Zelldebris abzentrifugiert (17000 x g, 10 min, 4 °C) und die Proteinkonzentration des Überstands

## 2. Material und Methoden

bestimmt (siehe 2.2.8 Proteinbestimmung, 1:20 Verdünnung in RIPA). Die Proteinlösung wurde auf eine Konzentration von 8 µg/µl in RIPA-Puffer eingestellt und mit 2x Proteinauftragspuffer versetzt, wodurch eine finale Konzentration von 4 µg/µl erreicht wurde. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Für die Analyse wurden je 40 µg Protein pro Probe in eine Tasche eines AnykD™ Criterion™ TGX™ Precast Gels pipettiert. Die beiden Gelkammern wurden mit SDS-Laufpuffer befüllt und bei 100 V für 1-2 Stunden, je nach Lauffront und Größe der anzufärbenden Proteine, wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurden Trans-Blot® Turbo™ Midi-PVDF Transfer-Packs verwendet, bei welchen das Gel zwischen die vorgestapelten Filterpapiere und Membran eingebettet wurde. Mit Hilfe des Trans-Blot Turbo™ Systems wurden die Proteine dann bei 25 V und einer maximalen Stromstärke von 2,5 mA in 30 Minuten auf die PVDF-Membran übertragen.

Die Übertragung der Proteine und ein gleichmäßiger Probenauftrag wurden mit einer Ponceau S Färbung überprüft. Dazu wurde die Membran 3x für je 1 Minute in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 1 Minute mit der Ponceau S-Lösung inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit H<sub>2</sub>O für je 1 Minute konnte der Proteinauftrag überprüft werden. Die Membran wurde dann mit 10 % Milchpulver/TBST für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde sie über Nacht mit dem Primärantikörper, verdünnt in 5 % BSA/TBST, bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen der Membran mit TBST für je 10 Minuten wurde sie mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt in 10 % Milchpulver/TBST, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten wurde die Membran gleichmäßig mit dem Detektionsreagenz SignalFire ECL oder ECL Select (hochsensitiv) benetzt und kurz inkubiert bevor die entstehende Lumineszenz mit einem CCD-basierten Imaging-System (ChemiDoc™ XRS) detektiert wurde. Die Lumineszenz wurde je nach Signalstärke über einen Zeitraum von nur 2 Sekunden bis zu 10 Minuten aufgenommen. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit der Image Lab Software.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.12 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR<sup>33</sup>)

#### 2.2.12.1 DNA Isolation

Für die DNA Isolation aus dem Lebergewebe wurde ein 2x2x2mm Stück aus der Mitte des linken Leberlappens geschnitten. Alternativ wurde auch DNA aus murinem Blut-Plasma isoliert. Dazu wurden 200 µl Blutplasma benötigt, oder, wenn weniger Plasma vorhanden war, das vorhandene Blut-Plasma auf 200 µl mit PBS aufgefüllt. Die DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kits (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

#### 2.2.12.2 RNA Isolation

Für die RNA Isolation wurde ein 1x1x1mm Stück aus der Mitte des linken Leberlappens geschnitten. Die RNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Kits (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

#### 2.2.12.3 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline Reagents) nach dem Protokoll des Herstellers in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei wurden 1 µg isolierte RNA in einem 20 µl Reaktionsansatz durch Zugabe des 5x TransAmp Buffers und reverser Transkriptase bei 42 °C umgeschrieben.

#### 2.2.12.4 qPCR

Die qPCR Reaktionen wurden mit Hilfe des Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue Kits (Eurogentec) nach dem Protokoll des Herstellers im 384well-Format in einem Lightcycler® 480 Instrument durchgeführt. Von der isolierten DNA wurden pro Reaktion 50 ng DNA eingesetzt, und eine Standardreihe wurde zur absoluten Bestimmung der adenoviralen Genomkopien in der Leber pipettiert ( $10^{10}$  –  $10^2$  Kopien pAdTrack pro Reaktionsansatz). Das pAdTrack-Plasmid enthält Sequenzen des Adenovirus-Genoms, von HBV 1.3 und eGFP, und kann somit als Standard für die Quantifizierung der verschiedensten Infektionen verwendet werden. Die

---

<sup>33</sup> engl.: quantitative polymerase chain reaction

## 2. Material und Methoden

Konzentration des pAdTrack Stock ist in Kopien/ml angegeben. Von der umgeschriebenen cDNA wurden jeweils 2 µl des Transkriptionsansatzes pro Reaktion eingesetzt. Für jede Probe wurde auch GAPDH quantifiziert, um die Menge der Ziel-mRNA in der Leber relativ zur Menge an GAPDH mRNA quantifizieren zu können. Um die Mengen von verschiedenen mRNAs in der Leber miteinander zu vergleichen wurde die Effizienz aller Primerpaare anhand einer 10x Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  –  $10^{-4}$ ) einer jeweiligen Positivkontrolle mitgemessen. Die Effizienz der Amplifikation mit den verschiedenen Primerpaaren wurde dann in die Auswertung mit einbezogen.

### Reaktionsansatz:

Takyon™ 2x MasterMix	5 µl
Primer forward (5 µM)	1 µl
Primer reverse (5 µM)	1 µl
DNA/cDNA	50 ng/2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Neben der Amplifikation der DNA wurde auch der Verlauf der Schmelzkurve untersucht, um die Qualität der qPCR zu überprüfen.

### qPCR-Programm für Quantifizierung der adenoviralen Genomkopien:

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

## 2. Material und Methoden

### qPCR-Programm für relative mRNA-Quantifizierung

Programm	Temperatur	Temperatur-Steigerung	Zeit	
Denaturierung	95 °C	4,8 °C/s	10 min	
Amplifikation	95 °C	4,4 °C/s	15 s	} x 45
	60 °C	2,2 °C/s	30 s	
	72 °C	4,8 °C/s	15 s	
Schmelzkurve	95 °C	4,8 °C/s	2 s	
	65 °C	2,5 °C/s	1 min	
	95 °C	0,11 °C/s		

Die Auswertung (absolute bzw. relative Quantifizierung) erfolgte mit Hilfe der Lightcycler® 480 Software.

#### 2.2.13 Isolation von Mitochondrien aus Mauslebern

Für die Isolation der Mitochondrien aus Mauslebern wurde den Mäusen ca. 10 Minuten vor der Isolation Heparin *i.p.* verabreicht (150 µl einer 2000 U/ml Lösung in 0,9 % NaCl), um einer Blutgerinnung nach dem Tod vorzubeugen. Nach dem Erlösen der Mäuse (zervikale Dislokation unter Isofluran-Narkose) wurde der Bauchraum der Mäuse eröffnet und die Leber über die Portalvene mit 3-5 ml einer Heparinlösung (20 U/ml in PBS) perfundiert. Anschließend wurde die Leber entnommen und die Gallenblase entfernt. Die Leber wurde einmal mit dem Puffer IB gespült und dann in 1-2 ml IB++ mit der Schere in ca. 1-2 mm Würfel geschnitten. Die Leberfragmente wurden in 12 ml IB++ resuspendiert und in einen Potter-Elvehjem-Homogenisator überführt, wo diese dann mit drei Stößen bei 800 rpm homogenisiert wurden. Die großen Zellbestandteile und Kerne wurden bei 600 x g, 10 min, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand für die weitere Aufreinigung in ein frisches Gefäß überführt. Die Mitochondrien wurden nun bei 4000 x g, 10 min, 4 °C pelletiert und in 1 ml des Puffers IP wieder resuspendiert. Die Mitochondrien-Suspension wurde zur weiteren Aufreinigung auf einen dreistufigen Percoll-Gradienten geschichtet (18%, 30% und 60% Percoll in IPP) und bei 9000 x g, 10 min, 4 °C (bei niedriger Beschleunigung und Bremse) zentrifugiert. Die Mitochondrien-Schicht (zwischen der 30% und 60% Percoll-Schicht) wurde abgenommen und zweimal mit IP-Puffer gewaschen (9000 x g, 10 min, 4 °C). Dabei war darauf zu achten, dass das Mitochondrien-Pellet vorsichtig mit einem Glasstab vom Röhrchen-Rand gelöst wurde und das Pellet auch nur durch sehr vorsichtiges Pipettieren resuspendiert wurde. Das Mitochondrien-Pellet wurde in 25 µl Puffer IP aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Mitochondrien

## 2. Material und Methoden

wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert, mussten aber innerhalb von 4 Stunden für funktionale Analysen verwendet werden. Um die Mitochondrien für die einzelnen Experimente in vergleichbaren Mengen einsetzen zu können wurde die Konzentration an mitochondrialem Protein/ $\mu\text{l}$  bestimmt (siehe 2.2.8 *Proteinbestimmung*). Dazu wurden die Proben 1:100 verdünnt.

### 2.2.14 Mitochondrienanalyse

Die isolierten Mitochondrien aus der Leber von Mäusen wurden für verschiedenste Experimente eingesetzt.

#### 2.2.14.1 Lipidanalyse

Zur Analyse der Lipidzusammensetzung der Mitochondrien wurden zunächst die Lipide aus der Suspension von isolierten Mitochondrien mittels MTBE Extraktion isoliert (Witting, Maier et al. 2014). Dazu wurden 3,5 mg mitochondriales Protein in 50  $\mu\text{l}$  IP Puffer aufgenommen. 200  $\mu\text{l}$  eiskaltes Methanol wurde zu den Proben gegeben und die Proben durch vortexen gemischt. Nach 15 Minuten im Ultraschall-Eisbad wurden 400  $\mu\text{l}$  MTBE zugegeben, die Proben wieder durch vortexen gemischt und nochmal für 30 Minuten in das Ultraschall-Eisbad gegeben. Anschließend wurden noch 300  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O zugegeben und die Proben wieder 15 Minuten im Ultraschall-Eisbad behandelt. Nach Zentrifugation der Proben bei 14.000 rpm, 15 min, 4 °C wurde die organische, Lipid-enthaltende Phase (obere Phase) in ein frisches Gefäß überführt. Die verbleibenden Lipide in der unteren, wässrigen Phase wurden erneut mit 400  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert (15 min Ultraschall-Eisbad, Zentrifugation) und beide organischen Phasen vereint. Das organische Lösungsmittel wurde in einer Vakuumzentrifuge verdampft und die Lipide bei -80 °C gelagert.

Die weiteren Messungen und Analysen wurden von Frau Dr. Constanze Müller in der Forschungseinheit Analytische BioGeoChemie durchgeführt (Helmholtz-Zentrum München, Neuherberg). Die Lipide wurden in 200  $\mu\text{l}$  Isopropanol/Methanol (1:1) wieder gelöst. Davon wurden 15  $\mu\text{l}$  für die Analyse eingesetzt. Die Lipidom-Analyse wurde mit Hilfe eines Bruker maXis QToF hochauflösenden Massenspektrometers gekoppelt an eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC-MS<sup>34</sup>) durchgeführt (Witting, Maier et al. 2014). Dazu wurden die Lipide über eine UPLC

---

<sup>34</sup> engl.: ultra-performance liquid chromatography – mass spectrometry

## 2. Material und Methoden

Säule (UPLC C18 CORTECS – 2.1 x 150 mm, 1,6 µm) weiter aufgereinigt, indem die rekonstituierten Lipide graduell von der Säule eluiert wurden. Für die Elution wurde Eluent A2 verwendet, welcher mit einer Geschwindigkeit von 0,25 ml/min durch die Säule gepumpt wurde. Eluent A2 wurde zunächst in einer Konzentration von 68% für 1,5 min injiziert und anschließend auf 3% verringert, die dann für 4 min in der Plateauphase gehalten wurden. Das Massenspektrometer (MS) wurde vor jeder Analyse mit ESI Tune Mix kalibriert. Die Parameter des QToF Instruments wurden anhand der besten Auflösung und Messgenauigkeit im Massenbereich von 500-900 Da eingestellt. Die MS-Analyse wechselte zwischen MS und daten-abhängig Tandem-MS mit Hilfe des dynamischen Ausschlusses<sup>35</sup>. Der detektierte Massenbereich variierte leicht zwischen den einzelnen Methoden, deckte aber einen Bereich von 70-1000 m/z ab. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der Genedata Software gefiltert, die Signale identifiziert und die Qualität kontrolliert. Über den MassTRIX Web-Server wurden die m/z Signale mit einem maximalen Fehler von 0,005 Da annotiert. Die Tandem-MS Daten wurden weiter annotiert mit Hilfe der MoNA Bibliothek (MSPepSearch), um den gemessenen Massen bekannte Lipide zuzuordnen. Darüber hinaus wurden die Retentionszeiten verwendet, um die m/z Signale in die richtigen Lipidklassen zu gruppieren. Für die Benennung der Lipidklassen wurde die LIPID Maps Nomenklatur (lipidmaps.org) verwendet.

### 2.2.14.2 Membranfluidität/Fluoreszenz-Polarisation

Die Messung der Membranfluidität wurde von Frau Laura Sperl (Bayerisches NMR Zentrum am Department für Chemie, Technische Universität München) durchgeführt. Für die Messung der Membranfluidität wurde 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) verwendet, dessen Fluoreszenz-Polarisation direkt mit der Membranfluidität korreliert (Fox and Delohery 1987). Für die Messung der Fluoreszenz-Polarisation wurde das Jasco Fluoreszenz-Spektrometer FP-8300 verwendet. Die isolierten Mitochondrien wurden auf eine Konzentration von 0,38 mg/ml in Swelling-Puffer verdünnt und mit 10 µM DPH für 25 min bei 25 °C inkubiert. Die Fluoreszenzpolarisation von DPH in der mitochondrialen Membran wurde bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und der Emission bei 430 nm, mit einer Messzeit von 2 Sekunden und einer Bandbreite von 5 nm, gemessen. Während der Messung wurde die Mitochondrien-Suspension schrittweise erhitzt, mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min.

---

<sup>35</sup> engl.: dynamic exclusion



## 2. Material und Methoden

### 2.2.14.3 Messung der oxidativen Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung von isolierten Mitochondrien wurde mit Hilfe eines Flux-Analysators gemessen (Seahorse XF<sup>96</sup> Extracellular Flux Analyzer). Dazu mussten die Messfluorophore über Nacht in XF Calibrant bei 37 °C inkubiert werden. Die Mitochondrien wurden für die Messung zunächst auf eine Konzentration von 75 ng/µl in MAS Puffer (entweder mit 10 mM Succinat/8 µM Rotenon oder mit 5 mM Pyruvat/2,5 mM Malat) eingestellt und pro 96well 1,5 µg Mitochondrien (20 µl) pipettiert. Die Mitochondrien wurden in der Platte runter zentrifugiert (20 min, 2000 x g, 4 °C), sodass diese am Plattenboden sitzen und während der Messung nicht wieder resuspendiert werden konnten. Direkt vor der Messung wurden 160 µl MAS Puffer vorsichtig zu den Mitochondrien pipettiert und die Port-Platte mit den Fluorophoren aufgesetzt. Die vier Ports der Platte waren mit ADP (PortA), Oligomycin (PortB), CCCP (PortC) und AntimycinA (PortD) gefüllt (jeweils in MAS Puffer verdünnt), was in ebendieser Reihenfolge in die Wells injiziert wurde. Alternativ dazu konnte in PortA auch direkt CCCP pipettiert werden, um direkt die maximale Respiration zu messen. Dieser Wert wurde bei den Analysen als CCCP-Wert verwendet. Bei Messungen in welchen die Respiration nach ADP-Gabe über die Zeit verfolgt wurde, wurde nur über PortA ADP injiziert, über die restlichen Ports dann nur noch MAS Puffer. Nach jeder Injektion wurde die Respiration in 3 Zyklen gemessen, welche immer durch eine Misch-Phase unterbrochen waren, in welchen die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer wieder regeneriert wurde. Die Messung wurde bei 37 °C durchgeführt.

Finale Konzentration der eingesetzten Inhibitoren und ADP in der Platte: 3 mM ADP, 2,5 µM Oligomycin, 4 µM CCCP, 4 µM AntimycinA.

## 2. Material und Methoden

### Messprotokoll:

Aktion	Zeit [min]	Wiederholungen
Kalibrieren		
Warten	3,00	
Mischen	1,75	3
Messen	3,00	
Injektion PortA		
Mischen	2,00	2
Messen	2,00	
Injektion PortB		
Mischen	2,00	2
Messen	2,00	
Injektion PortC		
Mischen	2,00	2
Messen	2,00	
Injektion PortD		
Mischen	2,00	2
Messen	2,00	

#### 2.2.14.4 Protonen-Leck Messung

Die Messung des Protonen-Lecks von isolierten Mitochondrien wurde mit einem Oroboros O2k bestimmt. Das Oroboros O2k basiert auf einer Clark-Elektrode zur Messung der Sauerstoffkonzentration. Für die Bestimmung des Protonen-Lecks wurde der Sauerstoffverbrauch, gemessen als Sauerstoff-Fluss ( $O_2$  flux), zu bestimmten Membranpotential-Werten gemessen. Dadurch war die Leistung bzw. der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien, um ein bestimmtes Membranpotential aufrecht zu erhalten, messbar, was direkt abhängig ist von der Rückflussrate der Protonen ohne ATP-Produktion (Protonen-Leck). Für diese Messung wurde zunächst der KHE Puffer mit  $5 \mu\text{M}$  Rotenon,  $2,5 \mu\text{M}$  Oligomycin und  $0,1 \mu\text{M}$  Nigericin in den Messkammern vorgelegt. Für die Messung des Membranpotentials wurde zusätzlich eine Tetraphenylphosphonium-Kation ( $\text{TPP}^+$ ) Elektrode verwendet, welche die  $\text{TPP}^+$  Konzentration im Medium misst, was der gesamten, zugegebenen  $\text{TPP}^+$  Menge entspricht abzüglich des  $\text{TPP}^+$ s was abhängig vom Membranpotential in die Mitochondrien eingelagert wird. Vor der Messung musste zunächst das  $\text{TPP}^+$  in den Puffer titriert werden um die gemessenen Werte mit einer definierten  $\text{TPP}^+$ -

## 2. Material und Methoden

Konzentration assoziieren zu können. Dazu wurde TPP<sup>+</sup> in den Konzentrationen 1 µM, 1,5 µM, 2 µM, 2,5 µM und 3 µM zugegeben. Im Anschluss daran wurden 200 µg Mitochondrien zu jeder Kammer (Kammervolumen 2 ml) gegeben. Nach einer Equilibrierungsphase wurden 5 mM Succinat als Substrat zugegeben.

Um den Sauerstoffverbrauch bei verschiedenen Membranpotentialen zu messen, wurde mit Malonat schrittweise die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase inhibiert und dadurch auch die Komplex II vermittelte Aufnahme von Elektronen in die Elektronentransportkette (Thorn 1953, Serviddio and Sastre 2010). Dadurch reduzieren sich die Aktivität der Elektronentransportkette und der Sauerstoffverbrauch. Gleichzeitig sinkt auch das mitochondriale Membranpotential auf einen Wert, der durch den verbleibenden Sauerstoffverbrauch aufrechterhalten werden kann. Das Malonat wurde schrittweise zu titriert bis eine equimolare Menge zu Succinat erreicht war (5 mM). Anschließend wurde der Endpunkt durch die Zugabe von CCCP bestimmt, einem Entkoppler der zum kompletten Verlust des Membranpotentials führte. Zwischen den einzelnen Zugaben musste immer darauf geachtet werden, dass der Sauerstoffverbrauch eine konstante Phase erreicht hat bevor die nächste Injektion erfolgen konnte. Außerdem musste darauf geachtet werden, dass dem System rechtzeitig wieder Sauerstoff zugeführt wurde, bevor die Konzentration unter 25 nmol/ml gefallen war, um eine Schädigung der Mitochondrien durch Sauerstoffmangel und eine folgende Veränderung der Kinetik des Sauerstoffverbrauchs zu vermeiden.

### 2.2.14.5 ATP Assay

Die Produktivität der Mitochondrien kann auch über eine Quantifizierung der ATP Produktion von isolierten Mitochondrien bestimmt werden. Dazu wurden 200 µg mitochondriales Protein in 500 µl Swelling-Puffer verdünnt und mit 160 µM ADP für 0, 15 und 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt und vor der ATP Bestimmung für 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurde der Zelldebris bei 17000 x g für 2 Minuten abzentrifugiert. Die ATP Konzentration wurde mit Hilfe des Lumineszenz-basierten ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Probe mit 50 µl des Luziferase-Reagenz in einer weiß-wandigen 96well-Platte gemischt und die Lumineszenz in einem Tecan Spark-Plattenphotometer bestimmt (Integrationszeit: 1 s). Die Bestimmung der absoluten Konzentration wurde durch die Messung verschiedener, bekannter ATP-Konzentration (ATP-Standardreihe: 10<sup>-5</sup> M,

## 2. Material und Methoden

$10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M) und das Erstellen einer Standardkurve ermöglicht.

### 2.2.14.6 $\text{Ca}^{2+}$ Sensitivität von Mitochondrien

Um die Sensitivität der Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  zu bestimmen, wurde der Verlust der mitochondrialen Integrität und des Membranpotentials nach  $\text{Ca}^{2+}$  Behandlung gemessen. Dazu wurden Mitochondrien in Swelling-Puffer auf eine Konzentration von  $0,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt und je  $200 \mu\text{l}$  dieser Suspension in ein Well einer schwarz-wandigen 96well-Platte mit transparentem Boden pipettiert. Durch Zugabe von  $125 \text{ nM}$  Rhodamin123 (Rh123) wurde das Membranpotential messbar, da Rh123 abhängig vom mitochondrialen Membranpotential in die Mitochondrien aufgenommen wird und nur das verbleibende Rh123 im Überstand gemessen werden konnte. Um den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die genannten Parameter zu prüfen, wurden je  $100 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  zu den Mitochondrien gegeben. Im Anschluss wurde die Absorption der Suspension bei  $540 \text{ nm}$  gemessen, wobei der Verlust der mitochondrialen Integrität durch eine Abnahme der Absorption detektiert wurde. Parallel wurde auch die Rh123 Fluoreszenz-Emission gemessen (Anregung  $490 \text{ nm}$ , Emission  $535 \text{ nm}$ , Bandbreite je  $20 \text{ nm}$ ), welche bei einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials anstieg. Die Messung wurde mit einem Tecan Spark-Plattenphotometer bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt, und die Werte wurden alle 2 Minuten über einen Zeitraum von mindestens 80 Minuten gemessen. Darüber hinaus wurden Mitochondrien auch mit  $5 \mu\text{M}$  Cyclosporin A behandelt, was die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Cyclophilin D unterbindet und somit die mitochondriale Permeabilitätstransition inhibiert (Halestrap, Connern et al. 1997). Dadurch wurde sowohl die mitochondriale Integrität geschützt, als auch der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials inhibiert.

### 2.2.15 Messung der Plasma-HBsAg und -HBeAg Werte

Zur Bestimmung der Serumparameter für eine HBV Infektion, HBsAg und HBeAg, wurde den Mäusen 2 Tage nach Infektion mit Ad-HBV 1.3 Blut aus der Vena facialis entnommen. Durch die Zentrifugation bei  $10000 \times g$  für 5 Minuten in einem Blutentnahme-Röhrchen mit Gel, konnte das Blutplasma von den Blutzellen getrennt werden. Das Blutplasma wurde dann 1:30-1:50 in PBS verdünnt und für die Bestimmung an die Diagnostik des Instituts für Virologie am Klinikum rechts der Isar übergeben. Dort wurde dann mit dem ARCHITECT HBsAg Kit und dem ARCHITECT

## 2. Material und Methoden

HBeAg Kit im ARCHITECT i System jeweils die Mengen an HBsAg und HBeAg im Blut quantifiziert. Die Bestimmung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.16 mRNA-Sequenzierung (Illumina)

Für die Analyse des Transkriptoms wurde zunächst die Gesamt-mRNA aus den Lebern von Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 und Ad-ctrl infizierten Mäusen isoliert (*siehe 2.2.12.2 RNA Isolation*). Die gesamte weitere Probenvorbereitung und Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Rupert Öllinger (2. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München) durchgeführt, die gesamte bioinformatische Auswertung wurde von Herrn Dr. Sainitin Donakonda (Institut für Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar, München) vorgenommen. Die Bibliotheken-Vorbereitung für die 3'-Sequenzierung der gesamten poly(A)-RNA wurde wie bereits von Macosko et. al beschrieben, durchgeführt (Macosko, Basu et al. 2015). Für die Umschreibung der Gesamt-poly(A)-RNA in cDNA und die Anbindung eines Barcodes wurde die Maxima RT Polymerase verwendet, sowie Oligo-dT-Primer mit Barcodes, spezifische molekulare Erkennungsmarker (UMIs<sup>36</sup>) und ein Adapter. Die 5'-Enden der cDNAs wurden durch *template-switch* Oligonukleotide (TSOs) verlängert und nach dem Vereinen aller Proben (je 4x Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3, Ad-ctrl) wurden alle cDNAs gemeinsam amplifiziert mit Hilfe von Primern passend zu der TSO-Sequenz und dem Adapter. Mit dem Nextera XT Kit wurde die cDNA fragmentiert und mit Markern versehen. Letztendlich wurden die 3'-Fragmente mit Hilfe von Primern mit dem Illumina P5 und P7 Überhang amplifiziert. Für eine bessere Cluster-Erkennung wurden die P5 und P7 Sequenzen ausgetauscht, um die Sequenzierung der cDNA in Read1 und der Barcodes und UMIs in Read2 zu ermöglichen, abweichend von Parekh et. al (Parekh, Ziegenhain et al. 2016). Die Sequenzierung wurde durch einen NextSeq 500 (Illumina) vorgenommen, mit 75 Zyklen für die cDNA in Read1 und mit 17 Zyklen für die Barcodes und UMIs in Read2. Zur Erstellung von Proben- und Gen-sortierten UMI-Tabellen wurden die Daten mit Hilfe 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 vorgenommen. Die Anzahl der detektierten Transkripte wurde normiert und die statistisch signifikanten unterschiedlich exprimierten Gene (DEGs<sup>37</sup>) (1,5-fache Änderung, padj <0,05) zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mit Hilfe von R identifiziert (DESeq2 R Paket) (Love,

---

<sup>36</sup> engl.: unique molecular identifiers

<sup>37</sup> engl.: differentially expressed genes

## 2. Material und Methoden

Huber et al. 2014). Die Hauptkomponentenanalyse (PCA<sup>38</sup>) wurde mit Hilfe der „plotPCA“-Funktion des DESeq2 R Pakets durchgeführt. Der euklidische Abstand zwischen den Proben wurde mit Hilfe 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. Das Venn-Diagramm wurde mit Hilfe des Online-Tools von Bioinformatics & Evolutionary Genomics aus den Vergleichen von Ad-CMV-GL zu Ad-HBV 1.3, Ad-CMV-GL zu Ad-ctrl und Ad-HBV 1.3 zu Ad-ctrl erstellt (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Die Daten sind bei GEO unter der Nummer GSE131335 gespeichert. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE131335>).

### 2.2.17 Messung der GFP-Fluoreszenzintensität

Für die Quantifizierung der GFP-Fluoreszenzintensität im murinen Lebergewebe wurden 3x3x3mm große Leberstücke in 200 µl HEB Puffer homogenisiert. Anschließend wurde der Zelldebris abzentrifugiert (17000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand für eine Proteinbestimmung 1:20 in HEB Puffer verdünnt (*siehe 2.2.8 Proteinbestimmung*). Die Proben wurden in HEB Puffer auf eine Konzentration von 5 µg Protein/µl eingestellt. Für die Fluoreszenzmessung wurden je 100 µl des verdünnten Homogenisats in eine schwarz-wandige 96well-Platte pipettiert, sowie 100 µl HEB als Kontrolle. Die Fluoreszenzintensität wurde dann in einem Tecan Spark-Plattenphotometer gemessen (Anregung 470 nm, Emission 520 nm, Bandbreite je 20 nm).

### 2.2.18 Statistik

Der Student's T-Test wurde mit der GraphPad Prism Software berechnet. Die statistische Signifikanz wurde ab  $p < 0,05$  definiert und wie folgt markiert: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Alle Ergebnisse sind als Mittelwert (Mean) mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Für die Analyse der RNA-Sequenzierung wurde die statistische Signifikanz für die DEGs auf  $\text{padj} < 0,05$  festgelegt. Für die Lipidom-Analyse wurde die PCA mit simcaP durchgeführt, nach einer Einheit-Varianz-Skalierung<sup>39</sup> und dem Zentrieren der Daten um den Mittelwert.

---

<sup>38</sup> engl.: principal component analysis

<sup>39</sup> engl.: unit variance scaling

## 2. Material und Methoden

Jedes detektierte Lipid wurde auf einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen getestet, durch Anwendung des zweiseitigen, nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney Test.

### 3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gibt neue Einblicke in den Mechanismus der nicht-kanonischen CD8 T Zell Effektorfunktion. Sowohl der TNF-induzierte Zelltod-Signalweg, als auch die zugrundeliegende Sensibilisierung der Hepatozyten nach einer Virus-Infektion werden beleuchtet. Für diese Untersuchungen wird ein *in vivo* Mausmodell verwendet, zusammen mit einem Adenovirus-Modellsystem für eine hepatische Infektion. Der TNF-vermittelte Zelltod der infizierten Hepatozyten, auf welchem die nicht-kanonische CD8 T Zell Effektorfunktion basiert (Wohlleber, Kashkar et al. 2012), wird bereits zwei Tage nach der Infektion mit dem Adenovirus durch die Applikation von TNF untersucht. Dadurch wird gewährleistet, dass ausschließlich die Zelltod-Induktion über TNF untersucht wird, ohne dass diese von der adaptiven Immunantwort, welche frühestens an Tag 4 einsetzt, überdeckt oder beeinflusst werden kann.

#### 3.1 TNF-vermittelte Apoptose in virus-infizierten Hepatozyten

Die Induktion des Zelltods in Adenovirus-infizierten Hepatozyten ist abhängig von der Stimulation des TNFR I. Allerdings kann nach TNFR I Stimulation sowohl Apoptose, als auch Nekroptose induziert werden (Laster, Wood et al. 1988, Vanlangenakker, Vanden Berghe et al. 2012).

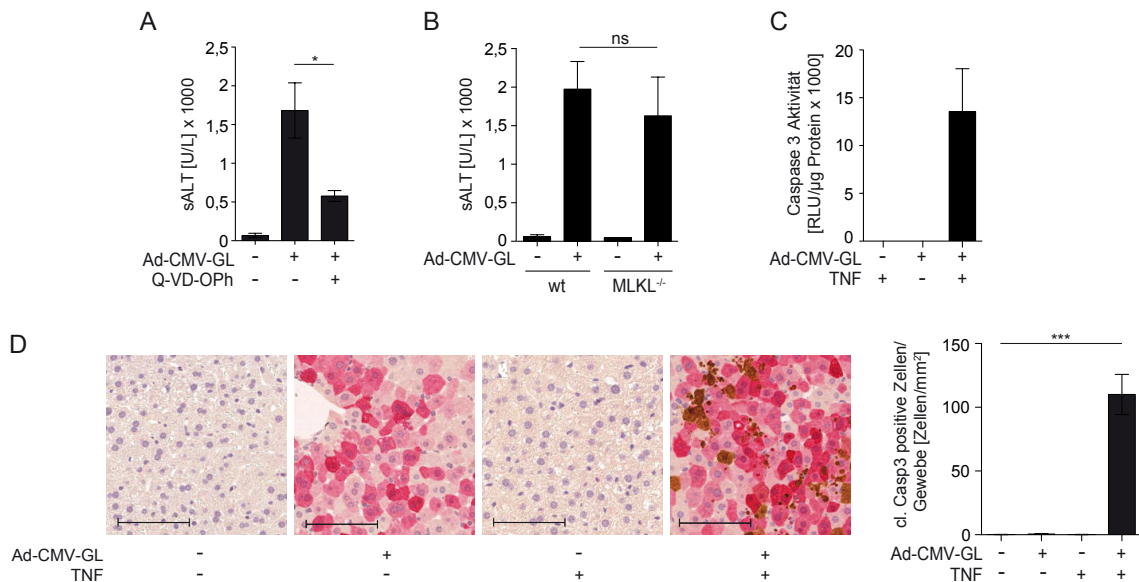
##### 3.1.1 TNF induziert Apoptose in infizierten Hepatozyten ohne Beteiligung von Nekroptose

Klassische Apoptose zeichnet sich durch die Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9, sowie der Effektor-Caspase 3 aus. Ist die Aktivierung von Caspasen allerdings trotz pro-apoptotischen Signalen durch intrazelluläre Inhibitoren unterdrückt, so kann alternativ auch Nekroptose stattfinden (Walsh 2014). Nekroptose ist abhängig von der Phosphorylierung des Proteins MLKL durch die Kinase RIPK3 und beschreibt eine gesteuerte aber entzündungsfördernde Nekrose (Sun, Wang et al. 2012), wohingegen Apoptose ein Zelltod ohne folgende Entzündung darstellt. Die Abhängigkeit des TNF-vermittelten Zelltods in virus-infizierten Hepatozyten von Caspasen kann mittels eines Pan-Caspasen-Inhibitors untersucht werden. Dazu wurden Mäuse mit Ad-CMV-



### 3. Ergebnisse

GL infiziert und vor der Verabreichung von TNF mit dem Pan-Caspasen-Inhibitor Q-VD-OPh behandelt. Tatsächlich wurde dadurch der TNF-induzierte Anstieg des Alaninaminotransferase Levels im Serum (sALT), als Marker für einen Leberschaden, signifikant verringert (**Abbildung 1A**). Eine mögliche Beteiligung von Nekroptose am TNF-induzierten Zelltod von virus-infizierten Hepatozyten wurde mit Hilfe von MLKL<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht, bei welchen aufgrund des fehlenden Proteins MLKL keine Nekroptose induziert werden kann (Wu, Huang et al. 2013). Allerdings zeigen sowohl Wildtyp als auch MLKL<sup>-/-</sup> Mäuse nach Ad-CMV-GL Infektion und TNF-Behandlung einen vergleichbaren Anstieg in den sALT-Werten (**Abbildung 1B**), was eine Beteiligung von Nekroptose am TNF-induzierten Zelltod in Adenovirus-infizierten Mäusen ausschließt.



**Abbildung 1:** TNF-vermittelte Apoptose in Adenovirus-infizierten Hepatozyten

(A-D) Mäuse wurden mit Ad-CMV-GL infiziert ( $5 \times 10^8$  IFU/Maus, *i.v.*) und 2 Tage nach Infektion mit TNF behandelt (400 ng/Maus, *i.v.*); (A) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation mit Q-VD-OPh Behandlung der Mäuse 30 Minuten vor TNF-Applikation; (B) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation von C57BL/6 Mäusen (wt) und MLKL<sup>-/-</sup> Mäusen; (C) Caspase 3 Aktivitäts-Assay aus dem Lebergewebe 1 Stunde nach TNF-Applikation; der Null-Wert entspricht der Caspasen-Aktivität nach Q-VD-OPh Behandlung; (D) Immunhistochemische Färbung der Infektion (GFP – rot) und der gespaltenen Caspase 3 (cl. Casp3 – braun) in Leberschnitten 1 Stunde nach TNF-Applikation, und die Quantifizierung der gespaltenen Caspase 3 positiven Zellen im Lebergewebe, aus 15 Bildausschnitten (Gewebebläche pro Ausschnitt durchschnittlich 1,21 mm<sup>2</sup>) für Ad-CMV-GL+TNF, je 6 Bildausschnitte für restliche Gruppen; Skala 100 µm; Färbung wurde am Institut für Pathologie durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus  $n \geq 3$  unabhängigen Experimenten;  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### 3. Ergebnisse

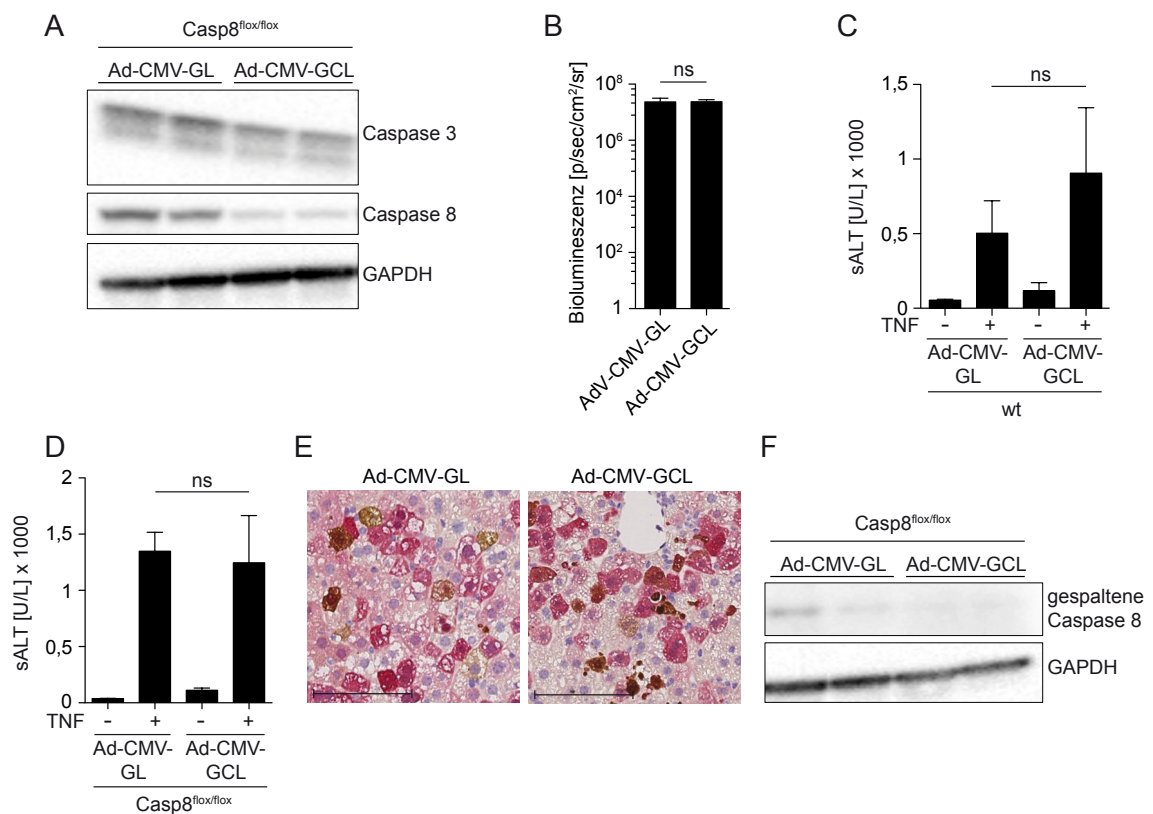
Die Abhängigkeit des Zelltods in infizierten Hepatozyten von der Caspasen Aktivierung konnte darüber hinaus durch die TNF-induzierte Aktivierung der Caspase 3 spezifisch in Ad-CMV-GL infizierten Mäusen, mittels Caspase 3-Aktivitäts-Messung im Lebergewebe, gezeigt werden (**Abbildung 1C**). Des Weiteren wurde auch die Spaltung der Caspase 3, was der Aktivierung entspricht, in Leberschnitten durch Färbung der gespaltenen Caspase 3 nachgewiesen. Gespaltene Caspase 3 konnte fast ausschließlich nur in den Lebern von Ad-CMV-GL infizierten und TNF-behandelten Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 1D**). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Zelltod von infizierten Hepatozyten nach Stimulation von TNFR I durch TNF um Apoptose handelt.

#### 3.1.2 TNF-vermittelte Apoptose unabhängig von Caspase 8 Aktivierung

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung der Initiator Caspase 8 erst 30 Minuten nach TNF Behandlung beobachtet wird. Diese findet somit deutlich später statt, als beispielsweise die parallel ablaufende RelA Translokation in den Nukleus im Zuge des aktivierten NF $\kappa$ B Signalwegs, welche bereits nach 5 Minuten sichtbar ist. Darüber hinaus konnte auch kein zeitlicher Unterschied in der Aktivierung der Initiator Caspase 8 und der Effektor Caspase 3 beobachtet werden, was in der klassischen Caspasen Kaskade der Fall sein müsste (Janas 2015). Dadurch stellte sich die Frage, ob die Aktivierung der Apoptose in Adenovirus-infizierten Zellen überhaupt von Caspase 8 abhängig ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Mäuse generiert, bei welchen das Gen für die Caspase 8 von zwei Flox-Sequenzen flankiert ist (Casp8<sup>flox/flox</sup>). Durch die Expression von Cre-Rekombinase kann dann das Gen für Caspase 8 eliminiert werden und ein Caspase 8 Knock-out entsteht. Die Casp8<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden mit einem Adenovirus infiziert, welcher neben den Marker-Proteinen eGFP und Luziferase auch für die Cre-Rekombinase kodiert (Ad-CMV-GCL). Somit wurde spezifisch in den Ad-CMV-GCL infizierten Hepatozyten das Gen für die Caspase 8 eliminiert. Der Erfolg der Eliminierung von Caspase 8 wurde auf Proteinebene untersucht und zeigte sich in einer deutlichen Reduktion des Proteins in der gesamten Leber, obwohl Caspase 8 nur in den infizierten Hepatozyten durch die Cre-Rekombinase eliminiert werden konnte (**Abbildung 2A**). Darüber hinaus scheint das zusätzliche Gen für die Cre-Rekombinase generell keinen Einfluss auf die Proteinexpression oder die Virus-induzierte Sensibilisierung der Zellen gegenüber TNF zu haben. Zum einen war die gemessene Biolumineszenz in Mäusen, infiziert mit Ad-CMV-GL und Ad-CMV-GCL, vergleichbar (**Abbildung 2B**), was auch auf eine vergleichbare Infektionseffizienz beider Viren hindeutet. Des Weiteren konnte in

### 3. Ergebnisse

Wildtyp Mäusen, infiziert mit Ad-CMV-GL oder Ad-CMV-GCL, ein vergleichbarer Anstieg in den sALT-Werten nach TNF Behandlung gemessen werden (**Abbildung 2C**). Überraschenderweise konnte auch bei den Casp8<sup>flox/flox</sup> Mäusen kein Unterschied festgestellt werden. Sowohl eine Infektion mit Ad-CMV-GL als auch eine Infektion mit Ad-CMV-GCL führte zu einem vergleichbaren Anstieg in den sALT-Werten nach TNF-Behandlung (**Abbildung 2D**). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass trotz der fehlenden Caspase 8 nach Infektion mit Ad-CMV-GCL bei Casp8<sup>flox/flox</sup> Mäusen eine Spaltung der Effektor Caspase 3 in infizierten Hepatozyten nach TNF Behandlung stattfand (**Abbildung 2E**). Wohingegen keine gespaltene Caspase 8 nach TNF Behandlung der Casp8<sup>flox/flox</sup> Mäuse infiziert mit Ad-CMV-GCL detektiert wurde, sondern nur in den Ad-CMV-GL infizierten Kontrollen (**Abbildung 2F**). Die TNF-vermittelte Induktion von Apoptose in Adenovirus-infizierten Mäusen ist somit unabhängig von Caspase 8, wird aber trotzdem durch die Spaltung von Caspase 3 ausgelöst.



**Abbildung 2:** Apoptose in Adenovirus-infizierten Hepatozyten unabhängig von Caspase 8

(A-F) Casp8<sup>flox/flox</sup> und wt Mäuse wurden mit Ad-CMV-GL oder Ad-CMV-GCL infiziert ( $5 \times 10^8$  IFU/Maus, *i.v.*); (A) Detektion von Caspase 3 und 8 in der Western Blot Analyse der Leberlysate 2 Tage nach Infektion, GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert; (B) Quantifizierung der Biolumineszenz *in vivo* nach *i.p.* Applikation von Luziferin 1 Tag nach Infektion; (C,D) sALT

### 3. Ergebnisse

Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation (400 ng/Maus, *i.v.*) an Tag 2 nach Infektion, (C) in C57BL/6 Mäusen (wt) und (D) in Casp8<sup>flox/flox</sup> Mäusen; (E) Immunhistochemische Färbung der Infektion (GFP – rot) und der gespaltenen Caspase 3 (braun) in Leberschnitten, 2 Tage nach Infektion und 1 Stunde nach TNF-Applikation, Skala 100 µm; (F) Detektion von gespaltenen Caspase 8 in der Western Blot Analyse der Leberlysate 2 Tage nach Infektion und 1 Stunde nach TNF-Applikation, GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus n=3 unabhängigen Experimenten (B-D); n=4 Mäuse pro Gruppe (B-D); dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM (B-D); die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet.

#### 3.1.3 Mitochondrien-vermittelte Apoptose-Induktion nach Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem ER

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie es zur Aktivierung von Caspase 3, unabhängig von der Initiator-Caspase 8, kommt. TNFR I Stimulation führt nicht nur zur Aktivierung von Caspase 8, sondern auch zu einer vermehrten membranannähenden Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS<sup>40</sup>) durch die membranständige NADPH Oxidase (NOX) (Yazdanpanah, Wiegmann et al. 2009). Die Beteiligung dieser gebildeten ROS an der TNF-vermittelten Apoptose in Adenovirus-infizierten Mäusen konnte *in vivo* durch die Behandlung mit verschiedenen Antioxidantien und die Infektion von Mäusen mit einem Knockout der NOX gezeigt werden (Dr. Dirk Wohlleber, nicht-publizierte Daten). Das gebildete ROS kann zu einer Aktivierung der Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) führen, welche die Bildung von IP<sub>3</sub> katalysiert (Wang, McCullough et al. 2001, Domijan, Kovac et al. 2014). IP<sub>3</sub> bindet wiederum an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und führt zur Freisetzung von Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) aus dem ER (Marchant and Taylor 1997). Das freie Ca<sup>2+</sup> kann von den Mitochondrien aufgenommen werden und führt, je nach Konzentration und Dauer der Stimulation, zu einer mitochondrialen Permeabilitätstransition (mPT<sup>41</sup>) (Rasola and Bernardi 2011). Daraufhin wird unter anderem Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt, welches die Initiator Caspase 9 aktiviert, gefolgt von der Effektor Caspase 3, und somit Apoptose induziert (Szalai, Krishnamurthy et al. 1999). Die Bedeutung dieses Signalweges für die TNF-vermittelte Apoptose in Ad-CMV-GL infizierten Mäusen wurde *in vivo* untersucht. Die Beteiligung der PLC $\gamma$  wurde mit Hilfe des PLC $\gamma$ -Inhibitors Edelfosine aufgeklärt. Infizierte Mäuse, welche mit Edelfosine behandelt waren, zeigten eine signifikant reduzierte sALT nach der Behandlung mit TNF im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Edelfosine Behandlung (**Abbildung 3A**). Das durch PLC $\gamma$  gebildete IP<sub>3</sub> führt zur IP<sub>3</sub>R induzierten Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem

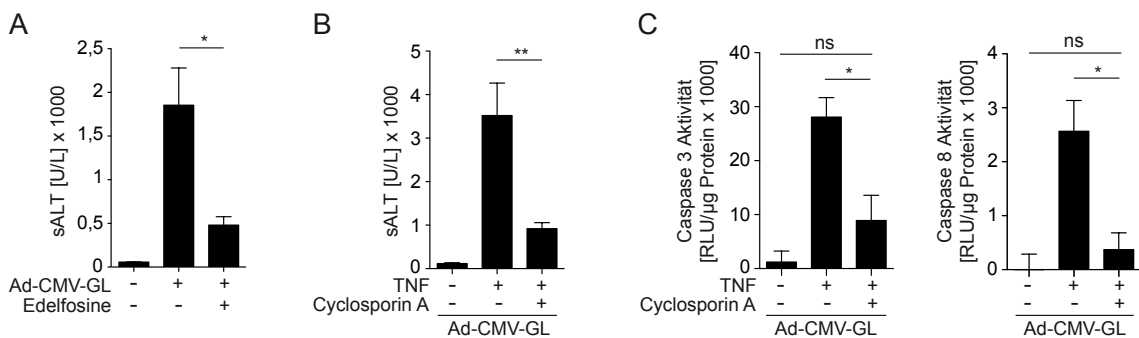
---

<sup>40</sup> engl.: reactive oxygen species

<sup>41</sup> engl.: mitochondrial permeability transition

### 3. Ergebnisse

ER. Die Inhibierung des IP<sub>3</sub>R durch Xestospongin führte zu einer Reduktion der Caspase 3 Aktivität um ungefähr 50% in infizierten und TNF-behandelten Leber-Schnittkulturen (Marcus Brugger, nicht-publizierte Daten). Darüber hinaus reduzierte auch die Bindung des freien Ca<sup>2+</sup> durch den Chelator BAPTA den TNF-vermittelten Anstieg in den sALT-Werten in Ad-CMV-GL infizierten Mäusen um 50% (Janas 2015). All diese Beobachtungen belegen, dass die TNF-vermittelte Apoptose in Adenovirus infizierten Hepatozyten abhängig ist von der PLC<sub>γ</sub> induzierten Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER.



**Abbildung 3:** Apoptose Signalweg über mitochondriale Permeabilitätstransition (mPT)

(A-C) Mäuse wurden mit Ad-CMV-GL infiziert ( $5 \times 10^8$  IFU/Maus, *i.v.*) und 2 Tage nach Infektion mit TNF behandelt (400 ng/Maus, *i.v.*); (A) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation, Behandlung mit Edelfosine 30 Minuten vor TNF-Applikation; (B) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation, Behandlung mit Cyclosporin A 30 Minuten vor TNF-Applikation; (C) Caspase 3 und Caspase 8 Aktivitäts-Assay aus dem Lebergewebe 1 Stunde nach TNF-Applikation, die Mäuse wurden außerdem 30 Minuten vor TNF-Applikation mit Cyclosporin A behandelt, der Null-Wert entspricht der gemessenen Lumineszenz im Lebergewebe von Q-VD-OPh behandelten Mäusen. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus  $n \geq 2$  unabhängigen Experimenten;  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$  und \*\*  $p \leq 0.01$ .

Daraufhin wurde weiter untersucht, ob die Ca<sup>2+</sup> vermittelte mPT der Mitochondrien der Auslöser für die Apoptose in den infizierten Zellen ist. Dazu wurden die Mäuse mit Cyclosporin A behandelt, was an CyclophilinD bindet und die Öffnung der mPT-Pore (mPTP) und somit die mPT verhindert, unabhängig von der Menge an Ca<sup>2+</sup> das in die Mitochondrien aufgenommen wird (Halestrap, Connern et al. 1997). Die Behandlung der infizierten Mäuse mit Cyclosporin A führte zu einer signifikanten Reduktion der sALT nach TNF-Applikation um 74% im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche infiziert und mit TNF behandelt wurde, nicht aber mit Cyclosporin A (**Abbildung 3B**). Zudem wurde die Caspase 3 und 8 Aktivität nach TNF-Applikation im Zusammenhang mit der Cyclosporin A Behandlung untersucht. Durch die Behandlung mit Cyclosporin A

### 3. Ergebnisse

konnte die TNF-vermittelte Caspase 3 Aktivierung in der Leber von infizierten Mäusen signifikant um 68% reduziert werden (**Abbildung 3C**), was mit der Reduktion in den sALT Werten vergleichbar war. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die TNF-vermittelte Apoptose in infizierten Mäusen über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte mPT ausgelöst wird, welche zur Aktivierung von Caspase 3 führt.

Interessanterweise wird durch die Cyclosporin A Behandlung auch die TNF-vermittelte Caspase 8 Aktivität weitestgehend inhibiert (**Abbildung 3C**). Zum einen bestätigt das, dass Caspase 8 nicht direkt durch die TNFR I Stimulation induziert wird und die TNF-vermittelte Apoptose somit unabhängig ist von Caspase 8. Des Weiteren lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass Caspase 8 erst durch eine Rückkopplung, entweder von der mPT oder der folgenden Caspase 9 oder 3-Aktivierung, gespalten und aktiviert wird (Ferreira, Kreuz et al. 2012). Außerdem erklärt es auch die beobachtete zeitgleiche Spaltung von Initiator-Caspase 8 und Effektor-Caspase 3 (Janas 2015).

#### **3.2 Virus-vermittelte Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-induzierter Apoptose**

Hepatozyten sind, in Bezug auf Apoptose, Typ II Zellen. Das bedeutet, dass die Caspase 3 Aktivierung, welche essentiell für die Induktion der Apoptose ist, erst nach Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium erfolgen kann. Somit sind die Mitochondrien in Hepatozyten die zentralen Schaltstellen für die Entscheidung, ob eine Zelle in Apoptose geht oder nicht (Kantari and Walczak 2011). Die Abhängigkeit der Apoptose-Induktion von einer Signalweiterleitung über die Mitochondrien konnte bereits in Adenovirus-infizierten Hepatozyten bestätigt werden (*siehe Abbildung 3B,C*). Dabei wird die Apoptose-induzierende Signalweiterleitung durch TNF ausgelöst, wobei der Grund für die selektive Eliminierung der infizierten Hepatozyten eine zell-intrinsische Veränderung sein muss, da TNF nicht zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen unterscheiden kann. Die zentrale Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose legt die Vermutung nahe, dass Mitochondrien auch für die virus-vermittelte Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-induzierter Apoptose verantwortlich sind. Vor allem vor dem Hintergrund, dass eine Beteiligung der Viruserkennung durch Mustererkennungsrezeptoren (PRR<sup>42</sup>), von Interferon, ER-Stress (Janas 2015), Zellzyklus-Dysregulation und Zellzyklus-Checkpoint-Proteinen an der

---

<sup>42</sup> engl.: pattern recognition receptor

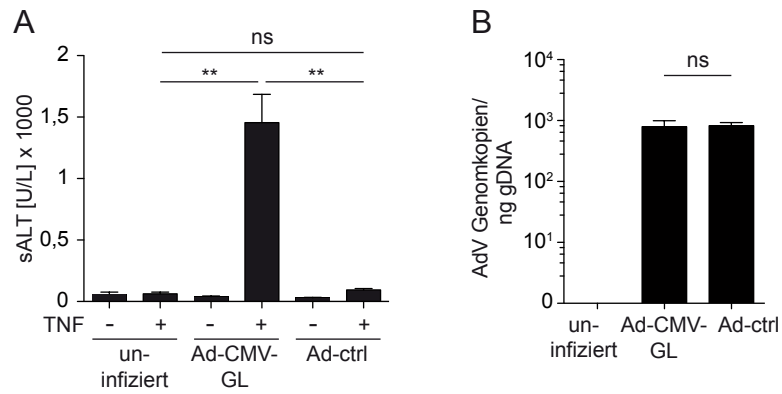
### 3. Ergebnisse

Sensibilisierung bereits ausgeschlossen werden konnten (Dr. Marianne K. Janas, nicht-publizierte Daten).

#### 3.2.1 Abhängigkeit der Sensibilisierung von der virus-vermittelten Genexpression

Bevor die intrazellulären Prozesse in den Hepatozyten zur virus-vermittelten Sensibilisierung gegenüber TNF-induzierter Apoptose genauer untersucht werden, gilt es noch die Frage zu klären, ob alleine der Virus-Eintritt in die Zelle schon für die Sensibilisierung verantwortlich ist, oder ob diese von der Virus-vermittelten Genexpression induziert wird. Dazu wurden zwei Viruskonstrukte verwendet. Zum einen ein replikations-defizientes Adenovirus, welches für die Markergene eGFP und Luziferase kodiert, die unter der Kontrolle des CMV Promoters stehen (*Ad-CMV-GL*, siehe 2.2.7 *Adenovirus-Produktion und Titration*). Des Weiteren wurde ein Adenovirus konstruiert, welchem die CMV-GL Expressionskassette fehlt (Ad-ctrl), wodurch keine virus-vermittelte Genexpression stattfindet. Nach Infektion und TNF-Behandlung konnte allerdings nur in den Mäusen, welche mit Ad-CMV-GL infiziert waren eine Erhöhung in den sALT-Werten gemessen werden. Wohingegen die Ad-ctrl infizierten Tiere keine erhöhten sALT-Werte zeigten (**Abbildung 4A**), trotz einer vergleichbaren Infektionseffizienz, welche anhand der adenoviralen Genomkopien in der Leber bestimmt wurde (**Abbildung 4B**). Das bedeutet, dass allein der Eintritt des Virus in die Hepatozyten noch keine Sensibilisierung gegenüber TNF-vermittelter Apoptose induzierte, sondern erst die Virus-vermittelte Genexpression.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 4:** Sensibilisierung erst durch Virus-vermittelte Genexpression

(A,B) Mäuse wurden mit Ad-CMV-GL oder Ad-ctrl infiziert ( $5 \times 10^8$  IFU/Maus, *i.v.*) und 2 Tage nach Infektion (A) die sALT Werte 4 Stunden nach TNF-Applikation gemessen (400 ng/Maus, *i.v.*); (B) die adenoviralen Genomkopien pro ng gDNA<sup>43</sup> in der Leber mittels qPCR quantifiziert. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus  $n \geq 6$  unabhängigen Experimenten;  $n=4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$  und \*\*  $p \leq 0.01$ .

#### 3.2.2 Analyse des mitochondrialen Lipidoms nach Virus-Infektion

Die Membranpermeabilität ist eine funktionsbestimmende Eigenschaft der Mitochondrien und eine Permeabilitätsänderung elementar in der Signalweiterleitung zur Apoptose-Induktion (Lemasters 2007). Da die Membranpermeabilität auch von der Lipidzusammensetzung abhängt (Huster, Jin et al. 1997, Purushothaman, Cama et al. 2016), könnte eine Änderung in der Lipidkomposition die Erklärung für die beobachtete Adenovirus-vermittelte Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-induzierter Apoptose darstellen. Um die Zusammensetzung der mitochondrialen Membranen zu untersuchen, wurden Mitochondrien aus den Lebern von Ad-CMV-GL infizierten, Ad-ctrl infizierten und uninfizierten Mäusen isoliert und die Lipide extrahiert. Die Zusammensetzung der mitochondrialen Lipide wurde durch eine massenspektrometrische Analyse detektiert. Alle potentiellen Änderungen in der Lipidzusammensetzung, die womöglich allein schon durch den Eintritt des Virus induziert werden, werden durch den direkten Vergleich einer Ad-CMV-GL mit einer Ad-ctrl Infektion bei der Suche nach der Ursache für die Sensibilisierung außer Acht gelassen.

Obwohl die Hauptkomponentenanalyse (PCA<sup>44</sup>) gezeigt hat, dass die Lipidzusammensetzung der Mitochondrien sich zwischen den einzelnen Gruppen

<sup>43</sup> genomische DNA

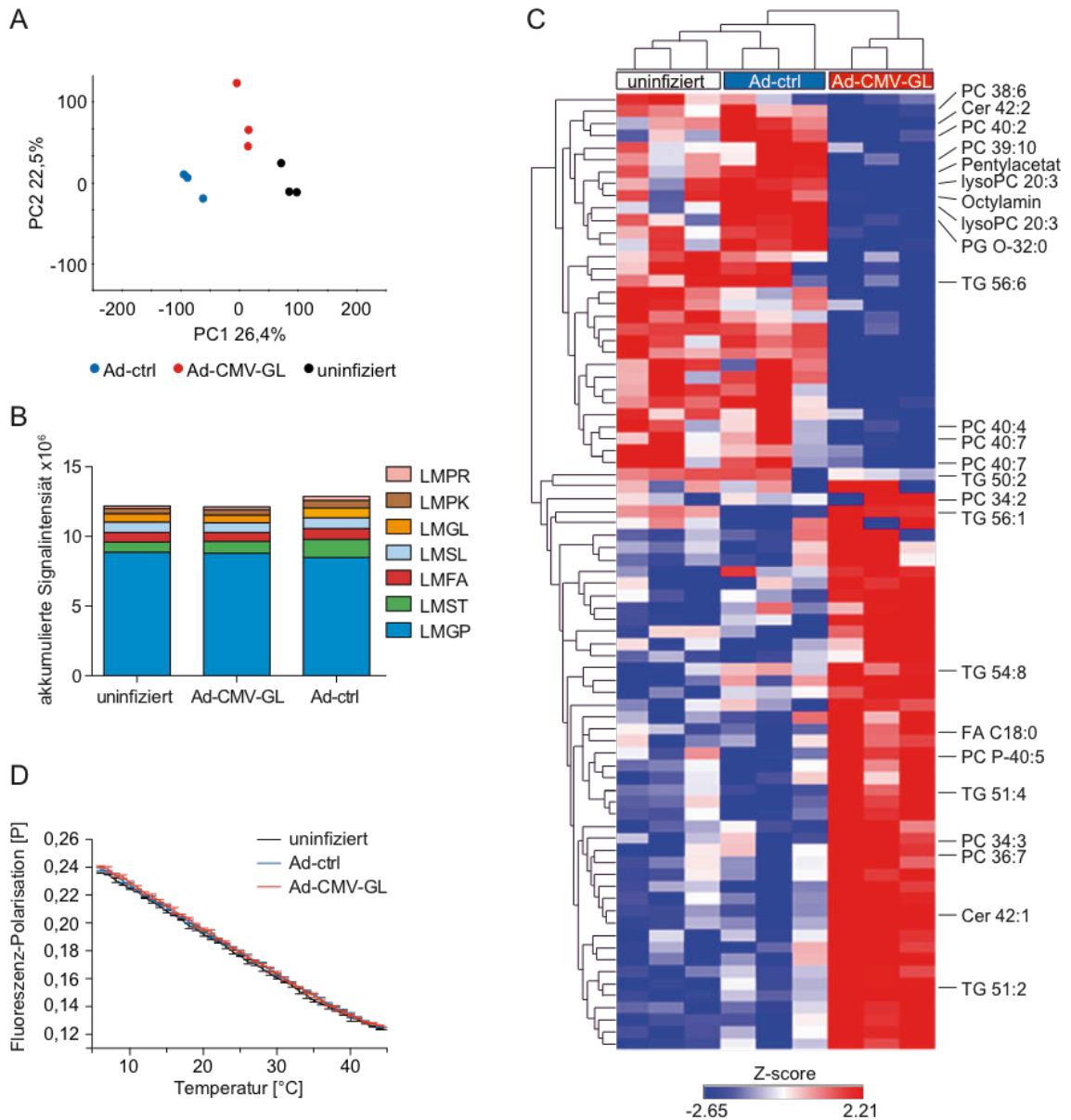
<sup>44</sup> engl.: principal component analysis



### 3. Ergebnisse

(Ad-CMV-GL, Ad-ctrl, uninfiziert) deutlich unterscheidet (**Abbildung 5A**), konnten bei genauerer Betrachtung aber keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Lipidklassen zwischen den Gruppen gezeigt werden (**Abbildung 5B**). Hingegen bei der Betrachtung der einzelnen Lipide konnten Unterschiede in knapp 80 annotierten Massen bei den Mitochondrien aus Ad-CMV-GL im Vergleich zu Ad-ctrl und uninfizierten Mäusen detektiert werden. Bei der genaueren Untersuchung der bekannten Lipide konnten speziell Veränderungen in Kettenlänge und Sättigungsgrad von Phosphatidylcholinen und Triacylglyceriden beobachtet werden (**Abbildung 5C**), welche aber anscheinend keinen Einfluss auf die generelle Zusammensetzung der Lipidklassen in Mitochondrien haben.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 5:** Einfluss einer Adenovirus-Infektion auf Lipidzusammensetzung und Membranfluidität von Mitochondrien

(A-C) Lipidom-Analyse von Leber-Mitochondrien 2 Tage nach Infektion (Ad-CMV-GL und Ad-ctrl, beide  $1 \times 10^9$  IFU/Maus, *i.v.*), Extraktion der Lipide aus den Mitochondrien und Analyse via Massenspektrometrie (Umkehrphasen UPLC-MS<sup>45</sup>, positive Elektronenspray-Ionisierung), 3 Mäuse pro Gruppe; (A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) des Lipidoms, PC1-Hauptkomponente 1, PC2-Hauptkomponente 2, mit den entsprechenden Varianzen der Hauptkomponenten; (B) akkumulierte Signalintensität der Lipidklassen in den Mitochondrien-Lipidextrakten, Nomenklatur der Lipidklassen: LMPR-Prenole, LMGL-Glycerolipide, LMFA-Fettsäuren, LMGP-Phosphoglyceride, LMST-Sterole, LMSL-Sacchareolipide, LMPK-Polyketide; (C) Cluster-Analyse der in ihren Mengen veränderten, annotierten Lipide (Euklidischer Abstand,  $p < 0,05$ ) nach Ad-CMV-GL-Infektion im Vergleich zu den kombinierten Daten nach Ad-ctrl Infektion und der uninfierten Proben; Identifikation mehrerer Lipid-Spezies mittels Tandem-Massenspektrometrie, unbekannte Lipide sind nicht markiert, Nomenklatur: PC-Phosphatidylcholin, Cer-Ceramid, PG-Phosphatidylglycerin, TG-Triacylglycerid, FA-Fettsäure.

<sup>45</sup> engl.: ultra-performance liquid chromatography – mass spectrometer

### 3. Ergebnisse

(D) Messung der mitochondrialen Membranfluidität von isolierten Mitochondrien 2 Tage nach Infektion durch die Detektion der Fluoreszenz-Polarisation von Diphenylhexatrien (DPH) bei verschiedenen Temperaturen, n=3 Replikate; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM. (A-C) Die Lipidom-Analyse mittels Massenspektrometrie und die Auswertung der Daten wurde von Dr. Constanze Müller (Helmholtz-Zentrum München, Neuherberg, Deutschland) durchgeführt. (D) Die Membranfluiditätsmessung wurde von Laura E. Sperl (Fakultät für Chemie, Technische Universität München, Deutschland) durchgeführt.

Nichtsdestotrotz könnten die Änderungen in Sättigungsgrad und Kettenlänge der einzelnen Lipide einen Einfluss auf die Membranfluidität der Mitochondrien haben. Deswegen wurde die Membranfluidität der Mitochondrien bestimmt, indem die Fluoreszenzpolarisation von Diphenylhexatrien (DPH) nach Einlagerung in die mitochondriale Membran in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen wurde. Die Fluoreszenzpolarisation von DPH ist neben der Temperatur auch abhängig von der Membranzusammensetzung und Rigidität, und gibt somit Aufschluss über die Membranfluidität (Fox and Delohery 1987). Allerdings konnten keine Unterschiede in der Membranfluidität von Mitochondrien aus den Lebern von Ad-CMV-GL infizierten, Ad-ctrl infizierten oder uninfizierten Mäusen gemessen werden (**Abbildung 5D**). Somit haben die wenigen Änderungen in der Lipidzusammensetzung der Lebermitochondrien nach Ad-CMV-GL Infektion keinen Einfluss auf die Membranfluidität.

#### 3.2.3 Bioenergetische Funktionalität von Mitochondrien nach Adenovirus-Infektion

Trotz einer unveränderten Lipidzusammensetzung und Morphologie (Janas 2015) der Mitochondrien kann eine Virus-Infektion Einfluss haben auf die mitochondriale Funktionalität, wodurch diese wiederum gegenüber der Apoptose-induzierenden Signalweiterleitung sensibilisiert werden könnten. Bei der Untersuchung der verschiedenen mitochondrialen Funktionen wurde die Ad-CMV-GL Infektion nur mit einer uninfizierten Kontrolle verglichen, da es keine Anhaltspunkte dafür gab, dass sich die Mitochondrien nach einer Ad-ctrl Infektion funktional von einer uninfizierten Kontrolle unterscheiden.

Zunächst wurde die bioenergetische Aktivität von isolierten Mitochondrien untersucht, da die Energieproduktion als Hauptfunktionen von Mitochondrien in den Zellen gilt. Dazu wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR<sup>46</sup>) der isolierten Mitochondrien mit Hilfe eines Flux-Analysators (Seahorse extracellular flux analyzer)

---

<sup>46</sup> engl.: oxygen consumption rate

### 3. Ergebnisse

gemessen, welche mit der Aktivität der Elektronentransportkette (ETC<sup>47</sup>) und der Energieproduktion gleichgesetzt wird. Den Mitochondrien wurde zunächst nur Succinat als Substrat bereitgestellt, um die basale Atmung der Mitochondrien zu bestimmen. Das Succinat dient als Reservoir für Elektronen, welche in die Elektronentransportkette aufgenommen werden können (Gnaiger 2014). Die Elektronentransportkette überführt die Elektronen schrittweise in einen energieärmeren Zustand und überträgt sie schließlich auf Sauerstoffmoleküle, wodurch Sauerstoffanionen und schließlich Wassermoleküle entstehen (Berg 2007, Rich and Marechal 2010). Die basale OCR von Mitochondrien hat sich allerdings nicht unterschieden zwischen Mitochondrien aus uninfizierten und Ad-CMV-GL infizierten Mäusen (**Abbildung 6A**). Bei der Überführung der Elektronen in einen energieärmeren Zustand über die ETC werden mit Hilfe der freiwerdenden Energie parallel Protonen von der mitochondrialen Matrix aktiv in den Intermembranraum transportiert, und somit ein Protonengradient aufgebaut. Dieser Protonengradient wird für die Produktion von ATP, dem Energiemolekül der Zelle, benötigt (Mitchell 1961, Rich and Marechal 2010). Wird nun ADP, das Substrat der ATP-Synthase, zu den Mitochondrien gegeben, wird der etablierte Protonengradient abgebaut und muss durch einen erhöhten Elektronentransport aufrechterhalten werden (Chance and Williams 1955, Brand and Nicholls 2011). Dadurch steigt die OCR, jedoch war dieser Anstieg bei den Mitochondrien aus uninfizierten und Ad-CMV-GL infizierten Mäusen vergleichbar (**Abbildung 6B,C**), was auf eine vergleichbare Produktivität hindeutete. Die OCR von Mitochondrien kann durch die Gabe von Inhibitoren beeinflusst werden, wodurch verschiedene Eigenschaften der Mitochondrien gemessen werden können (Chance and Williams 1955, Brand and Nicholls 2011, Gnaiger 2014). Durch die Gabe von Oligomycin, einem Inhibitor der ATP-Synthase, kann der ADP-vermittelte Anstieg in der OCR wieder rückgängig gemacht werden. Die verbleibende OCR nennt man Leckatmung oder Protonen-Leck<sup>48</sup>, da diese durch einen Protonenrückfluss zustande kommt, der unabhängig von der ATP-Synthase stattfindet und durch einen aktiven Protonentransport wieder ausgeglichen werden muss (Gnaiger 2014). Auch bei der Leckatmung gab es keinen Unterschied zwischen der Ad-CMV-GL infizierten und uninfizierten Gruppe (**Abbildung 6B**). Die ATP-Synthase kann auch von der Elektronentransportkette entkoppelt werden. CCCP ist ein solcher Entkoppler und transportiert aktiv Protonen entlang des Gradienten, wodurch die Elektronentransportkette zu ihrer maximalen Aktivität gezwungen wird, um dem Abbau des Protonengradienten entgegenzuwirken (Brand and Nicholls 2011). Somit

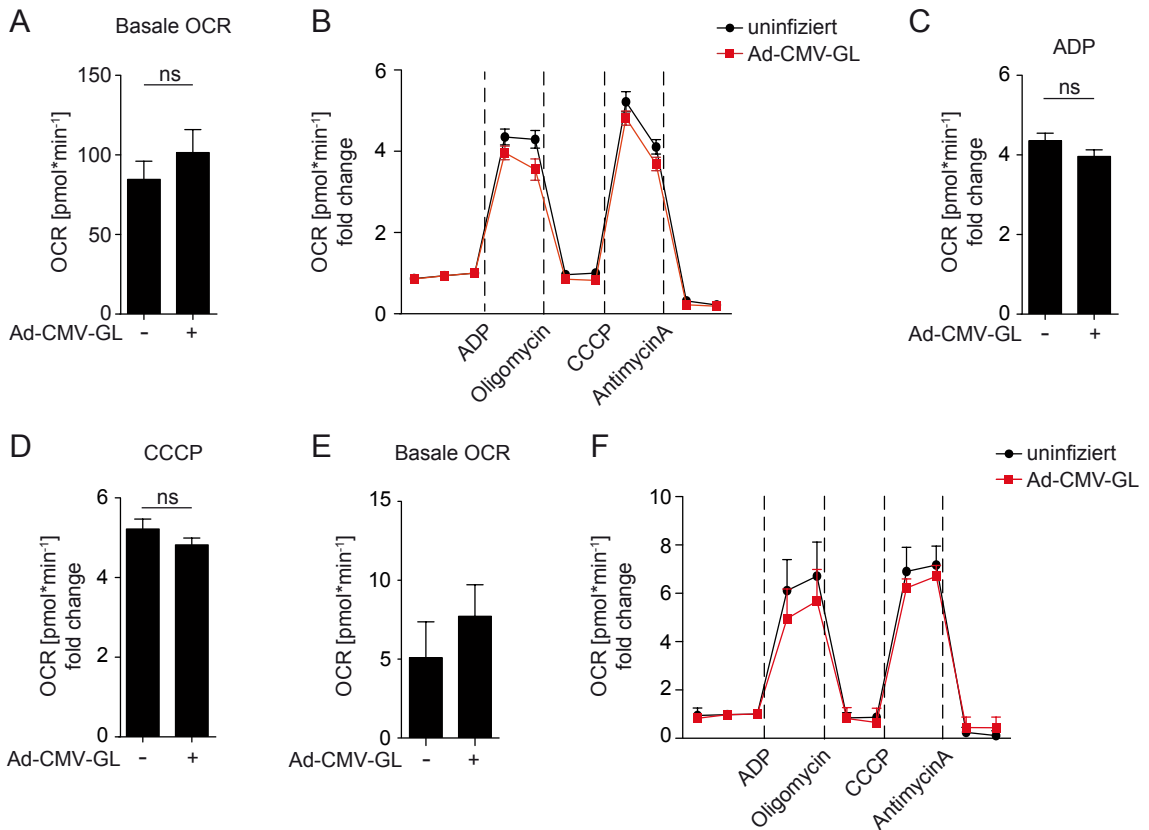
---

<sup>47</sup> engl.: electron transport chain

<sup>48</sup> engl.: proton leak

### 3. Ergebnisse

zeigen die Mitochondrien nach CCCP-Gabe auch eine maximale Atmung, welche sich aber wiederum nicht unterschied zwischen den Mitochondrien aus Ad-CMV-GL und uninfizierten Mäusen (**Abbildung 6B,D**).



**Abbildung 6:** Oxidative Phosphorylierung in isolierten Mitochondrien

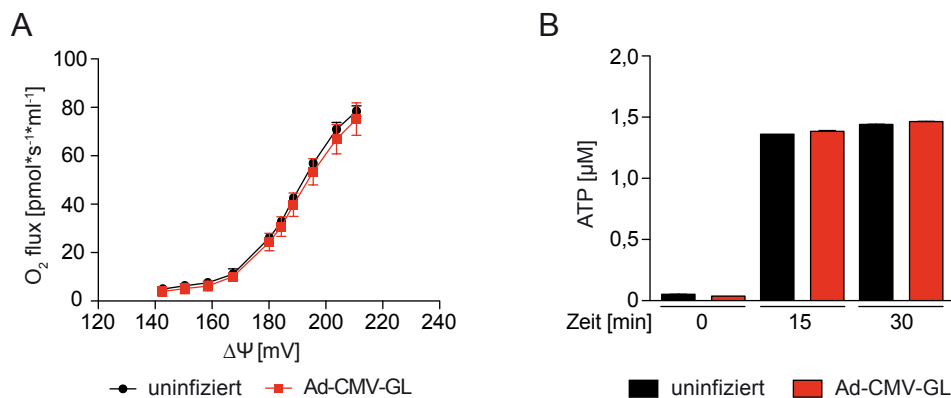
(A-F) Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) von isolierten Leber-Mitochondrien mittels eines Flux-Analysators (Seahorse extracellular flux analyzer) 2 Tage nach Ad-CMV-GL Infektion ( $1 \times 10^9$  IFU/Maus, *i.v.*); (A) Basale Atmung mit Succinat als Substrat; (B) OCR relativ zu basaler Atmung mit Succinat nach Zugabe von ADP (Substrat der ATP-Synthase), Oligomycin (Inhibitor der ATP-Synthase), CCCP (Entkoppler, Protonophor) und AntimycinA (Komplex III Inhibitor); (C) OCR relativ zu basaler Atmung mit Succinat nach Zugabe von ADP bzw. (D) CCCP; (A-D) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM aus  $n \geq 5$  unabhängigen Experimenten; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet; (E) Basale Atmung mit Pyruvat als Substrat; (F) OCR relativ zu basaler Atmung mit Pyruvat nach Zugabe von ADP, Oligomycin, CCCP und AntimycinA; (E,F) Dargestellt sind repräsentative Experimente aus  $n \geq 4$  unabhängigen Experimenten; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM.

Neben Succinat als Substrat, kann den Mitochondrien auch Pyruvat bereitgestellt werden. Succinat befüllt die Elektronentransportkette über den Komplex II (Succinat-Dehydrogenase), wohingegen Elektronen aus Pyruvat über den Komplex I in die Elektronentransportkette eingebracht werden (Gnaiger 2014). Aber auch bei der Verwendung von Pyruvat als Substrat zeigten sich keine Unterschiede in der OCR

### 3. Ergebnisse

zwischen den Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten und uninfizierten Mäusen, weder in der basalen Atmung (**Abbildung 6E**), noch im Anstieg der OCR nach ADP oder CCCP-Gabe (**Abbildung 6F**). Deswegen werden für die folgenden Experimente nur die Daten für Succinat als Substrat gezeigt.

Aus dem OCR-Profil der Mitochondrien konnte bereits gezeigt werden, dass es allem Anschein nach keinen Unterschied im Protonen-Leck von Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten und uninfizierten Mäusen gibt. Um das zu bestätigen, wurde das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) bei verschiedenen OCRs ( $O_2$  flux) gemessen, wobei ein verringertes Membranpotential ein verstärktes Protonen-Leck bedingt (Serviddio and Sastre 2010). Bei dieser Messung konnte bestätigt werden, dass sich das Protonen-Leck zwischen Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten und uninfizierten Mäusen nicht unterschieden hat (**Abbildung 7A**).



**Abbildung 7** Kopplung und Effektivität von isolierten Mitochondrien nach Adenovirus-Infektion

(**A,B**) Isolation der Leber-Mitochondrien 2 Tage nach Ad-CMV-GL Infektion ( $1 \times 10^9$  IFU/Maus, *i.v.*); (**A**) Protonen-Leck Messung durch die Bestimmung des Membranpotentials bei bestimmten OCR ( $O_2$  flux) mit Hilfe einer Clark-Elektrode und einer TPP<sup>+</sup>-Elektrode; (**B**) Quantifizierung der ATP Produktion vor und 15 bzw. 30 Minuten nach ADP Zugabe. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM.

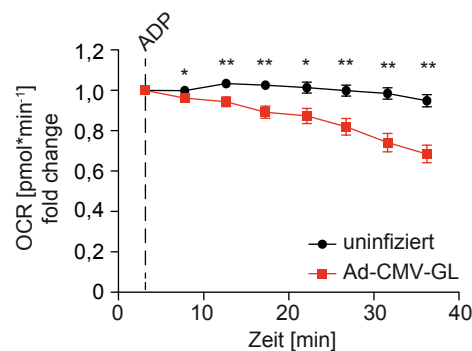
Übereinstimmend mit den gezeigten Ergebnissen konnte auch kein Unterschied in der ATP-Produktion von Leber-Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten und uninfizierten Mäusen gemessen werden (**Abbildung 7B**).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich die bioenergetische Funktionalität von Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten und uninfizierten Mäusen nicht unterscheidet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.4 Mitochondrien als Sensoren der Adenovirus-Infektion in Hepatozyten

Entscheidend für die Zelltod-Induktion ist die Signal-vermittelte Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen, wie beispielsweise die  $\text{Ca}^{2+}$  induzierte mPT (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). Diese hängt zum einen von der Dauer und Stärke des Signals ab (Rasola and Bernardi 2011), aber auch von der Ausdauer und Belastbarkeit der Mitochondrien. Eine Verminderung in Ausdauer oder Belastbarkeit könnte eine Sensibilisierung der Mitochondrien gegenüber Apoptose darstellen, da die benötigte Signalstärke für die Induktion des Zelltods dadurch herabgesetzt werden würde. Um die Ausdauer von Mitochondrien zu untersuchen, wurde die mitochondriale Aktivität über einen längeren Zeitraum beobachtet. Dazu wurde die Kinetik der OCR nach ADP-Gabe gemessen und es zeigte sich, dass die OCR der Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten Mäusen über eine Zeit von 40 Minuten deutlich sinkt, wohingegen die Mitochondrien aus den uninfizierten Mäusen in diesem Zeitraum eine konstante OCR aufweisen (**Abbildung 8**). Somit führt die Ad-CMV-GL Infektion zu einem Verlust der Fähigkeit die Aktivität der Elektronentransportkette in den Mitochondrien über eine längere Zeit aufrechtzuerhalten, und stellt eine Verringerung der mitochondrialen Ausdauer dar.



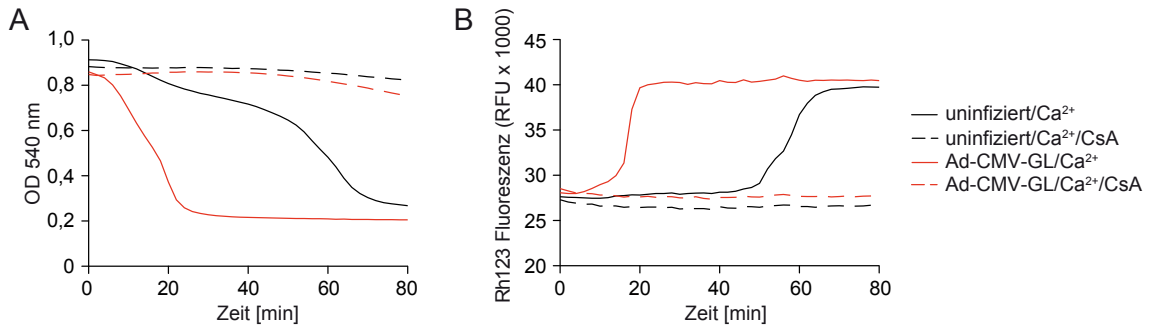
**Abbildung 8** OCR Kinetik in isolierten Mitochondrien nach ADP Zugabe

Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) von isolierten Leber-Mitochondrien mittels eines Flux-Analysators (Seahorse extracellular flux analyzer) 2 Tage nach Ad-CMV-GL Infektion ( $1 \times 10^9$  IFU/Maus, *i.v.*); Zeit-Kinetik der OCR über 40 Minuten nach Zugabe von ADP. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM aus  $n=5$  unabhängigen Experimenten; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$  und \*\*  $p \leq 0.01$ .

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Mitochondrien nach Infektion eine geringere Belastbarkeit zeigen. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurde auch die Sensitivität der Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten Mäusen gegenüber Calcium Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) untersucht.  $\text{Ca}^{2+}$  kann, abhängig von Konzentration und Dauer,

### 3. Ergebnisse

die mPTP öffnen, was zu einer Permeabilisierung der Mitochondrien führt. Daraufhin strömen Wasser und Ionen in das Mitochondrium, wodurch die Struktur der Cristae verloren geht, was wiederum zu einem Verlust der mitochondrialen Integrität und des Membranpotentials führt (Rasola and Bernardi 2011).



**Abbildung 9** Sensitivität von Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$

(A,B) 2 Tage nach Ad-CMV-GL Infektion ( $1 \times 10^9$  IFU/Maus, *i.v.*) wurden die Mitochondrien aus der Leber isoliert; Zeit-Kinetik Messung der (A) mitochondrialen Integrität (Absorption bei 540 nm) und des (B) mitochondrialen Membranpotentials (Fluoreszenzintensität des freien Rh123) nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ . Den Kontrollen wurde schon vor  $\text{CaCl}_2$  CyclosporinA (CsA) zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments ( $n \geq 6$ ).

Die Folgen der Permeabilisierung (mPT) können auch bei isolierten Mitochondrien beobachtet werden. Dazu wurden Mitochondrien mit  $\text{Ca}^{2+}$  behandelt und die Veränderung in der mitochondrialen Ultrastruktur durch die Messung der Absorption bei 540 nm über die Zeit beobachtet. Dadurch kann der Verlust der mitochondrialen Integrität nach  $\text{Ca}^{2+}$  Behandlung verfolgt werden. Der Verlust der mitochondrialen Integrität fand bei Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten Mäusen bedeutend schneller statt als bei Mitochondrien aus uninfizierten Mäusen (**Abbildung 9A**). Mit dem Verlust der mitochondrialen Integrität ging auch der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MMP<sup>49</sup>) einher, gemessen über die Freisetzung von Rhodamin123 aus der mitochondrialen Membran (**Abbildung 9B**). Sowohl der Verlust der mitochondrialen Integrität als auch des MMPs kann durch die Behandlung der Mitochondrien mit CyclosporinA, welches die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Öffnung der mPTP inhibiert (Halestrap, Connern et al. 1997), verhindert werden (**Abbildung 9A,B**). Demzufolge ist die Sensitivität der Mitochondrien gegenüber einer  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten mPT nach einer Ad-CMV-GL Infektion stark erhöht.

<sup>49</sup> engl.: mitochondrial membrane potential



### 3. Ergebnisse

Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.3 konnte eine essentielle Bedeutung der mPT sowohl für die virus-induzierte Sensibilisierung auf mitochondrialer Ebene (*siehe Abbildung 9*), als auch für die TNF-vermittelte Apoptose-Induktion *in vivo* (*siehe Abbildung 3*) gezeigt werden.

Darüber hinaus konnte in den Lebern von Ad-CMV-GL infizierten Mäusen ein erhöhtes Level der pro-apoptotischen Proteine Bim und Bax gemessen werden, sowie ein verstärktes Ausschütten von Cytochrom C aus dem Mitochondrium nach Stimulation mit tBid (Janas 2015). Dies befürwortet die Hypothese einer erhöhten Permeabilität und dadurch verringerten Belastbarkeit und Ausdauer der Mitochondrien in Ad-CMV-GL infizierten Hepatozyten.

Aus den gezeigten Daten lässt sich schließen, dass eine Adenovirus-Infektion die Hepatozyten in einen vor-apoptotischen Zustand versetzt. Die Hepatozyten werden gegenüber der TNF-vermittelten Apoptose-Induktion sensibilisiert, durch eine Herabsetzung der mitochondrialen Belastbarkeit und erhöhten Sensibilität gegenüber Zelltod-Stimuli. Die Funktion der Mitochondrien in der Sensibilisierung zeigt einen neuen Weg der intrazellulären Erkennung einer Virus-Infektion in Hepatozyten mit den Mitochondrien in der Rolle des Sensors.

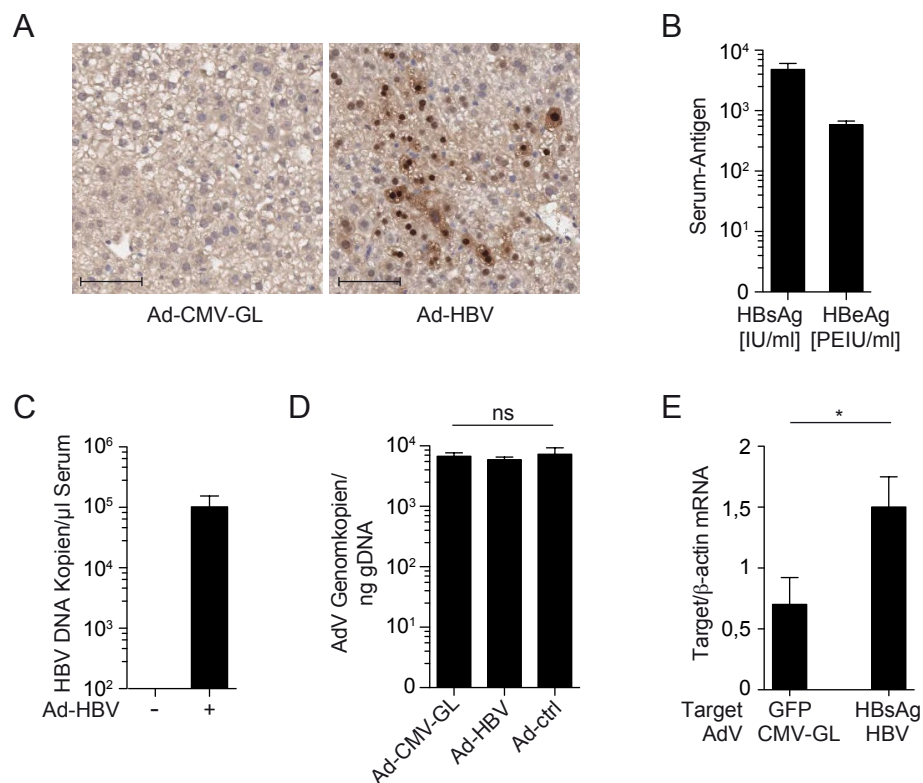
#### **3.3 Hepatitis B Virus (HBV) inhibiert die Mitochondrien-vermittelte Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-induzierter Apoptose**

Nachdem nun ein virus-vermittelter, vor-apoptotischer Zustand der Mitochondrien als Grund für die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-induzierter Apoptose identifiziert wurde, stellte sich die Frage, ob das auch für einen Virus zutrifft, welcher perfekt an die Hepatozyten angepasst ist und zu einer persistierenden Infektion führen kann, wie das Hepatitis B Virus (HBV). HBV ist spezies-spezifisch und hat einen strengen Hepatozyten-Tropismus (Dandri and Petersen 2016). Dadurch kann HBV murine Hepatozyten nicht auf natürlichem Weg infizieren. Um eine HBV Infektion dennoch im Mausmodell untersuchen zu können, wird für diese Arbeit ein Adenovirus-Konstrukt verwendet, welches das HBV 1.3 Überlängen-Konstrukt enthält (Sprinzl, Oberwinkler et al. 2001). Das Adenovirus dient hierbei als Transporter des HBV Genoms in die murinen Hepatozyten, wo dann ausgehend vom HBV 1.3 Überlängen-Konstrukt die HBV Replikation sehr effizient stattfindet (Guidotti, Matzke et al. 1995).

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.1 Ad-HBV 1.3 Infektion verhindert TNF-induzierte Apoptose

Um die Funktionalität des Adenovirus-Transporter Systems zu verifizieren wurde zunächst die HBV Genexpression und Replikation nach einer Infektion mit Ad-HBV 1.3 geprüft. Dazu wurde zum einen die HBV Core Antigen-Expression in den Hepatozyten von infizierten Mäusen durch eine immunhistochemische Färbung in Leberschnitten gezeigt (**Abbildung 10A**). Darüber hinaus wurde auch die Sekretion viraler Antigene aus den Hepatozyten untersucht. Im Serum infizierter Mäuse konnte sowohl HBV S-Antigen (HBsAg) als auch HBV e-Antigen (HBeAg) detektiert werden (**Abbildung 10B**). Außerdem konnte auch die Produktion und Sekretion von Genomenthaltenden Partikeln bestätigt werden. Dazu wurde DNA aus dem Serum infizierter Mäuse isoliert und auf die Anwesenheit von HBV-DNA untersucht. Tatsächlich konnte HBV-DNA im Serum infizierter Mäuse nachgewiesen werden (**Abbildung 10C**), was auf eine vollständige HBV Replikation und Sekretion infektiöser HBV-Viruspartikel schließen lässt.



**Abbildung 10** Ad-HBV 1.3 Infektion in der Maus-Leber

(A-E) 2 Tage nach Infektion mit Ad-HBV 1.3, Ad-CMV-GL oder Ad-ctrl (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*) wurde die Infektion in der Leber untersucht: (A) Immunhistochemische Färbung von HBV core Protein in Leberschnitten, Skala 100  $\mu\text{m}$ ; (B) HBsAg und HBeAg Level im Blutserum; (C) Quantifizierung der HBV DNA Kopien im Blutserum; (D) Quantifizierung der adenoviralen

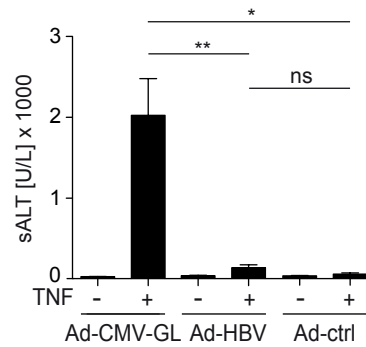
### 3. Ergebnisse

Genomkopien pro ng gDNA im Lebergewebe; (E) Quantifizierung der eGFP mRNA (Ad-CMV-GL Infektion) und der HBsAg mRNA (Ad-HBV 1.3 Infektion) relativ zur  $\beta$ -actin mRNA im Lebergewebe. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus  $n \geq 3$  unabhängigen Experimenten;  $n \geq 4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$ .

Neben der Detektion von HBV Replikation nach Ad-HBV 1.3 Infektion, wurde auch die Infektionseffizienz im Vergleich zu einer Ad-CMV-GL Infektion untersucht. Dazu wurden die adenoviralen Genomkopien in den Lebern von infizierten Mäusen quantifiziert, wodurch eine vergleichbare Infektion gezeigt werden konnte (**Abbildung 10D**). Darüber hinaus wurde auch die Expression der Virus-kodierten Transgene miteinander verglichen. Dazu wurde die mRNA von eGFP für die Ad-CMV-GL Infektion und die HBV S-Antigen mRNA für die Ad-HBV 1.3 Infektion relativ zur  $\beta$ -actin mRNA in der Leber quantifiziert. Beide virus-kodierten Gene zeigten eine starke Expression auf mRNA Ebene, wobei die HBV-vermittelte HBV S-Antigen Expression sogar noch stärker war als die CMV-Promotor regulierte eGFP Expression (**Abbildung 10E**). Folglich induzierten beide Promotoren, HBV und CMV, eine starke Genexpression auf einem vergleichbaren Level wie das endogene  $\beta$ -actin. Das ist insbesondere von Bedeutung, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose nicht von der Infektion selbst, sondern von der virus-vermittelten Transgen-Expression verursacht wird (*siehe Abbildung 4*).

Wird nun durch die Applikation von TNF Apoptose in den Lebern der infizierten Mäuse induziert, so konnte nur in den Ad-CMV-GL infizierten Mäusen ein Anstieg in den sALT-Werten gemessen werden (**Abbildung 11**). Wohingegen kein Anstieg in den Mäusen infiziert mit Ad-HBV 1.3 beobachtet wurde, vergleichbar mit einer Ad-ctrl Infektion (**Abbildung 11**), welche aber im Gegensatz zu Ad-HBV 1.3 keinerlei Genexpression zeigt. Die Infektionseffizienz von Ad-ctrl war vergleichbar mit Ad-CMV-GL und Ad-HBV 1.3 (*siehe Abbildung 10D*). Somit verhindert HBV, trotz einer starken Genexpression, TNF-vermittelte Apoptose in infizierten Hepatozyten.

### 3. Ergebnisse



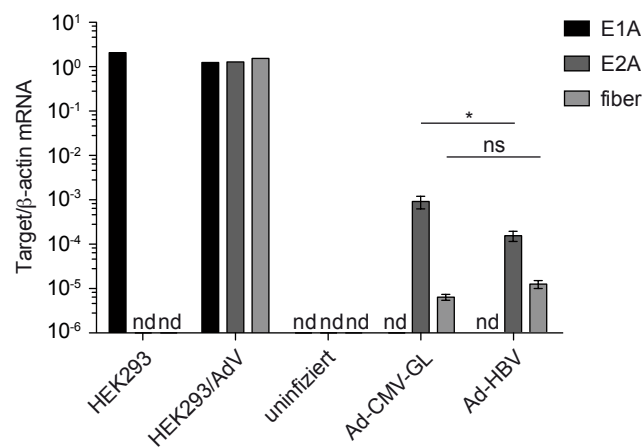
**Abbildung 11** TNF-vermittelte Apoptose in Ad-HBV 1.3 und Ad-CMV-GL infizierten Mäusen

Mäuse wurden mit Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 oder Ad-ctrl infiziert ( $5 \times 10^8$  IFU/Maus, *i.v.*) und 2 Tage nach Infektion mit TNF behandelt (400 ng/Maus, *i.v.*), die sALT Werte wurden 4 Stunden nach TNF-Applikation gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n \geq 6$  unabhängigen Experimenten;  $n=4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$  und \*\*  $p \leq 0.01$ .

Um die HBV-vermittelte Inhibierung einer TNF-induzierten Apoptose in infizierten Hepatozyten zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob die HBV Replikation mit dem adenoviralen Genom interferiert und dieses teilweise reaktiviert. Der verwendete Adenovirus ist replikations-defizient, da elementare regulatorischen Sequenzen eliminiert wurden (*siehe 2.2.7 Adenovirus-Produktion und Titration*). Dadurch sollte überhaupt kein adenovirales Gen exprimiert werden, sondern ausschließlich die kodierten Transgene (wie eGFP und Luziferase). Die Inhibierung der Expression von adenoviralen Proteinen ist notwendig, da das Adenovirus für mehrere Proteine mit pro- und anti-apoptischer Funktion kodiert, welche sonst mit der untersuchten Sensibilisierung und TNF-vermittelten Apoptose interferieren könnten (Galluzzi, Brenner et al. 2008). Jedoch hat das HBV x Protein trans-aktivierende Funktionen, wodurch es auch im replikations-defizienten Adenovirus adenovirale Gene aktivieren könnte (Schaack, Maguire et al. 1996). Die daraus resultierende Expression von anti-apoptischen bzw. mit Apoptose interferierenden Proteinen könnte wiederum die molekulare Ursache für die fehlende Sensibilisierung der Ad-HBV 1.3 infizierten Hepatozyten sein. Um eine Transaktivierung des Adenovirus durch HBV zu untersuchen wurde die Produktion einzelner adenoviraler mRNAs in der Leber von infizierten Mäusen quantifiziert. Es wurde die Menge an mRNA der Gene E1A, E2A und fiber in den Lebern von Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 und uninfizierten Mäusen bestimmt. Die Gensequenz für E1A, ein frühes Adenovirus-Protein welches mitverantwortlich ist für die Aktivierung der gesamten Adenovirus-Replikation (Liu and Green 1990), ist im verwendeten Adenovirus Genom eliminiert und kann somit gar nicht erst produziert werden. Dadurch sind aber auch alle anderen Bereiche des

### 3. Ergebnisse

Adenovirus-Genoms stillgelegt. Um das zu prüfen wurde zusätzlich noch die mRNA eines weiteren frühen Adenovirus-Proteins, E2A, und eines späten Proteins, fiber, quantifiziert, deren Gensequenzen noch vorhanden sind, aber nicht abgelesen werden sollten. Zum Vergleich wurde auch mRNA aus HEK293 Zellen, infiziert und uninfiziert, isoliert und quantifiziert. HEK293 ist die Produktions-Zelllinie für die Adenoviren, da diese Zellen die Gensequenz für die E1 Region aus dem Adenovirus im eigenen Genom integriert haben. Durch die Bereitstellung der E1 Proteine kann der eigentlich replikations-defiziente Adenovirus in diesen Zellen replizieren und produziert werden. Wenn HEK293 Zellen mit Adenovirus infiziert sind wird zusätzlich zu der E1 Gensequenz (enthält E1A) auch die mRNAs für E2A und fiber gebildet (**Abbildung 12**).



**Abbildung 12** Expression von Adenovirus-Genen in murinen Lebern und HEK293 Zellen

Quantifizierung der Adenovirus-mRNAs E1A, E2A und fiber relativ zu  $\beta$ -actin mRNA in der Leber, 2 Tage nach Infektion mit Ad-HBV 1.3 oder Ad-CMV-GL (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*); mRNA aus HEK293 Zellen, Ad-CMV-GL replizierend oder uninfiziert, wurde als Positivkontrolle verwendet; nd-nicht detektierbar. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n=2$  unabhängigen Experimenten;  $n=4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$ .

In den Lebern von uninfizierten Mäusen konnte keine Adenovirus-mRNA detektiert werden, und wie erwartet konnte in keiner der Lebern, unabhängig von der Infektion (Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3) die mRNA für E1A detektiert werden (**Abbildung 12**). Jedoch konnten die mRNAs für E2A und fiber sowohl in den Ad-CMV-GL als auch in den Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen nachgewiesen werden, allerdings in einer 1000-fach geringeren Konzentration als in den HEK293 Proben, welche die Replikation von Adenoviren ermöglichen (**Abbildung 12**). Zudem waren die detektierten Mengen der mRNAs von E2A und fiber in den Ad-HBV 1.3 infizierten Lebern nicht erhöht gegenüber den Ad-CMV-GL infizierten Lebern (**Abbildung 12**), was gegen eine

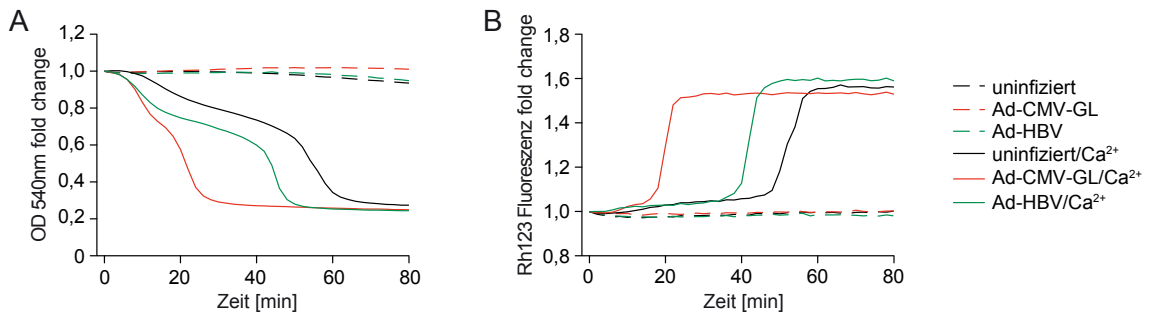
### 3. Ergebnisse

Transaktivierung des Adenovirus-Genoms durch HBV spricht. Somit basiert das Fehlen der Sensibilisierung von Hepatozyten nach Ad-HBV 1.3 Infektion auf dem HBV selbst und nicht auf einer unbeabsichtigten Induktion der Expression von adenoviralen Genen.

#### 3.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ Sensitivität von Mitochondrien aus Ad-HBV 1.3 infizierten Lebern

Die Virus-vermittelte Sensibilisierung der Mäuse basiert auf einer Verminderung der Belastbarkeit der Hepatozyten-Mitochondrien (*siehe 3.2.4 Mitochondrien als Sensoren der Adenovirus-Infektion in Hepatozyten*). HBV-infizierte Hepatozyten allerdings zeigen keine Sensibilität gegenüber TNF-vermittelter Apoptose, wodurch sich die Frage stellt, ob eine Ad-HBV 1.3 Infektion auch die Belastbarkeit der Mitochondrien unberührt lässt und dadurch keine Sensibilisierung der Hepatozyten zustande kommt. Um diese Frage zu beantworten wurde die Sensitivität von Leber-Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen, als Parameter für die Belastbarkeit der Mitochondrien. Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten Mäusen zeigen einen deutlich beschleunigten Verlust der mitochondrialen Integrität nach einem  $\text{Ca}^{2+}$  Stimulus, gemessen an dem Absinken der Absorption bei 540 nm, im Vergleich zu Mitochondrien aus uninfizierten Mäusen (**Abbildung 13A**). Die Kinetik des Verlusts der mitochondrialen Integrität von Mitochondrien aus Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen hingegen ist deutlich ähnlicher zur Kinetik der Mitochondrien aus uninfizierten Mäusen, als zu denen aus Ad-CMV-GL infizierten Mäusen (**Abbildung 13A**). Der Verlust der mitochondrialen Integrität spiegelt sich in der Kinetik des mitochondrialen Membranpotentials wider (**Abbildung 13B**). Somit sind die Mitochondrien aus Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen deutlich belastbarer als Mitochondrien aus Ad-CMV-GL infizierten Mäusen. Daraus lässt sich schließen, dass HBV die Sensibilisierung der Hepatozyten bereits auf der Ebene der Virus-Erkennung durch die Mitochondrien inhibiert.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 13** Sensitivität von Mitochondrien aus Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen gegenüber  $Ca^{2+}$

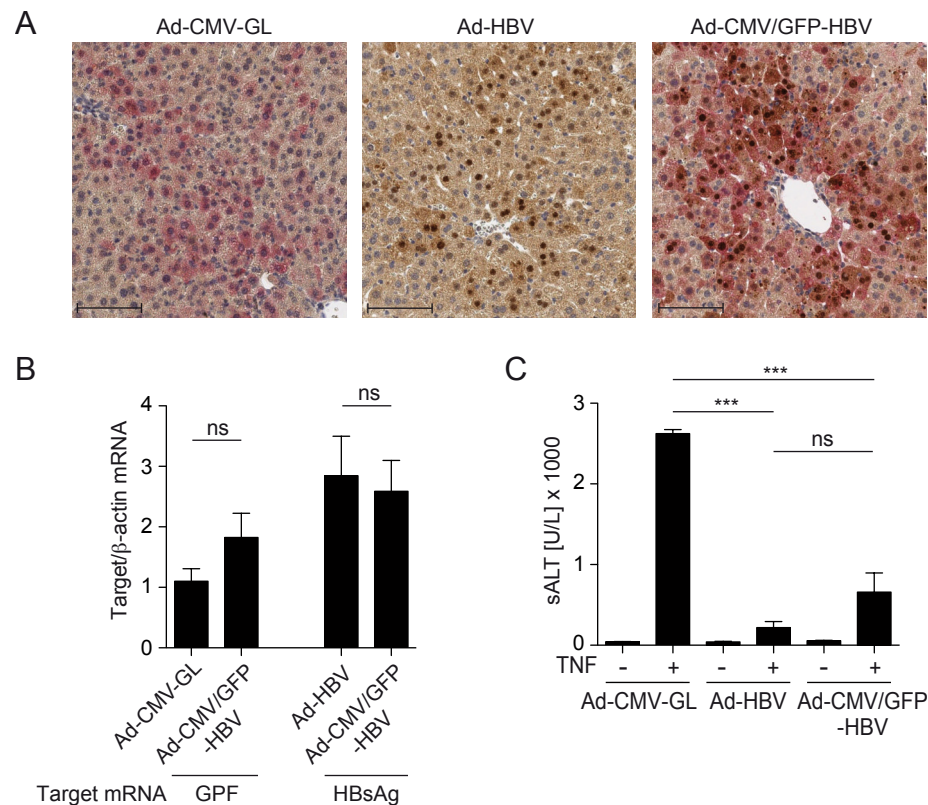
(A,B) 2 Tage nach Ad-CMV-GL oder Ad-HBV 1.3 Infektion ( $1 \times 10^9$  IFU/Maus, *i.v.*) wurden die Mitochondrien aus der Leber isoliert; Zeit-Kinetik Messung der (A) mitochondrialen Integrität (Absorption bei 540 nm) und des (B) mitochondrialen Membranpotentials (Fluoreszenzintensität des freien Rh123) nach Zugabe von  $CaCl_2$ . Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments ( $n=4$ ).

#### 3.3.3 HBV inhibiert aktiv die Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose

Für die fehlende Sensibilisierung bei einer Ad-HBV 1.3 Infektion gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte HBV generell die Sensibilisierung nicht induzieren und gar nicht erst von den Mitochondrien erkannt werden. Zum anderen könnte HBV die Sensibilisierung auch aktiv inhibieren und die mitochondriale Erkennung umgehen. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Adenovirus verwendet, welches für das Transgen eGFP unter der Kontrolle des CMV Promoters kodiert und zusätzlich, aber unabhängig von eGFP, auch das HBV 1.3 Genom enthält (Ad-CMV/GFP-HBV). Somit wird in den infizierten Zellen sowohl das eGFP exprimiert, was zu einer Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose führen sollte, als auch HBV repliziert, was die Sensibilisierung seinerseits inhibieren sollte. Zunächst wurde die gleichzeitige Expression von eGFP und HBV Proteinen kontrolliert. Dazu wurde sowohl eGFP, als auch das HBV core Protein immunhistochemisch in den Lebern von Ad-CMV/GFP-HBV infizierten Mäusen angefärbt und zeigte eine gleichzeitige Färbung von eGFP und HBV core Protein in den infizierten Hepatozyten (**Abbildung 14A**). Darüber hinaus wurden auch die Expressionslevel für eGFP und HBV S-Antigen auf mRNA Ebene in der Leber quantifiziert. Es wurde bereits bestätigt, dass der CMV und der HBV Promotor hohe Expressionslevel der kodierten Gene induzieren (*siehe Abbildung 10E*). Es sollte sichergestellt werden, dass sich das eGFP unter dem CMV Promoter und HBV nicht gegenseitig beeinflussen und das Verhältnis der Expressionslevel verändern. Die Quantifizierung zeigte, dass die relative mRNA-Menge von eGFP vergleichbar ist in den Lebern von Ad-CMV-GL und Ad-CMV/GFP-

### 3. Ergebnisse

HBV infizierten Mäusen, und auch die Menge der HBV S-Antigen mRNA in den Ad-CMV/GFP-HBV infizierten Mäusen entspricht den Mengen in den Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen (**Abbildung 14B**). Somit sollte sowohl die Induktion der Sensibilisierung durch die Expression von eGFP unter Kontrolle des CMV Promoters als auch die Inhibierung der Sensibilisierung durch HBV gewährleistet sein und es kann untersucht werden, welcher der beiden Mechanismen der dominanter ist.



**Abbildung 14** Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose nach Ad-CMV/GFP-HBV Infektion

(A-C) 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 oder Ad-CMV/GFP-HBV (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*) wurden folgende Analysen durchgeführt: (A) Immunhistochemische Färbung von eGFP (rot) und HBV core Protein (braun) in Leberschnitten, Skala 100  $\mu\text{m}$ ; (B) Quantifizierung der eGFP mRNA und HBsAg mRNA relativ zu  $\beta$ -actin mRNA im Lebergewebe; (C) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation (400 ng TNF/Maus *i.v.*). Dargestellt sind repräsentative Experimente aus 4 unabhängigen Experimenten;  $n=4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

In Mäusen, welche mit Ad-CMV/GFP-HBV infiziert waren, konnten nach TNF Behandlung nur 25% des Anstiegs in den sALT Werten im Vergleich zu einer Ad-CMV-GL Infektion beobachtet werden (**Abbildung 14C**). Die sALT Werte der Ad-CMV/GFP-



### 3. Ergebnisse

HBV infizierten Mäuse waren nicht signifikant unterschiedlich zu den sALT Werten in den Ad-HBV 1.3 infizierten und TNF behandelten Mäusen, jedoch eben deutlich niedriger als die sALT Werte der Ad-CMV-GL infizierten Mäuse (**Abbildung 14C**). Das bedeutet, dass die Sensibilisierung, welche durch die Expression von eGFP hervorgerufen wird, durch die Replikation von HBV aktiv inhibiert werden muss, da andernfalls kein inhibierender Effekt von HBV sichtbar wäre.

Um die fehlende Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion weiter zu untersuchen gibt es zwei mögliche Ansätze. Zum einen kann nach infektionsbedingten Änderungen in den infizierten Hepatozyten gesucht werden, welche die molekulare Grundlage für die beobachtete Inhibierung der Sensibilisierung darstellen. Zum anderen kann nach dem für die Inhibierung verantwortlichen Protein oder Bestandteil des Virus gesucht werden. Im Folgenden wird die Grundlage der inhibierten Sensibilisierung sowohl auf der Seite der infizierten Zielzellen, der Hepatozyten, als auch auf Seiten des Ad-HBV 1.3 untersucht.

#### 3.3.4 Transkriptionelle Signatur der HBV Replikation in Hepatozyten

Zunächst sollte mittels einer RNA-Analyse unvoreingenommen die transkriptionelle Signatur der HBV Replikation untersucht werden, um die molekulare Grundlage für die fehlende Sensibilisierung zu identifizieren, ohne eine potentielle Ursache zu übersehen. Dazu wurde mRNA aus den Lebern von Ad-HBV 1.3, Ad-CMV-GL und Ad-ctrl infizierten Mäusen isoliert und mittels RNA-Sequenzierung Unterschiede in den Transkriptomen identifiziert. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) zeigte, dass die verschiedenen Gruppen deutlich separiert lagen (**Abbildung 15A**) und sich somit die Transkriptome nach den verschiedenen Virus-Infektionen unterschieden. Das bestätigte, dass HBV die Zelle verändert und die Sensibilisierung somit aktiv umgeht, da die PCA sonst keinen so deutlichen Unterschied zwischen einer Ad-HBV 1.3 und einer Ad-ctrl Infektion gezeigt hätte. Um nun die Transkriptom-Signatur zu erhalten, welche die HBV-vermittelte Inhibierung beschreibt, wurde das Transkriptom der Ad-CMV-GL und Ad-HBV 1.3 Infektion verglichen und die signifikant unterschiedlichen Gene identifiziert. Beide Viren zeigten eine starke Genexpression und unterschieden sich lediglich in den kodierten Transgenen, eGFP und Luziferase im Vergleich zu HBV. Somit war es die HBV Proteinexpression und Replikation, welche für die Inhibierung der Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose verantwortlich sein musste. Demzufolge eignete sich die Ad-CMV-GL Infektion

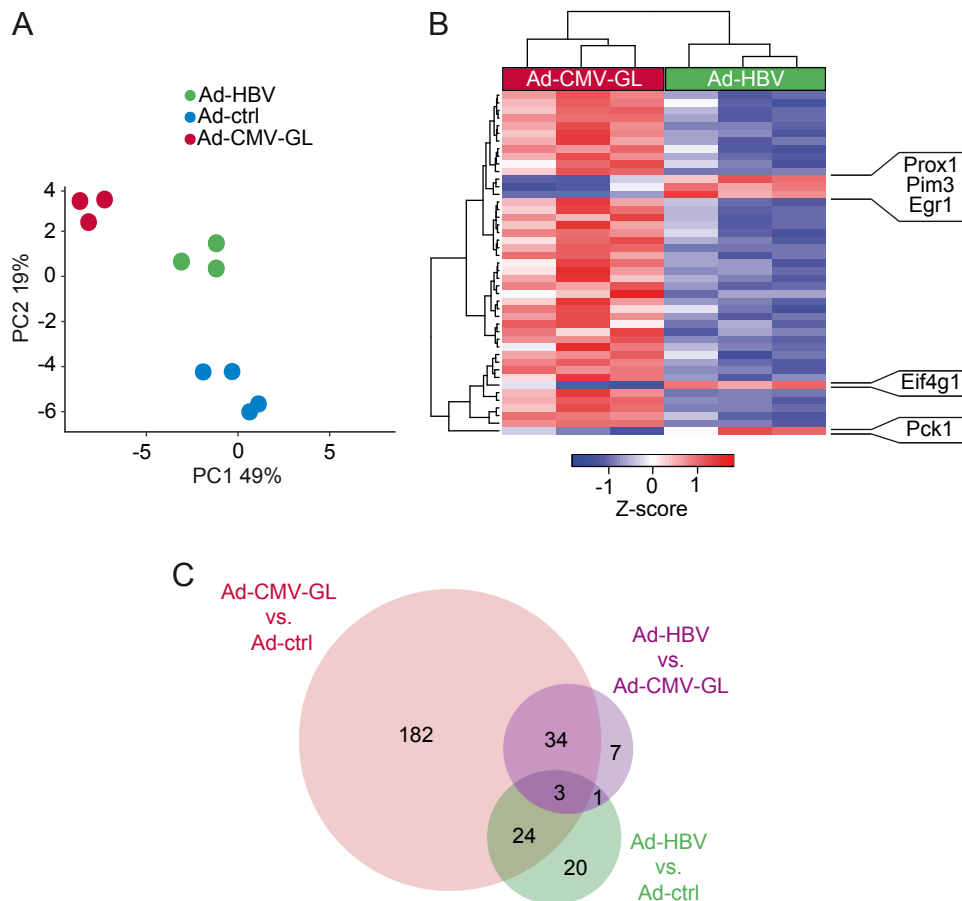
### 3. Ergebnisse

perfekt als Ausgangspunkt für diesen Vergleich. Insgesamt wurden nur 45 Gene gefunden, die sich zwischen der Ad-CMV-GL und der Ad-HBV 1.3 Infektion signifikant unterschieden (**Abbildung 15B**, siehe Anhang 6.3: Tabelle 2). Davon waren 40 runterreguliert nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion im Vergleich zu einer Ad-CMV-GL Infektion. Von diesen 40 waren 35 Gene nach einer Ad-CMV-GL Infektion im Vergleich zu Ad-ctrl hochreguliert, wovon wiederum 11 Gene (u.a. die 5 am stärksten runter regulierten Gene im Vergleich von Ad-HBV 1.3 zu Ad-CMV-GL: Ccne1, Cdc20, Ckn1a, Cdk1, Aurka) dem KEGG<sup>50</sup> Signalweg „Zellzyklus“ zugeordnet werden konnten (siehe Anhang 6.3: Tabelle 2) (Kanehisa 2019). Es scheint, dass der durch Ad-CMV-GL aktivierte Zellzyklus bei Ad-HBV 1.3 nicht in demselben Maße induziert wurde. Allerdings fehlten bei Ad-HBV 1.3 nicht alle Änderungen auf transkriptioneller Ebene, welche nach einer Ad-CMV-GL Infektion beobachtet werden konnten, und so waren 27 der 48 Gene, welche nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion im Vergleich zur Ad-ctrl Infektion verändert waren (hoch oder runter reguliert), auch nach einer Ad-CMV-GL Infektion verändert (**Abbildung 15C**, siehe Anhang 6.3: Tabelle 3 und 4). Der Phänotyp der Ad-HBV 1.3 Infektion konnte in Bezug auf die fehlende Sensibilisierung gegenüber TNF-vermittelter Apoptose nicht durch ein generelles Fehlen der Virus-induzierten Änderungen auf transkriptioneller Ebene erklärt werden.

---

<sup>50</sup> engl.: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 15** mRNA Sequenzierung nach Infektion mit Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 oder Ad-ctrl

(A-C) Sequenzierung von mRNA aus dem Lebergewebe mittels Illumina-Technologie, 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 oder Ad-ctrl (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*),  $n=3-4$  Mäuse pro Gruppe; (A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) des Transkriptom, PC1-Hauptkomponente 1, PC2-Hauptkomponente 2, mit den entsprechenden Varianzen der Hauptkomponenten; (B) Heatmap und hierarchische Gruppierung der differentiell exprimierten Gene (DEG<sup>51</sup>) ( $\log_2FC=0,66$ ) nach Ad-HBV 1.3 Infektion im Vergleich zu Ad-CMV-GL Infektion, hoch-regulierte Gene sind markiert; (C) Venn Diagramm der DEGs ( $\log_2FC=0,66$ ) aus den Vergleichen Ad-CMV-GL vs. Ad-ctrl, Ad-HBV 1.3 vs. Ad-ctrl und Ad-HBV 1.3 vs. Ad-CMV-GL zur Darstellung der Schnittmengen der Virus-vermittelten Änderungen zwischen den einzelnen Infektionen.

Interessanter sind allerdings speziell die hoch-regulierten Gene nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion im Vergleich zu einer Ad-CMV-GL Infektion. Da HBV die Sensibilisierung aktiv umgeht, ist es naheliegend, dass die HBV Replikation zur Induktion eines Gens oder Gen-Sets führt, welches für diese Inhibition verantwortlich ist. Lediglich fünf Gene waren nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion hochreguliert im Vergleich zu einer Ad-CMV-GL Infektion (**Abbildung 15B, Tabelle 1**). Dabei haben vier dieser fünf Gene eine elementare Funktion in den zellulären Prozessen der Translation, Zelldifferenzierung und Proliferation (**Tabelle 1**). Das zentrale Protein für die Induktion von Protein-

<sup>51</sup> engl.: differentially expressed genes

### 3. Ergebnisse

Translation, sowie dadurch auch für Proliferation und Zellüberleben, ist mTOR (Watanabe, Wei et al. 2011). Darüber hinaus ist eines der hoch-regulierten Gene in Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen, das Eif4g1, direkt mit mTOR korreliert. Somit stellt sich die Frage, ob HBV über eine Interaktion mit dem mTOR Signalweg die virus-induzierte Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose inhibiert. In der Tat existieren bereits Daten, dass der mTOR-Inhibitor Rapamycin die Sensibilisierung in Ad-CMV-GL infizierten Mäusen inhibieren kann (Dr. Dirk Wohlleber, nicht-publizierte Daten), was diese Hypothese weiter untermauert.

**Tabelle 1** Hoch-regulierte DEGs ( $\log_2FC=0,66$ ) und deren Funktion in Ad-HBV 1.3 infizierten Lebern im Vergleich zu Ad-CMV-GL

Gen	Log <sub>2</sub> FC	p-Value	Funktion	Referenz
Egr1	1,415	$2,28 \times 10^{-14}$	- Leber-Regeneration - Mitogenese - Proliferation	(Magee and Zhang 2017) (Zeng, Sun et al. 2005) (Wang, Guan et al. 2015)
Pim3	0,771	$4,83 \times 10^{-5}$	- inhibiert Apoptose - Proteinsynthese	(Li, Popivanova et al. 2006) (Beharry, Mahajan et al. 2011)
Prox1	0,733	$6,89 \times 10^{-5}$	- embryonale Entwicklung - Zellüberleben - HBV Replikation	(Burke and Oliver 2002) (Chang and Teng 2018) (Qin, Zhai et al. 2009)
Eif4g1	0,692	$7,70 \times 10^{-6}$	- aktiviert durch mTOR - Protein-Translation	(Ramirez-Valle, Braunstein et al. 2008)
Pck1	0,670	$4,38 \times 10^{-4}$	- Gluconeogenese - oxidativer Stress Apoptose	(Reshef, Hanson et al. 1970) (Liu, Jin et al. 2018)

#### 3.3.5 Beteiligung von Mitophagie an der fehlenden Sensibilisierung nach Ad-HBV 1.3 Infektion

Neben einer Induktion der Proteintranslation hat eine mTOR-Aktivierung auch die Inhibierung der Autophagie/Mitophagie zu Folge, und steuert den Energiemetabolismus (Bartolome, Garcia-Aguilar et al. 2017, Thomas, Zhang et al. 2018). Dadurch ist es wiederum an der Regulation der mitochondrialen Aktivität

### 3. Ergebnisse

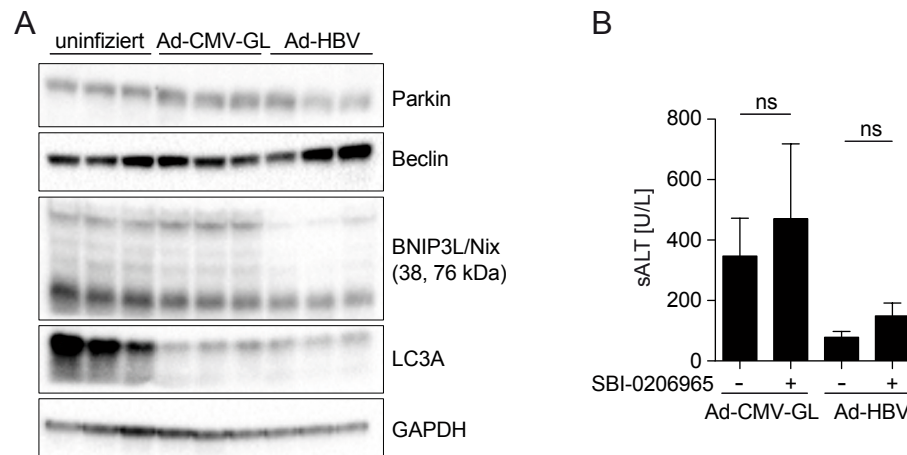
beteiligt, auf deren Ebene die Inhibierung der Sensibilisierung stattfindet (*siehe Abbildung 13*).

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Sensibilisierung auf der Ebene der Mitochondrien in den Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen wäre eine mTOR-bedingte erhöhte Mitophagie in den infizierten Hepatozyten. Der Prozess der Mitophagie würde zu einer Eliminierung vor allem der dysfunktionalen Mitochondrien führen, und auch zu einer verstärkten Erneuerung der Mitochondrien. Somit würden die weniger belastbaren Mitochondrien, welche nach einer Adenovirus-Infektion entstehen, immer wieder abgebaut und durch neue Mitochondrien ersetzt werden. Dadurch kann eine Sensibilisierung auf mitochondrialer Ebene gar nicht erst zu Stande kommen. Mitophagie findet als Teil der Autophagie statt und es wurde bereits gezeigt, dass sich HBV die Autophagie für die eigene Replikation zu Nutze macht. Bereits bekannt ist, dass HBV zum einen die zelluläre Autophagie Maschinerie auf verschiedenen Ebenen aktiviert und von ihr Gebrauch macht (Sir, Tian et al. 2010, Li, Liu et al. 2011, Zhang, Chen et al. 2014), aber auch eine erhöhte Expression von ganz bestimmten Autophagie-Proteinen wie Beclin-1 induziert (Tang, Da et al. 2009). Im Gegensatz dazu entdeckten Lin et al., dass HBV Partikel über den Prozess der Autophagie auch degradiert werden können (Lin, Wu et al. 2019), was bedeutet, dass ein kompletter Autophagie-Prozess kontraproduktiv für die Effizienz der Produktion von Viruspartikeln ist. Somit bleibt die exakte Rolle der Autophagie in der HBV Replikation und Pathogenese noch offen. Bestätigt ist bislang, dass eine komplette Inhibierung der Autophagie die HBV Replikation *in vivo* mindert (Tian, Sir et al. 2011).

Um die Autophagie bzw. Mitophagie Prozesse in den infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden zunächst die Proteinlevel ausgewählter Autophagie (Parkin, Beclin-1, LC3-A) und eines Mitophagie Proteins (BNIP3L/Nix) in Leberlysaten von infizierten Mäusen untersucht. Jedoch konnte für keines dieser Proteine eine erhöhte Expression in Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen detektiert werden (**Abbildung 16A**). Lediglich das Proteinlevel des Homodimers von BNIP3L/Nix war reduziert, nicht jedoch das Monomer, in den Lebern von Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen im Vergleich zu Ad-CMV-GL und uninfizierten Mäusen (**Abbildung 16A**). Die Mengen an LC3-A in den Lebern der Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen waren deutlich reduziert im Vergleich zu den uninfizierten Mäusen, was aber auch nach einer Ad-CMV-GL Infektion zu beobachten war (**Abbildung 16A**). Zusammenfassend scheint die Autophagie bzw. Mitophagie nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion in der Leber nicht verstärkt zu werden, wenn überhaupt lässt sich nach Infektion eine negative Regulation beobachten. Darüber hinaus, gibt es auf Proteinebene keinen Unterschied in den Autophagie-

### 3. Ergebnisse

Proteinen zwischen einer Ad-CMV-GL und Ad-HBV 1.3 Infektion, was gegen die Hypothese spricht, dass eine verstärkte Autophagie bzw. Mitophagie der Grund für das Fehlen der Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion ist.



**Abbildung 16** Rolle der Mitophagie für die Sensibilisierung von infizierten Mäusen gegenüber TNF-vermittelter Apoptose

(A,B) 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GL und Ad-HBV 1.3 (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*) wurden folgende Analysen durchgeführt: (A) Detektion von Autophagie/Mitophagie Proteinen (Parkin, Beclin, BNIP3L/Nix, LC3A) in der Western Blot Analyse der Leberlysate, GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert; (B) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation (400 ng TNF/Maus *i.v.*), Behandlung mit SBI-0206965 1 Tag vor und 1 Tag nach Infektion, n=4 Mäuse pro Gruppe, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM, die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von n=2 unabhängigen Experimenten.

Nichtsdestotrotz könnte eine HBV-induzierte Verstärkung der Autophagie stattfinden, auch ohne messbare Änderungen auf der Proteinebene. Deswegen wurde die Relevanz der Autophagie für die Sensibilisierung der Hepatozyten nach einer Virus-Infektion auch *in vivo* untersucht. Dazu wurden Mäuse mit dem selektiven ULK1/ULK2-Inhibitor SBI-0206965 behandelt. ULK1 ist ein zentrales Protein für die Initiation der Autophagie, und somit wird durch dessen Inhibierung die komplette Autophagie-Maschinerie in den Zellen inhibiert (Zhang, Ouyang et al. 2018). Bei den Ad-CMV-GL infizierten Mäusen gab es keinen Unterschied in der TNF-vermittelten Erhöhung der sALT-Werte nach der Behandlung mit dem ULK1/ULK2 Inhibitor SBI-0206965 (**Abbildung 16B**). Eine Inhibierung der Autophagie führte demzufolge nicht zu einer weiteren Verstärkung der Sensibilisierung der Hepatozyten. Bei den Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen konnte keine erhöhte sALT nach TNF-Behandlung gemessen werden, unabhängig von der Behandlung mit dem ULK1/ULK2 Inhibitor SBI-0206965

### 3. Ergebnisse

(**Abbildung 16B**). Auch bei der Ad-HBV 1.3 Infektion konnte somit die Inhibierung der Autophagie keine Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose induzieren, was eine Beteiligung der Autophagie bzw. Mitophagie an der Inhibierung der Sensibilisierung durch HBV ausschließt.

Allerdings ist zu erwähnen, dass die gemessenen sALT-Werte für die Positivkontrolle (Ad-CMV-GL Infektion ohne Inhibitor-Behandlung) nach TNF-Applikation deutlich niedriger sind, als das generell für diese Tiere beobachtet wird. Normalerweise liegen die sALT-Werte vier Stunden nach TNF-Behandlung von Ad-CMV-GL infizierten Tieren, welche dadurch gegenüber TNF-induzierter Apoptose sensibilisiert werden, zwischen 1500 U/L und 2500 U/L. Natürlich kann es zwischen den Experimenten auch größere Schwankungen geben, aber sALT-Werte deutlich unter 1000 U/L sprechen generell entweder für eine schlechte Infektion oder eine Inhibierung der Sensibilisierung bzw. der Apoptose-Induktion. Die Infektionseffizienz wurde durch die Messung der Biolumineszenz *in vivo* (Luziferase-Expression) überprüft und zeigte eine erfolgreiche Infektion im erwarteten Bereich (Daten nicht gezeigt). Die Kontrolltiere ohne Inhibitor-Behandlung wurden aber trotzdem mit dem Lösungsmittel des Inhibitors, Dimethylsulfoxid (DMSO), behandelt. DMSO wird unter anderem bei der Kultivierung von Hepatozyten eingesetzt, um die Viabilität in Langzeitkulturen zu erhalten (Bour, Ward et al. 1996). Es ist bekannt, dass DMSO mit der Apoptose-Induktion interagiert und dadurch die Lebensdauer der primären Hepatozyten-Kultur verlängert (Banic, Nipic et al. 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DMSO auch *in vivo* eine Medikamenten-vermittelte Zelltod-Induktion inhibieren kann (Park, Smith et al. 1988, Bruck, Aeed et al. 1999). Somit können die beobachteten, niedrigen sALT Werte der Ad-CMV-GL infizierten Mäusen nach TNF-Applikation durch die Apoptose-inhibierende Wirkung von DMSO erklärt werden. Allerdings bleibt dann zu bedenken, dass das verabreichte DMSO auch eine Apoptose-fördernde Wirkung des Mitophagie-Inhibitors SBI-0206965 verringern oder maskieren könnte.

#### 3.3.6 Relevanz der HBV Proteine für die Inhibierung der Sensibilisierung

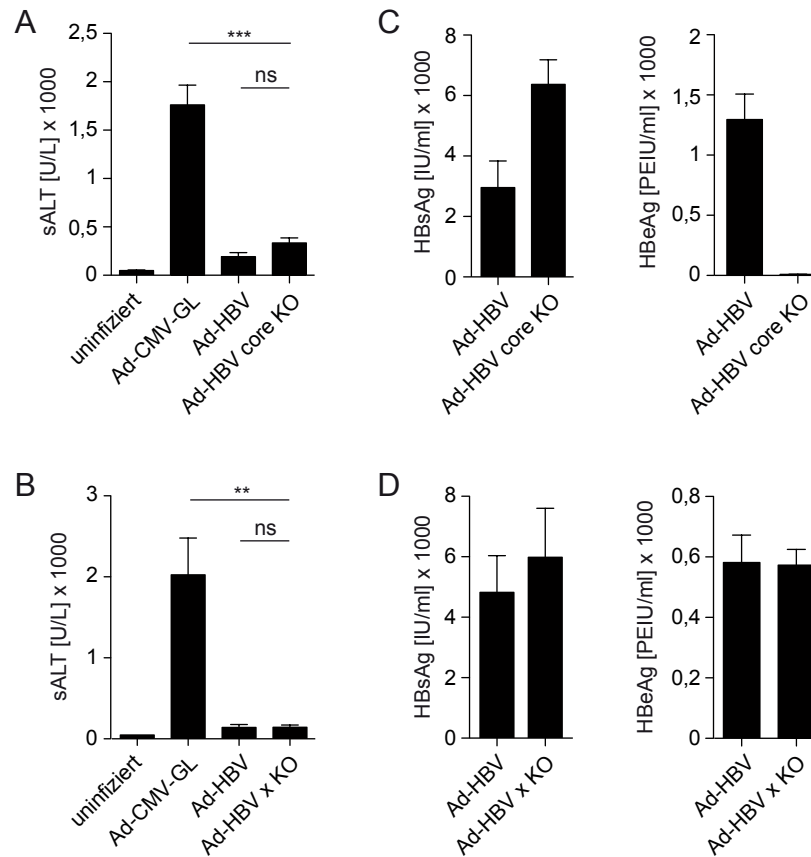
Neben der Untersuchung der Virus-vermittelten Veränderungen in der infizierten Zelle soll auch das HBV Protein identifiziert werden, welches für die Inhibierung der virus-vermittelten Sensibilisierung gegenüber TNF-induzierter Apoptose verantwortlich ist. Das HBV-Genom kodiert für vier verschiedene Proteine, das S-Antigen, das core Protein, das x Protein und eine Polymerase.

### 3. Ergebnisse

In vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass das HBV S-Antigen nicht für die Inhibierung der Sensibilisierung verantwortlich ist, da auch infizierte Hepatozyten, welche das HBV S-Antigen überexprimierten, sensibel auf TNF reagierten (Dr. Dirk Wohlleber, nicht-publizierte Daten). Um die Relevanz von HBV core Protein und HBV x Protein für die Inhibierung der Sensibilisierung zu untersuchen wurden Ad-HBV 1.3 Konstrukte verwendet, welche einen Knockout für das jeweilige Protein haben. Dazu wurde in den entsprechenden Gensequenzen ein Stopp-Codon nach dem Start-Codon eingefügt, um das jeweilige Protein zu eliminieren, aber die Aminosäuren-Sequenz der restlichen HBV Proteine nicht zu verändern. Jedoch führte weder ein Knockout des core Proteins noch des x Proteins zu einer Sensibilisierung der Ad-HBV 1.3 infizierten Mäuse gegenüber TNF-vermittelter Apoptose, was sich durch das Fehlen eines Anstiegs in den gemessenen sALT-Werten nach TNF Behandlung auszeichnete (**Abbildung 17A,B**). Der Erfolg der Infektion wurde durch die Serum-Werte von HBV S Antigen und HBV e Antigen überprüft. Vergleichbare Werte für HBV S Antigen konnten im Blut von Ad-HBV 1.3, Ad-HBV 1.3 core KO und Ad-HBV 1.3 x KO infizierten Mäusen detektiert werden, sowie vergleichbare Werte von HBV e Antigen im Blut von Ad-HBV 1.3 und Ad-HBV 1.3 x KO infizierten Mäusen (**Abbildung 17C,D**). Das spricht für eine vergleichbare Infektionseffizienz der verwendeten Ad-HBV 1.3 Virus Konstrukte. Zudem bestätigte das Fehlen von HBV e Antigen im Blut von Ad-HBV 1.3 core KO infizierten Mäusen den beabsichtigten Knockout des HBV core Proteins (**Abbildung 17C**). Darüber hinaus wurde der jeweilige Gen-Knockout durch die Sequenzierung des entsprechenden, für die Virusproduktion verwendeten, Plasmids bestätigt. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass weder das core Protein noch das x Protein für die Inhibierung der Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose verantwortlich ist.



### 3. Ergebnisse



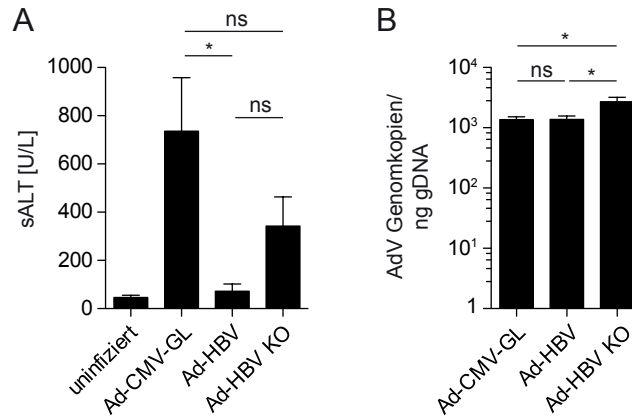
**Abbildung 17** Infektions-vermittelte Sensibilisierung bei verschiedenen HBV Knockout-Konstrukten

(A-D) 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 oder Ad-HBV 1.3 Knockout-Konstrukten (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*) wurden folgende Analysen durchgeführt: (A,B) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation (400 ng TNF/Maus *i.v.*); (C,D) HBsAg und HBeAg Level im Blutserum der infizierten Mäuse. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus  $n=4$  unabhängigen Experimenten;  $n=4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Die Relevanz der HBV Polymerase für die Inhibierung der Sensibilisierung konnte mit derselben Methode nicht untersucht werden, da ein Knockout der HBV Polymerase auch die Expression aller anderen HBV Proteine beeinträchtigt hätte. Alternativ dazu wurde ein komplettes Ad-HBV 1.3 KO Konstrukt verwendet, bei welchem jedes HBV Protein durch ein Stopp-Codon nach dem Start-Codon in der entsprechenden HBV Gensequenz eliminiert wurde. Dadurch findet nach Infektion nur noch die RNA-Transkription und die Initiation der Proteinsynthese statt. Es werden aber weder funktionale HBV Proteine gebildet, noch findet eine komplette HBV Replikation mit Produktion infektiöser Viruspartikel in den infizierten Hepatozyten statt. Die Infektion von Mäusen mit Ad-HBV 1.3 KO und folgender TNF-Behandlung führte zu einem Anstieg in den sALT Werten von 54% im Vergleich zu einer Ad-CMV-GL Infektion (**Abbildung 18A**). Die Sensibilisierung der Hepatozyten fand teilweise statt.

### 3. Ergebnisse

Die Infektionseffizienz von Ad-CMV-GL und Ad-HBV 1.3 war vergleichbar, nur die Effizienz der Ad-HBV 1.3 KO Infektion war etwas höher (**Abbildung 18B**), was aber in diesem Rahmen keine Auswirkung auf die Sensibilisierung oder dessen Inhibierung haben sollte.



**Abbildung 18** Sensibilisierung nach Ad-HBV 1.3 KO Infektion

(**A,B**) 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 oder Ad-HBV 1.3 KO (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*) wurden folgende Analysen durchgeführt: (**A**) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation (400 ng TNF/Maus *i.v.*); (**B**) Quantifizierung der adenoviralen Genomkopien pro ng gDNA im Lebergewebe. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n=2$  unabhängigen Experimenten;  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$ .

Das bedeutet, dass die HBV Proteine für die Inhibierung der Sensibilisierung verantwortlich sind. Allerdings lassen sich aus diesen Ergebnissen keine eindeutigen Schlüsse ziehen, da bereits gezeigt wurde, dass die Virus-vermittelte Genexpression an sich elementar ist für die Sensibilisierung in infizierten Hepatozyten. Somit könnte ganz generell die fehlende starke Proteinexpression nach Ad-HBV 1.3 KO Infektion dafür verantwortlich sein, dass die Hepatozyten-Sensibilisierung nur teilweise induziert wird, obwohl der inhibierende Effekt der HBV Proteine fehlt. Die zu beobachtende, verbleibende Sensibilität der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose könnte durch die Regulation des HBV Promoters und der stattfindenden RNA-Transkription verursacht werden. Für eine Interpretation der Ad-HBV 1.3 KO Daten ist es erforderlich, die Beteiligung von virus-vermittelter RNA-Transkription und Protein-Translation an der Hepatozyten-Sensibilisierung zu kennen.

### 3. Ergebnisse

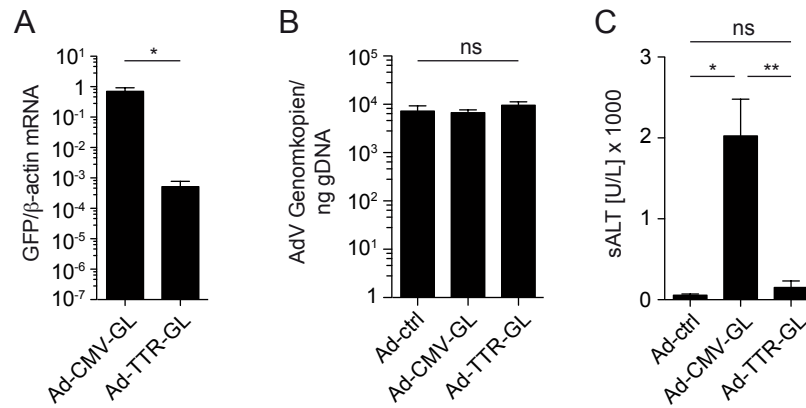
#### 3.4 Rolle von Transkription und Translation für die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Virus-Infektion an sich noch keine Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose induziert, sondern erst die Virus-vermittelte Transgen-Expression (*siehe Abbildung 4*). Allerdings ist noch unklar, welche Rolle die Stärke des Promoters bzw. die produzierte Proteinmenge spielt. Darüber hinaus kann es auch eine unterschiedliche Beteiligung der RNA-Transkription und der Protein-Translation an der Sensibilisierung geben.

##### 3.4.1 Relevanz der produzierten Proteinmenge für die Sensibilisierung der Hepatozyten

Die Rolle der produzierten Menge an Protein, beziehungsweise der Stärke des verwendeten Promotors, für die virus-induzierte Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose wurde durch den Vergleich zweier Promotoren genauer untersucht. Dazu wurde die Expression der Transgene unter dem CMV-Promotor (Ad-CMV-GL) mit der Regulation eines TTR-Promotors verglichen. Dabei sind die kodierten Transgene identisch, nur der CMV-Promotor wurde gegen den TTR-Promotor getauscht (Ad-TTR-GL). Der verwendete CMV Promotor (immediate early CMV Promotor und Enhancer) ist ein sehr starker Promotor, welcher eine andauernde Proteinexpression, unabhängig von zellulären Regulatoren ermöglicht. Dagegen ist der TTR-Promotor ein endogener, Hepatozyten-spezifischer Promotor, dessen Aktivität von zellulären Transkriptionsfaktoren reguliert wird und dessen Expressionsstärke weit hinter der des CMV-Promotors liegt (Guo, Wang et al. 1996, Wang and Burke 2010). Um die Stärke der verwendeten Promotoren zu prüfen wurde die mRNA-Menge von eGFP in den Lebern von Ad-CMV-GL und Ad-TTR-GL infizierten Mäusen relativ zur endogenen  $\beta$ -actin mRNA quantifiziert. Die produzierte mRNA-Menge in den Ad-CMV-GL infizierten Mäusen war 1000-fach höher als in den Ad-TTR-GL infizierten (**Abbildung 19A**), was den großen Unterschied in der Promotor-Stärke bestätigte. Um auszuschließen, dass der beobachtete Unterschied in den mRNA-Level auf einen Unterschied in den Infektionseffizienzen zurückzuführen war, wurde diese anhand der adenoviralen Genomkopien in der Leber, nach Ad-CMV-GL und Ad-TTR-GL Infektion, überprüft. Jedoch zeigten beide Viren eine vergleichbare Infektionseffizienz (**Abbildung 19B**), weswegen der Unterschied in den mRNA-Level auf die unterschiedliche Stärke der verwendeten Promotoren zurückzuführen war.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 19** Einfluss des Promotors auf die Sensibilisierung nach Virus-Infektion

(A-C) 2 Tage nach Infektion mit Ad-ctrl, Ad-CMV-GL oder Ad-TTR-GL (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*) wurden folgende Analysen durchgeführt: (A) Quantifizierung der eGFP mRNA relativ zu  $\beta$ -actin mRNA im Lebergewebe. (B) Quantifizierung der adenoviralen Genomkopien pro ng gDNA im Lebergewebe. (C) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation (400 ng TNF/Maus *i.v.*). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus 2 unabhängigen Experimenten;  $n=4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$  und \*\*  $p \leq 0.01$ .

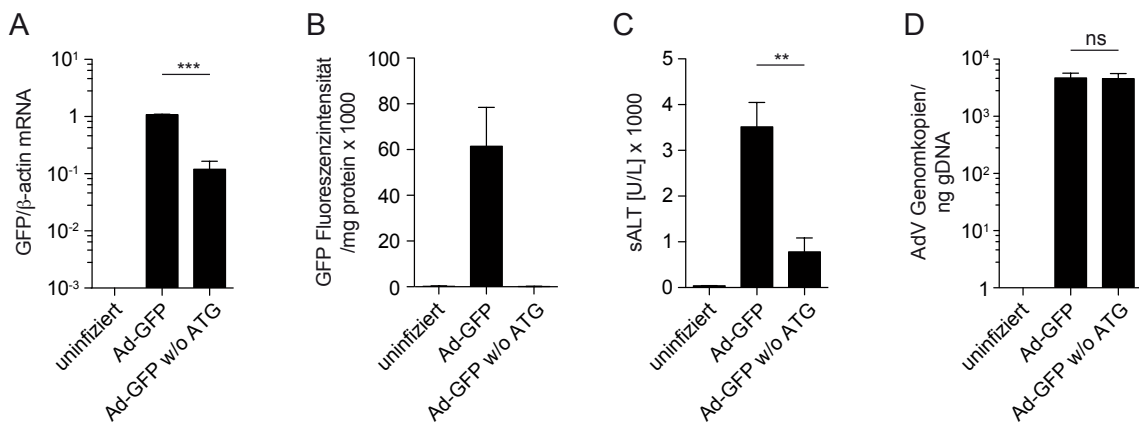
Nach der Applikation von TNF zeigten lediglich die Ad-CMV-GL infizierten Mäuse einen starken Anstieg in den sALT-Werten (**Abbildung 19C**). Dagegen war in den Ad-TTR-GL infizierten Mäusen nur ein sehr kleiner Anstieg in den sALT-Werten detektierbar, welcher zwar höher war als in den Ad-ctrl infizierten Kontrollmäusen, sich jedoch nicht signifikant von diesen unterschied (**Abbildung 19C**). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose von der Promotorstärke und somit von der produzierten Proteinmenge abhängt. Allerdings bleibt ausgehend von diesen Ergebnissen unklar, ob die Stärke der Sensibilisierung linear mit der produzierten Proteinmenge korreliert oder ob es einen Grenzwert für die Proteinexpression gibt, über welchem die Sensibilisierung unabhängig von der weiteren Proteinmenge immer gleich stark ausgeprägt ist.

#### 3.4.2 Relevanz der RNA-Transkription und der Protein-Translation für die Sensibilisierung der Hepatozyten

Da die Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose von einer starken Genexpression induziert wird, soll außerdem die Frage geklärt werden, ob die Transkription oder die Translation der kritische Schritt für die Sensibilisierung ist. Dazu wurde ein Adenovirus konstruiert, der nur für eGFP kodiert und dessen

### 3. Ergebnisse

Expression vom CMV-Promotor gesteuert wird. Allerdings wurden alle Start-Codons (ATG) zu Stop-Codons mutiert, sowohl die im Leseraster (ORF<sup>52</sup>) von eGFP als auch die in einem anderen ORF (Ad-GFP w/o ATG). Somit findet die RNA-Transkription vermittelt über den CMV-Promotor statt (**Abbildung 20A**), aber keine Protein-Translation (**Abbildung 20B**). Dieser Virus wurde mit einem Ad-GFP verglichen, welcher für das eGFP unter den CMV-Promotor kodiert und sowohl Transkription als auch Translation von eGFP ermöglicht (**Abbildung 20A,B**).



**Abbildung 20** Einfluss von Transkription und Translation auf die Sensibilisierung von Hepatozyten

(A-D) 2 Tage nach Infektion mit Ad-GFP oder Ad-GFP w/o ATG (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*) wurden folgende Analysen durchgeführt: (A) Quantifizierung der eGFP mRNA relativ zu  $\beta$ -actin mRNA im Lebergewebe. (B) Fluoreszenz-Intensität von eGFP im Leberlysat. (C) sALT Messung 4 Stunden nach TNF-Applikation (400 ng TNF/Maus *i.v.*). (D) Quantifizierung der adenoviralen Genomkopien pro ng gDNA im Lebergewebe. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n=2$  unabhängigen Experimenten;  $n=4$  Mäuse pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Nach Infektion und TNF-Behandlung der Mäuse wurde bei den Ad-GFP infizierten Mäusen ein deutlicher Anstieg in den sALT Werten gemessen (**Abbildung 20C**). Aber auch bei den Ad-GFP w/o ATG infizierten Mäusen wurde ein Ansteigen der sALT Werte detektiert, allerdings nur bis zu maximal 1/3 des Anstiegs in Vergleich zu einer Ad-GFP Infektion (**Abbildung 20C**). Die Infektionseffizienz war jedoch bei beiden Infektionen vergleichbar (**Abbildung 20D**) und somit keine Erklärung für die Unterschiede in den beobachteten sALT Werten. Die Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose wird somit hauptsächlich durch die Virus-

<sup>52</sup> engl.: open reading frame

### 3. Ergebnisse

vermittelte Protein-Translation induziert, aber auch die RNA-Transkription trägt einen kleineren Anteil zur Sensibilisierung bei.

Die gesamte Virus-vermittelte Proteinexpression induziert die Sensibilisierung in Hepatozyten, ist aber wiederum abhängig von der Stärke der Proteinexpression. Offen bleibt die Frage, wodurch die virale Proteinexpression in den Hepatozyten erkannt wird und schließlich zu einer verminderten Belastbarkeit der Mitochondrien führt, und dadurch die Zellen gegenüber Apoptose sensibilisiert.

## 4. Diskussion

Virale Infektionen der Leber gehen meist mit einer Hepatitis, einer Leberentzündung, einher, welche während des Fortschreitens der Krankheit oder der Bekämpfung der Krankheitsursache durch das Immunsystem entsteht. Verantwortlich für diese Entzündung ist der Zelltod von Hepatozyten, welcher wiederum von zytotoxischen T Lymphozyten ausgelöst wird (Herzer, Sprinzl et al. 2007). Virus-spezifische CD8 T Zellen erkennen Virus-infizierte Hepatozyten durch eine direkte Interaktion mit Antigen/MHC I-Komplexen auf den Zielzellen. Der Zelltod wird dann entweder durch eine FasL/Fas-Interaktion oder die Freisetzung von Perforin und GranzymB induziert (Lowin, Hahne et al. 1994, Chavez-Galan, Arenas-Del Angel et al. 2009).

Alternativ dazu ist die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion beschrieben, die darauf basiert, dass virus-spezifische CD8 T Zellen virale Antigene erkennen, welche auf nicht-infizierten sinusoidalen Endothelzellen (LSEC<sup>53</sup>) kreuz-präsentiert werden. Daraufhin wird TNF freigesetzt, welches zur Induktion von Apoptose in den infizierten Hepatozyten führt (Wohlleber, Kashkar et al. 2012). Da es sich hierbei um eine kontakt-unabhängige CD8 T Zell Antwort handelt kann die Apoptose-Induktion nicht allein durch die Bindung von TNF an den Hepatozyten erfolgen, da TNF auch an nicht-infizierte Hepatozyten bindet. Die Entscheidung, ob die Zelle in Apoptose geht muss in den infizierten Hepatozyten selbst stattfinden, eine zell-intrinsische Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten gegenüber TNF-vermitteltem Zelltod.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die virus-vermittelte Genexpression in den infizierten Hepatozyten die Belastbarkeit der Mitochondrien soweit reduziert, dass die Zelle in einen vor-apoptotischen Zustand versetzt wird. Die Mitochondrien fungieren somit als Sensoren der Virus-Infektion und sind für die Spezifität der Immunantwort verantwortlich. Die Apoptose der infizierten Hepatozyten wird erst durch die Bindung von TNF an den TNFR I ausgelöst. Eine HBV Infektion dagegen inhibiert die Virus-Erkennung auf der Ebene der Mitochondrien und umgeht somit die Eliminierung der infizierten Hepatozyten durch die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion. Zusammenfassend wird nochmal die besondere Rolle der Mitochondrien bei der Erkennung einer Virus-Infektion und als Schaltstelle für die Entscheidung über Leben und Tod der Hepatozyten verdeutlicht.

---

<sup>53</sup> engl.: liver sinusoidal endothelial cells

### 4.1 Mitochondrien als Sensoren der Adenovirus-Infektion in Hepatozyten

Mitochondrien sind beteiligt an der Erkennung verschiedenster Pathogene. Über die RIG-I ähnlichen Rezeptoren (RLR<sup>54</sup>) wird vor allem virale RNA erkannt (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). Daraufhin wird das Signal über MAVS weitergeleitet, um eine Aktivierung von NF $\kappa$ B und IRF3 zu induzieren. In dessen Folge werden inflammatorische Zytokine und Interferon Typ I gebildet, was eine weitere Immunantwort, mit dem Ziel der Eliminierung der Virus-Infektion, induziert (Cloonan and Choi 2013, Koshiba 2013). MAVS ist an den Mitochondrien lokalisiert und beschreibt die Plattform der RLR-Signalweiterleitung. Die Effizienz der Weiterleitung des Signals hängt stark von der mitochondrialen Aktivität ab, wie beispielsweise von der Teilung und Fusion von Mitochondrien, dem mitochondrialen Membranpotential oder der Mitophagie (Tal, Sasai et al. 2009, Yasukawa, Oshiumi et al. 2009, Koshiba, Yasukawa et al. 2011). Somit ist die Induktion einer anti-viralen Immunantwort nach der Erkennung von Viren durch RLRs abhängig von der mitochondrialen Aktivität (Koshiba 2013). Darüber hinaus sind Mitochondrien auch an der Erkennung von beispielsweise bakteriellen Infektionen über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR<sup>55</sup>) und NOD-ähnliche Rezeptoren (NLR<sup>56</sup>) beteiligt, wobei die ausgelöste Inflammasom-Aktivierung durch mitochondriales ROS induziert bzw. verstärkt wird (Cloonan and Choi 2013). Jedoch konnte in vorangegangenen Studien eine Beteiligung der bekannten Mustererkennungsrezeptoren (PRRs<sup>57</sup>) an der Sensibilisierung von Hepatozyten, in Folge einer viralen Infektion, gegenüber TNF-vermittelter Apoptose ausgeschlossen werden (Janas 2015). Dadurch stellt sich die Frage, ob es noch einen weiteren Mechanismus gibt, durch welchen eine Virus-Infektion zell-intrinsisch erkannt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Mitochondrien nicht nur an der Signalweiterleitung nach der Virus-Erkennung beteiligt sind, sondern auch direkt eine Infektion erkennen und mit einer Veränderung in ihrer Funktionalität darauf reagieren, was die Zellen in einen vor-apoptischen Zustand versetzt. Jedoch handelt es sich bei den Änderungen in der mitochondrialen Aktivität nicht um einen auf den ersten Blick sichtbaren Phänotyp, da der Metabolismus, die Energieproduktion, die Lipidzusammensetzung und Membranfluidität, sowie die Morphologie der Mitochondrien nach einer Adenovirus-Infektion unverändert bleiben (*siehe*

---

<sup>54</sup> engl.: RIG-I like receptor

<sup>55</sup> engl.: Toll-like receptor

<sup>56</sup> engl.: NOD-like receptor

<sup>57</sup> engl.: pattern recognition receptors



#### 4. Diskussion

*Abbildungen 5-7*) (Janas 2015). Allerdings würden deutliche Änderungen in der Morphologie, Membranfluidität und Lipidzusammensetzung, oder Funktionalität nicht toleriert werden. Fehlfunktionen werden, soweit dies möglich ist, durch eine kontinuierliche Erneuerung, Teilung und Fusion der Mitochondrien repariert. Sollten die Schäden allerdings irreparabel sein, so werden die betroffenen Mitochondrien durch Mitophagie eliminiert, bevor die folgenden Schäden zum Tod der Zelle führen (Yoo and Jung 2018). Ein starker mitochondrialer Phänotyp hätte sogar eine Entzündungsreaktion, Apoptose oder Autophagie zur Folge (Green, Galluzzi et al. 2011). Der hier beschriebene vor-apoptotische Zustand der Zellen ist dagegen durch viel subtilere Änderungen in der mitochondrialen Funktionalität charakterisiert.

Der vor-apoptotische Zustand infizierter Zellen kommt durch eine Reduktion der mitochondrialen Belastbarkeit zu Stande. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass zum einen die mitochondriale Aktivität über einen längeren Zeitraum unter dauerhafter Aktivierung nachlässt, was bei Mitochondrien aus uninfizierten Mäusen nicht der Fall ist (*siehe Abbildung 8*). ADP ist ein Substrat für die mitochondriale ATP Synthase und im eigentlichen Sinne keine Stress-Situation für Mitochondrien. Allerdings scheinen die Mitochondrien aus virus-infizierten Hepatozyten eine andauernde hohe Aktivität nicht mehr aufrechterhalten zu können. Übereinstimmend damit, zeigen die Mitochondrien aus Virus-infizierten Lebern auch eine höhere Sensibilität gegenüber Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Nach einer Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$  verlieren Mitochondrien aus infizierten Lebern deutlich schneller ihre mitochondriale Integrität und das mitochondriale Membranpotential im Vergleich zu Mitochondrien aus uninfizierten Mäusen (*siehe Abbildung 9*). Diese verringerte Belastbarkeit führt dazu, dass ein TNFR I induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, welches in uninfizierten Zellen von den Mitochondrien toleriert werden kann, in den infizierten Hepatozyten zu einer mitochondrialen Permeabilitätstransition (mPT<sup>58</sup>) und in deren Folge zur mPT-vermittelten Apoptose führt.

Ein vergleichbarer Phänotyp konnte bis jetzt noch nicht für eine Infektion oder andere Krankheiten beschrieben werden. In Studien, welche die Calcium-Sensitivität von Mitochondrien und eine mPT-vermittelte Apoptose untersuchen, wurden bis jetzt lediglich der Einfluss verschiedener Reagenzien (Phosphat, CyclosporinA, CCCP u.v.m.) oder Zell-Stress (pH-Wert, ER Stress, oxidativer Stress) auf die Mitochondrien beschrieben (Bernardi, Vassanelli et al. 1992, Kowaltowski, Castilho et al. 1996, Halestrap, Connern et al. 1997, Halestrap, Woodfield et al. 1997, Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008, Kon, Satoh et al. 2017). Darüber hinaus zeigen Studien, dass eine

---

<sup>58</sup> engl.: mitochondria permeability transition

#### 4. Diskussion

gestörte Calcium-Homöostase, nicht aber eine veränderte Belastbarkeit der Mitochondrien, in verschiedenen Zellen eine erleichterte mPT und in deren Folge Apoptose ermöglicht. Das trägt wiederum zum Krankheitsbild verschiedener neurologischer Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson bei (Norenberg and Rao 2007). Somit wird in der vorliegenden Arbeit eine völlig neue funktionale Ebene von Mitochondrien in der Erkennung von Virus-Infektionen und Apoptose-Regulation beschrieben, basierend auf einer Änderung in der mitochondrialen Funktionalität.

Eine mögliche Ursache für die geringere Belastbarkeit der Mitochondrien nach einer Adenovirus-Infektion könnte ein erhöhter Energiebedarf durch die Virus-vermittelte Genexpression darstellen. Die verwendeten Adenoviren kodieren für Marker-Proteine reguliert durch den starken CMV Promotor. Die produzierte mRNA-Menge entspricht in etwa dem Level an endogenem  $\beta$ -actin (*siehe Abbildung 10E*). Das sollte für die sehr produktiven Hepatozyten an sich kein Problem darstellen, darf aber auch nicht außer Acht gelassen werden, da  $\beta$ -actin auch ein stark exprimiertes Gen ist (Rui 2014, Rojas-Hernandez, Veliz et al. 2019). Zum einen könnte der erhöhte Energiebedarf dazu führen, dass die Mitochondrien durchgehend maximale Aktivität zeigen und dadurch bioenergetisch überfordert und in der Folge ausgelaugt sind. Das würde eine geringere Belastbarkeit der Mitochondrien erklären. Zudem zeigen die isolierten Lebermitochondrien fast keinerlei Reservekapazität<sup>59</sup> nach der Entkopplung durch CCCP (*siehe Abbildung 6*), was wiederum dafürspricht, dass diese Mitochondrien bereits maximal aktiv sind und einen weiteren Energiebedarf nicht mehr abdecken können. Des Weiteren könnte eine Steigerung des Energiebedarfs zur verstärkten Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien führen, was speziell für die beobachtete Steigerung in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der isolierten Mitochondrien eine Erklärung wäre (*siehe Abbildung 9*).  $\text{Ca}^{2+}$  in Mitochondrien ist wichtig für die Aufrechterhaltung und Aktivierung der Elektronentransportkette und Energieproduktion (Rizzuto, De Stefani et al. 2012, Spinelli and Haigis 2018). Somit könnte ein erhöhter Energiebedarf, bspw. durch eine Adenovirus-Infektion, zu einer verstärkten Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien führen und dadurch die Produktivität der Mitochondrien steigern. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit keinerlei Unterschied in der oxidativen Phosphorylierung oder Produktivität zwischen Mitochondrien aus Adenovirus-infizierten und uninfizierten Lebern detektiert werden (*siehe Abbildung 6 und 7*), was gegen eine erhöhte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Ursache für die verminderte Belastbarkeit der Mitochondrien spricht.

---

<sup>59</sup> engl.: spare respiratory capacity

#### 4. Diskussion

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Mitochondrien nach einer Adenovirus-Infektion ist eine verminderte Pufferkapazität der Mitochondrien für  $\text{Ca}^{2+}$ . Diese Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität konnte auch bereits in isolierten Mitochondrien gezeigt werden (Dr. Fabiana Perocchi und Dr. Dirk Wohlleber, nicht-publizierte Daten). Die Regulation des freien  $\text{Ca}^{2+}$  in den Mitochondrien geschieht über die  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme durch den MCU<sup>60</sup>, den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Mitochondrien über NCLX<sup>61</sup> und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffersystem der Mitochondrien (Baughman, Perocchi et al. 2011, De Stefani, Raffaello et al. 2011, Wei, Liu et al. 2012). Freies  $\text{Ca}^{2+}$  ist in Zellen ein sehr potentes Signalmolekül, dessen Konzentration streng reguliert werden muss. Meist geschieht dies über  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine, wie Calreticulin im ER oder CALNUC im Golgi-Apparat, jedoch ist für die Mitochondrien ein solches nicht beschrieben (Prins and Michalak 2011). Nichtsdestotrotz muss freies  $\text{Ca}^{2+}$  auch in den Mitochondrien gebunden werden, da  $\text{Ca}^{2+}$  zum einen entscheidend ist für die Aktivität der Elektronentransportkette, aber auch für die Induktion der mPT, die zum Zelltod führt (Bhosale, Sharpe et al. 2015). In den Mitochondrien wird  $\text{Ca}^{2+}$  durch Phosphat, in Form eines unlöslichen Salzes, gebunden und in Calcium-Phosphat-Körnchen gespeichert (Nicholls and Chalmers 2004). Der genaue Mechanismus von Bildung und Abbau dieser Speicher-Körnchen, sowie deren exakte Zusammensetzung ist jedoch noch unklar (Solesio 2018). Darüber hinaus erschwert die Bildung von unlöslichem Calcium-Phosphat-Salz, sowie das fehlende Wissen über Bildung und Abbau der Speicher-Körnchen, die exakte Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Ursache für die verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität von Mitochondrien. Somit kann nicht final geklärt werden, ob die verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität zu Stande kommt, da schon mehr  $\text{Ca}^{2+}$  als Calcium-Phosphat in den Mitochondrien vorliegt, oder ob in den Mitochondrien nach einer Adenovirus-Infektion weniger Phosphat zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  zur Verfügung steht. Nichtsdestotrotz ist eine Sättigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffers in Mitochondrien und die dadurch verbleibende verringerte Pufferkapazität eine plausible Erklärung für die verringerte Belastbarkeit und erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität von Mitochondrien nach einer Adenovirus-Infektion. Einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  hebt die Konzentration an freiem, mitochondrialem  $\text{Ca}^{2+}$  dann deutlich schneller auf ein Level, welches zu Öffnung der mPTP führt, und zur Induktion von Apoptose spezifisch in Adenovirus-infizierten Hepatozyten.

---

<sup>60</sup> engl.: mitochondria calcium uniporter

<sup>61</sup> engl.: sodium-calcium exchanger

### 4.2 TNF-induzierte Apoptose in Adenovirus-infizierten Hepatozyten

Die verringerte Belastbarkeit von Mitochondrien nach einer Adenovirus-Infektion, charakterisiert durch eine verstärkte Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ , sensibilisiert die Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose. Dabei ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte mPT das zentrale Ereignis in der Induktion der Apoptose. Die TNF-vermittelte Apoptose kann durch CyclosporinA inhibiert werden, einem Inhibitor der mPT welcher die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an CyclophilinD und dadurch die Öffnung der mPT-Pore verhindert (*siehe Abbildung 3B*). Das untermauert die zentrale Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  und der mPT für die nicht-kanonische CD8 T Zell Effektor-Funktion, sowohl bei der Sensibilisierung der Mitochondrien als auch bei der TNF-vermittelten Apoptose. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die TNF-vermittelte Apoptose nach Adenovirus-Infektion unabhängig von Caspase 8 abläuft.

Die klassische TNF-vermittelte Apoptose-Induktion in Hepatozyten verläuft über die Aktivierung von Caspase 8, was zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt und schließlich die Effektor-Caspase 3 aktiviert (Varfolomeev, Schuchmann et al. 1998, Galluzzi, Vitale et al. 2018). In Adenovirus-infizierten Hepatozyten hingegen wird die Apoptose durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte mPT ausgelöst, was in deren Folge zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt. Erst durch die folgende Aktivierung von Caspase 3 scheint es dann auch zur Spaltung von Caspase 8 zu kommen, was vor allem durch die zeitgleiche Spaltung von Caspase 3 und Caspase 8 (Janas 2015) sowie der Inhibierung der Caspase 8 Aktivierung durch Cyclosporin A (*siehe Abbildung 3C*) gezeigt werden konnte. Darüber hinaus kann, laut aktuellem Wissensstand, Apoptose nur in Abwesenheit von  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalaktivierung oder Apoptose-Inhibitoren stattfinden (Leist, Gantner et al. 1994, Van Antwerp, Martin et al. 1996, Kreuz, Siegmund et al. 2001, Galluzzi, Vitale et al. 2018). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Adenovirus-infizierten Hepatozyten sowohl Apoptose-Inhibitoren vorhanden sind, als auch  $\text{NF}\kappa\text{B}$  nach TNF Stimulation aktiviert wird (Janas 2015). Das kann wiederum eine Erklärung für die zunächst fehlende Caspase 8 Aktivierung nach TNF Stimulation sein und bestätigt die Notwendigkeit eines alternativen Signalwegs unabhängig von der klassischen TNF-induzierten Apoptose.

In der Literatur ist bereits ein solcher Alternativweg beschrieben, der auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten, mPT-vermittelten Apoptose beruht. Pinton et. al konnten zeigen, dass Ceramid *in vitro* zu einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER führt und daraufhin eine mPT induziert, was eine Induktion der Apoptose zur Folge hat (Pinton, Ferrari et al.

#### 4. Diskussion

2001). Das Ceramid wird nach TNF-Stimulation durch die Sphingomyelinase (ASMase<sup>62</sup>) gebildet und leitet dann die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER ein (Colell, Morales et al. 2002). In einer vorangegangenen Studie konnte aber bereits beobachtet werden, dass auch in Adenovirus-infizierten ASMase-Knockout Mäusen TNF den Zelltod in Hepatozyten induziert (Dr. Dirk Wohlleber, nicht-publizierte Daten). In der vorliegenden Arbeit wird also ein weiterer Apoptose-induzierender Signalweg beschrieben. TNFR I Stimulation führt zur membrannahen Produktion von ROS durch die NADPH-Oxidase. Das produzierte ROS führt zu einer Aktivierung von PLC $\gamma$ , was wiederum die Produktion von IP<sub>3</sub> katalysiert. IP<sub>3</sub> bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor am ER und vermittelt die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER, was wiederum in den Mitochondrien eine mPT induziert (*siehe Abbildung 3* und Dr. Dirk Wohlleber und Marcus Brugger, nicht-publizierte Daten). Daraufhin wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt, was die Apoptose in den Adenovirus-infizierten Hepatozyten auslöst. Darüber hinaus ist bereits ein mPT-vermittelter Zelltod-Signalweg beschrieben und offiziell in die Liste der programmierten Zelltod-Signalwege aufgenommen (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Dieser beruht auf einer Ca<sup>2+</sup>-induzierten mPT-vermittelten Nekrose (Galluzzi, Kepp et al. 2016). Allerdings beschränken sich diese Studien darauf, dass der Zelltod durch Ca<sup>2+</sup> ausgelöst und durch Cyclosporin A inhibiert werden kann (Zamzami, Larochette et al. 2005). Es wird lediglich angenommen, dass es daraufhin immer zur Nekrose kommen muss, wobei die Relevanz von Caspasen in diesem Zusammenhang nicht untersucht wurde. Somit könnte der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Apoptose-induzierende Signalweg auch eine mögliche mechanistische Grundlage für den bereits akzeptierten mPT-vermittelten Zelltod-Signalweg darstellen.

Ein von Caspase 8 unabhängiger Apoptose-Signalweg würde allerdings gegen die Relevanz von Bax oder tBid für die Apoptose-Induktion sprechen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die Bax Level in Mitochondrien nach einer Adenovirus-Infektion erhöht sind und die Mitochondrien auch eine verstärkte Freisetzung von Cytochrom C nach tBid Behandlung zeigen (Janas 2015). Allerdings gibt es auch eine Verbindung von Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie zur Regulation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Demnach beeinflussen sowohl anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2, als auch pro-apoptotische Proteine wie Bax die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im ER (Pinton, Giorgi et al. 2008), und könnten dadurch auch Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte mPT nehmen. Somit schließen sich eine Caspase 8-

---

<sup>62</sup> engl.: acidic sphingomyelinase

#### 4. Diskussion

unabhängige Apoptose und eine Bcl-2 Protein-Familie-beeinflusste Apoptose nicht kategorisch aus.

Zusammenfassend wird, ausgehend von den gezeigten Ergebnissen, ein völlig neuer Signalweg zur Induktion der TNF-vermittelten Apoptose vorgeschlagen. Nach einer Adenovirus-Infektion übersetzten die Mitochondrien, welche sich durch eine verminderte Belastbarkeit gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  in einem vor-apoptotischen Zustand befinden, die TNFR I-induzierten Signale anders als Mitochondrien in den nicht-infizierten Hepatozyten, und antworten mit einer mitochondrialen Permeabilitätstransition. Somit resultiert die Induktion der Apoptose nicht etwa aus verstärkten Zelltod-Signalen oder verminderten Überlebens-Signalen, sondern aus einer veränderten Übersetzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf der Ebene der Mitochondrien. Das wiederum liefert auch gleich eine Erklärung für die Notwendigkeit eines weiteren Apoptose-Signalwegs. Für viele Viren, wie HIV, HBV oder ein replikationskompetentes Adenovirus, ist bereits beschrieben, dass diese mit der klassischen Apoptose-Induktion interferieren und diese entweder fördern oder inhibieren (Zhou, Jiang et al. 2017). Dadurch ermöglichen sich diese Viren die Rahmenbedingungen für eine optimale Replikation und Aufrechterhalten der Virus-Infektion. Für eine erfolgreiche Eliminierung solcher Virus-Infektionen durch das Immunsystem wäre es also von Vorteil einen alternativen Apoptose-Signalweg zur Verfügung zu haben, welcher unabhängig ist von einer  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung, intrazellulären Apoptose-Inhibitoren und den klassischen pro-apoptotischen Bcl-2-ähnlichen Proteinen. Darüber hinaus werden die Vorteile der Apoptose, wie beispielsweise die Eliminierung von infizierten Zellen ohne Induktion einer Inflammation, gegenüber anderen Zelltod-Signalwegen wie der Nekroptose beibehalten (Pasparakis and Vandenabeele 2015).

#### **4.3 Änderungen in der mitochondrialen $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität ausgelöst durch virus-vermittelte Genexpression**

Entscheidend für die Etablierung des vor-apoptotischen Zustands von Hepatozyten ist eine starke, virus-vermittelte Genexpression. Bei einer schwachen Genexpression bzw. einem völligen Fehlen ebendieser kommt es nicht zur Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose (*siehe Abbildung 19C*). Unklar bleibt allerdings, wie diese starke, virus-vermittelte Genexpression zu einer verringerten Belastbarkeit der Mitochondrien führt. Generell ist für die Genexpression, sowohl Transkription als auch Translation, Energie nötig, die wiederum von den

#### 4. Diskussion

Mitochondrien produziert werden muss. Sollte ein erhöhter Energiebedarf aufkommen, ändert sich das Verhältnis von ATP zu ADP, was wiederum als Signal für eine Verstärkung der Energieproduktion dient (Reichert, Schaller et al. 1978, Mor, Cheung et al. 2011). Somit kann die Genexpression direkt die mitochondriale Produktivität beeinflussen. Darüber hinaus würde sich daraus auch die schrittweise Etablierung der Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose durch Transkription und Translation erklären. Für die Sensibilisierung von Hepatozyten sind Transkription und Translation verantwortlich (*siehe Abbildung 20C*), wobei beide Prozesse Energie benötigen. Die Stärke der Sensibilisierung wäre demnach von der Höhe des Energiebedarfs abhängig. Allerdings konnte keine Steigerung in der Aktivität und Produktivität der Mitochondrien nach Virus-Infektion beobachtet werden, was dieser Hypothese widerspricht.

Jedoch gibt es mehrere Berührungspunkte und regulatorische Mechanismen zwischen Transkription, Translation und Mitochondrien, welche eine Verbindung von Genexpression und mitochondrialer Funktion darstellen können. Zum einen wird die Expression der mitochondrialen Proteine, welche im Nukleus kodiert sind, mit der Expression der Proteine, welche auf der mitochondrialen DNA kodiert sind, abgestimmt. Eine Induktion der nuklear-kodierten mitochondrialen Proteine führt zeitverzögert auch zu einer Aktivierung der mitochondrialen Genexpression und stellt somit eine direkte Verbindung von zellulärer Genexpression und den Mitochondrien dar (Couvillion, Soto et al. 2016). Darüber hinaus müssen natürlich auch von den Mitochondrien Signale an den Nukleus überbracht werden können. Das geschieht beispielsweise über den retrograden Signalweg. Dabei werden Signale wie ein Verlust der mitochondrialen DNA oder eine Veränderung in der Nährstoffverfügbarkeit, über die retrograden Regulationsproteine (RTGs) in den Nukleus weitergeleitet. Dort wird als Antwort eine Genexpression eingeleitet, welche beispielsweise zur Aktivierung von mitochondrialen Proteinen führt. Bis jetzt ist aber immer noch unklar, wie die Information aus den Mitochondrien heraustransportiert und auf die RTGs im Zytosol übertragen wird (Eisenberg-Bord and Schuldiner 2017). Generell gibt es bei der Kommunikation zwischen Nukleus und Mitochondrien noch viele ungeklärte Fragen, was eine weitere Untersuchung der Kommunikation im Zusammenhang mit einer virus-vermittelten Sensibilisierung von Hepatozyten erschwert.

Betrachtet man die komplette Genexpression, dann gibt es verschiedenste regulatorische Ebenen, welche alle die Komplexität der Genexpression und des daraus resultierenden Proteoms erhöhen. Angefangen bei der Zugänglichkeit der DNA, der Komposition des Promotors und der Enhancer-Regionen, das Spleißen bis zur Bindung

#### 4. Diskussion

der Ribosomen an die mRNA und deren Halbwertszeit, sowie posttranslationale Modifikationen, alle beeinflussen die Expressionsstärke und Funktion der finalen Proteine (Walsh, Garneau-Tsodikova et al. 2005, de Klerk and t Hoen 2015, Radhakrishnan and Green 2016). Außerdem werden bei diesen Prozessen Signalproteine an die mRNA assoziiert, wodurch die mRNA immer in mRNA-Protein-Komplexen vorliegt. Beispielsweise binden während Transkription, Spleißen und Kernexport die verschiedensten Proteine an die mRNA, wovon einige bis zur Initiation der Translation gebunden bleiben (Singh, Pratt et al. 2015). Diese gelangen dadurch auch vom Kern bis ins Zytosol, und somit auch in die Nähe der energieliefernden Mitochondrien. Zusammenfassend beeinflusst der Promotor, verantwortlich für die Initiation und Regulation der Transkription, auch die Zusammensetzung der exportierten mRNA-Protein-Komplexe, deren Lokalisation und Translation (Zid and O'Shea 2014, Espinar, Schikora Tamarit et al. 2018). Der virale Promotor könnte auf diesem Wege auch die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose beeinflussen. In den beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit Ad-CMV-GL zu einer Sensibilisierung führt, eine Infektion mit Ad-TTR-GL hingegen nicht (*siehe Abbildung 19C*). Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist die deutlich schwächere Genexpression ausgehend vom TTR Promotor im Vergleich zum CMV Promotor. Allerdings könnte auch der Promotor selbst für die Etablierung der Sensibilisierung verantwortlich sein und nicht nur die durch den Promotor bestimmte Expressionsstärke. Zum einen könnte der Unterschied in der Herkunft des Promotors liegen, viral oder endogen, oder in dessen Regulation. Der verwendete minimale CMV Promotor ist ein starker Promoter, welcher in fast allen Zellen zu einer dauerhaften, starken Genexpression führt (Guo, Wang et al. 1996, Chung, Andersson et al. 2002), wohingegen der TTR Promotor ein Hepatozyten-spezifischer Promotor ist, welcher der zellulären Regulation unterworfen ist und spezifisch an- und abgeschaltet werden kann (Wang and Burke 2010). Es muss also noch geklärt werden, ob ein starker endogener und regulierter Promotor oder ein schwacher viraler Promotor in einem Adenovirus-Konstrukt nach Infektion zu einer Sensibilisierung der Hepatozyten führt, um die Bedeutung des Promotors für die Sensibilisierung zu verstehen.

Eine weitere Möglichkeit, wie eine virale Genexpression die mitochondriale Belastbarkeit beeinflussen kann, ist über eine virus-vermittelte Veränderung im zellulären Transkriptom, oder ganz allgemein über verschiedenste Virus-Wirt-Interaktionen. Die Infektion selbst oder die Virus-kodierten Proteine können Einfluss nehmen auf die zelluläre Genexpression und die Aktivierung verschiedener Prozesse (Sir, Tian et al. 2010, Kropp, Hsieh et al. 2015, Graham and Faizo 2017). Besonders



#### 4. Diskussion

wenn die Viren für ihre eigene Replikation auf verschiedenste zelluläre Prozesse angewiesen sind, wie die Proteine der S-Phase für die DNA-Replikation, die Ribosomen für die Proteinsynthese oder die oxidative Phosphorylierung für die Energieproduktion (Bagga and Bouchard 2014, Sanchez and Lagunoff 2015). Eine Infektion führt dann oft zur Hochregulation ebendieser Proteine, was wiederum unter anderem auch mitochondriale Funktionen beeinflussen kann. Allerdings findet die beobachtete Sensibilisierung von Hepatozyten nicht nur bei einer Ad-CMV-GL Infektion statt, welche nur zu einer Expression der Markergene eGFP und Luziferase führt, und eben nicht zur Adenovirus-Replikation und Adenovirus-Proteinexpression, sondern auch bei einer LCMV-Infektion. LCMV gehört zu einer komplett anderen Virus-Gattung und es ist sehr unwahrscheinlich, dass eine Infektion mit Ad-CMV-GL und eine LCMV-Infektion zu denselben Veränderungen im Transkriptom oder in der Aktivierung von zellulären Funktionen führen würde. Nichtsdestotrotz könnten die generellen zellulären Prozesse, welche für die erfolgreiche Virus-Replikation und Genexpression verantwortlich sind, durch die verschiedensten Viren beeinflusst werden, auch wenn sich die spezifischen transkriptionellen Veränderungen unterscheiden (Bagga and Bouchard 2014, Sanchez and Lagunoff 2015).

Das könnte beispielsweise auch ein zentraler Unterschied zwischen einer akuten Infektion und chronischen Infektionsverläufen sein. Das würde bedeuten, dass eine akute Virus-Infektion die zellulären Prozesse immer ähnlich beeinflusst, was final zu einer Sensibilisierung der infizierten Zelle gegenüber TNF-vermittelter Apoptose führen würde. Ob diese Sensibilisierung Hepatozyten-spezifisch oder auch in anderen Zelltypen zu finden ist muss allerdings noch geklärt werden. Für eine chronische Virus-Infektion, bei welchen sich die Viren besser an die Wirtszelle anpassen indem sie sich nur in geringen Maße replizieren oder eine Induktion des Immunsystems umgehen (Zuniga, Macal et al. 2015), wären die zellulären Anpassungen dann deutlich dezenter, was zur Umgehung der Sensibilisierung führen könnte. Für die Ad-HBV 1.3 Infektion, mit HBV als einem Virus mit potentiell chronischem Verlauf, wird keine Sensibilisierung der infizierten Zellen beobachtet, wodurch diese Hypothese durchaus möglich ist.

### 4.4 HBV verhindert zu Stande kommen des vor-apoptischen Zustands von Hepatozyten auf mitochondrialer Ebene

Nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion konnte zwar eine starke Genexpression beobachtet werden (*siehe Abbildung 10*), was als Auslöser für die Sensibilisierung gegenüber TNF-vermittelter Apoptose in Virus-infizierten Hepatozyten gilt, jedoch keine TNF-induzierte Apoptose in den infizierten Hepatozyten (*siehe Abbildung 11*). Das bedeutet, dass HBV einer Eliminierung durch die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion entgeht. Die Belastbarkeit der Mitochondrien wird durch die HBV Infektion nicht verändert (*siehe Abbildung 13*), wodurch diese auch nicht gegenüber TNF-vermittelter Apoptose sensibilisiert werden.

In der Literatur finden sich bereits einige Mechanismen wie HBV mit der Immunantwort interagiert und diese umgeht, was für die Entwicklung eines chronischen Infektionsverlaufs verantwortlich ist. Zum einen führen Mutationen im HBV Genom dazu, dass die HBV Epitope nicht mehr von den Immunzellen erkannt werden bzw. Therapie-induzierte Mutationen zur Wirkungslosigkeit der Medikamente (Ma and Wang 2012, Shan, Shen et al. 2017). Da der in dieser Arbeit beschriebene antivirale Mechanismus allerdings auf einer zell-intrinsischen Sensibilisierung von Hepatozyten beruht und bereits vor einer Therapie von HBV umgangen wird, ist es unwahrscheinlich, dass die beobachtete Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose auf einer Mutation im HBV Genom beruht.

Darüber hinaus ist für HBV auch bekannt, dass es die Induktion einer innate Immunantwort umgeht. Nach einer HBV-Infektion wird die Reduktion der Expression von PRRs beobachtet, ebenso wie eine verminderte Produktion antiviraler Zytokine und keine Produktion von Interferonen (Zou, Wang et al. 2016, Mutz, Metz et al. 2018). Da die Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose aber komplett unabhängig ist von einer Interferon-Antwort und der Erkennung des Virus durch PRRs (Janas 2015), kann das Umgehen der innate Immunantwort durch HBV nicht der Grund für die Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose sein. Auch ist beschrieben, dass HBV die innate Immunantwort auf noch weiteren Ebenen unterdrückt, indem es die Funktion von NK und NKT Zellen sowie die immunregulatorische Funktion von microRNAs beeinträchtigt (Zou, Wang et al. 2016). Die effiziente Eliminierung einer HBV Infektion ist abhängig von der adaptiven Immunantwort. Bei einer schwachen adaptiven Immunantwort, was beispielsweise durch die Blockade der innate Immunantwort der Fall sein kann, kann sich eine chronische Infektion etablieren (Guidotti, Isogawa et al. 2015). Es erscheint plausibel,

#### 4. Diskussion

dass HBV auch einen Mechanismus entwickelt hat um die adaptive Immunantwort und die darauffolgende Zelltod-Induktion zu inhibieren, wie beispielsweise die nicht-kanonische CD8 T-Zell Effektorfunktion. Denn es handelt sich bei der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion um einen Zweig der adaptiven Immunantwort, welche 50 % der gesamten CD8 T Zell-Effektorfunktion in Mäusen ausmacht (Wohlleber, Kashkar et al. 2012).

Der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion liegt eine zell-intrinsische Sensibilisierung in den infizierten Zielzellen zugrunde, welche von HBV auf der Ebene der Mitochondrien inhibiert wird. Deswegen muss auch die molekulare Ursache für diese Inhibierung in den Zielzellen liegen und nicht etwa in einer Änderung der Aktivität der CD8 T Zellen selbst. Das HBV Protein mit den meisten regulatorischen Funktionen und Virus-Wirt-Interaktionen ist das HBV x Protein. Für das HBV x Protein sind zahlreiche Interaktionen, sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene beschrieben, wodurch die verschiedensten zellulären Funktionen verstärkt oder beeinträchtigt werden, um eine möglichst effiziente und reibungslose HBV Replikation zu gewährleisten (Wu, Zhu et al. 2010, Guerrieri, Belloni et al. 2017). Das HBV x Protein verstärkt beispielsweise die Endozytose und Autophagie bereits auf der Ebene der RNA-Transkription bestimmter Gene und reduziert die Bildung verschiedener microRNAs, welche die HBV Replikation inhibieren würden (Tang, Da et al. 2009, Guerrieri, Belloni et al. 2017). Allerdings konnte eine Beteiligung von Autophagie an der Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose in Ad-HBV 1.3 infizierten Hepatozyten ausgeschlossen werden. Auch eine Hochregulation von Beclin-1 konnte nicht beobachtet werden (*siehe Abbildung 16*). In der Literatur hingegen ist eine Hochregulation dieses Proteins nach einer HBV Infektion beschrieben, in NTCP-HepG2 Zellen und primären humanen Hepatozyten (Guerrieri, Belloni et al. 2017). Es könnte sein, dass sich die Interaktion von HBV und Autophagie im verwendeten murinen *in vivo* Modell mit einer Ad-HBV 1.3 Infektion von den genannten *in vitro* Modellen unterscheidet. Das muss nicht bedeuten, dass Autophagie im Mausmodell generell keine Rolle für die HBV Replikation spielt, die Regulation könnte hier auf einer anderen Ebene stattfinden. Neben diesen Funktionen ist das HBV x Protein auch für einen Abbau der SMC5/6 Proteine verantwortlich. Das HBV x Protein bindet sowohl den SMC5/6 Komplex als auch die DDB1-CUL4-ROC1 E3 Ligase und induziert dadurch eine Ubiquitinierung des SMC5/6 Komplexes, was zu dessen proteasomalen Abbau führt. SMC5/6 ist Teil der DNA-Schadensantwort (DDR<sup>63</sup>) und würde zum Abbau der cccDNA führen, welche wiederum durch den Abbau des Komplexes geschützt ist

---

<sup>63</sup> engl.: DNA damage response

#### 4. Diskussion

(Murphy, Xu et al. 2016). Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass der Abbau von SMC5/6 für die Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose in HBV-infizierten Hepatozyten verantwortlich ist, da die DDR bei der Induktion der Sensibilisierung nicht beteiligt ist (Dr. Marianne Janas, nicht-publizierte Daten), und das HBV x Protein für die Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose irrelevant ist (*siehe Abbildung 17*). Bei einer Infektion mit Ad-HBV 1.3 x KO fehlt das funktionale x Protein und dadurch sollte auch SMC5/6 nicht abgebaut werden.

Es besteht noch die Möglichkeit, dass HBV direkt mit dem Apoptose Signalweg interagiert und somit die TNF-vermittelte Apoptose inhibiert. Auch bei der direkten Apoptose-Induktion sind vor allem für das HBV x Protein die verschiedensten Funktionen beschreiben, wohingegen bei den restlichen HBV Proteinen nur einzelne anti-apoptotische Mechanismen bekannt sind. Das HBV x Protein kann Apoptose direkt inhibieren, beispielsweise durch die Bindung und Blockade von p53, die Aktivierung des PI3K-Akt Signalwegs und dadurch der Zell-Proliferation, die Inhibierung von Caspase 8 und 3, die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch den Abbau von I $\kappa$ B und die Interaktion mit pro-apoptotischen nicht-kodierenden RNAs, um nur ein paar anti-apoptotische Funktionen zu nennen (Lin and Zhang 2017). Auch ist bereits beschrieben, dass die Apoptose-Inhibierung in HBV infizierten Hepatozyten durch die Aktivität von zellulären Apoptose-Inhibitoren wie cIAP1/2 vermittelt wird (Ebert, Preston et al. 2015). Im Zusammenhang mit der Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose im Rahmen der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion können aber durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bereits einige Punkte als Grund ausgeschlossen werden. Zum einen ist weder p53, noch eine Inaktivierung von NF $\kappa$ B oder ein Abbau von cIAP1/2 für die Etablierung der Sensibilisierung von infizierten Hepatozyten verantwortlich (Dr. Marianne Janas, nicht-publizierte Daten und Janas 2015), wodurch sie auch als Grund für die Inhibierung der Sensibilisierung eher nicht in Frage kommen. Zweitens konnte gezeigt werden, dass nicht ein einzelnes HBV Protein für die Inhibierung der Sensibilisierung verantwortlich ist, sondern die gesamte HBV-vermittelte Expression (Dr. Dirk Wohlleber, nicht-publizierte Daten und *siehe Abbildungen 17, 18*). Dadurch ist es auch unwahrscheinlich, dass ein Phänotyp ausgelöst allein durch das HBV x Protein für die Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose verantwortlich sein soll. Drittens würde eine spezifische Inhibierung der Caspasen 8 und 3 nicht die fehlende Verminderung in der Belastbarkeit der Mitochondrien erklären, was nur durch eine Inhibierung der Sensibilisierung der Hepatozyten ermöglicht werden kann. Schlussendlich gibt es auch im Transkriptom von Ad-HBV 1.3 infizierten Lebern keinen Hinweis darauf, dass HBV direkt die TNF-vermittelte Signalweiterleitung zur Apoptose-Induktion beeinflusst (*siehe Anhang 6.3:*

#### 4. Diskussion

*Tabelle 3*). Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Inhibierung der TNF-vermittelten Apoptose in Ad-HBV 1.3 infizierten Hepatozyten auf eine direkte Inhibierung des Apoptose Signalwegs zurückzuführen ist.

Eine naheliegende Vermutung ist jedoch, dass HBV die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose auf der Ebene der Mitochondrien einfach nicht auslöst. Allerdings gibt es mehrere Hinweise, dass dem doch ein aktiver Mechanismus zur Umgehung der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion zu Grunde liegt. Allen voran zeigt die fehlende Sensibilisierung nach einer Ad-CMV/GFP-HBV Infektion (*siehe Abbildung 14*), dass HBV die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose aktiv inhibieren muss. Andernfalls gäbe es keine Erklärung für die fehlende Sensibilisierung trotz CMV Promotor regulierter Expression des eGFP Proteins nach einer Adenovirus-Infektion. Außer in dem speziellen Fall, dass die ursprüngliche Inhibierung der Sensibilisierung nach der Infektion passiv stattfindet, und HBV nur bei Bedarf, wie im Falle einer Virus-vermittelten Genexpression, die Sensibilisierung aktiv umgeht. Ein weiterer Grund für einen aktiven Mechanismus ist die teilweise Sensibilisierung nach einer Ad-HBV 1.3 KO Infektion (*siehe Abbildung 18*). Sobald demnach keine funktionalen HBV-Proteine mehr gebildet werden, entwickelt sich eine teilweise Sensibilisierung der Hepatozyten. Nach einer Ad-HBV 1.3 KO Infektion findet immer noch die Transkription der HBV mRNAs statt und eine Induktion der Translation, welche dann aber kurz nach der Initiation wieder stoppt. Da in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden konnte, dass sowohl die Transkription, als auch die Translation zur Ausbildung der Sensibilisierung beitragen (*siehe Abbildung 20*), lässt sich aus den Ergebnissen der Ad-HBV 1.3 KO Infektion schließen, dass eine Ad-HBV 1.3 Infektion eigentlich schon zu einer Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose führen würde. Allerdings wird das von den HBV Proteinen oder ganz generell von der starken HBV Protein-Expression und der folgenden Virus-Replikation verhindert, was wiederum für ein aktives Umgehen der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion seitens HBV spricht. Diese Theorie wird weiter unterstützt durch die Beobachtung, dass die Mitochondrien aus Ad-HBV 1.3 infizierten Hepatozyten auch eine minimal erhöhte Sensitivität gegenüber  $Ca^{2+}$  zeigen, im Vergleich zur uninfizierten Kontrollgruppe (*siehe Abbildung 13*). Bei einem völligen Fehlen der Sensibilisierung von Hepatozyten würde man eher einen komplett identischen Kurvenverlauf der Ad-HBV 1.3 und uninfizierten Gruppe erwarten.

Ein weiterer Punkt, welcher für eine aktive Inhibierung der Sensibilisierung spricht sind die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung der gesamten Leber-mRNA (*siehe*

#### 4. Diskussion

*Abbildung 15*). Zum einen zeigt die PCA, dass sich die transkriptionellen Veränderungen nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion deutlich von denen nach einer Ad-ctrl Infektion unterscheiden. Wenn bei einer Ad-HBV 1.3 Infektion die Sensibilisierung generell nicht stattfinden würde, wie bei einer Ad-ctrl Infektion, dann wären die Infektions-bedingten Änderungen auf transkriptioneller Ebene nicht so deutlich verschieden. Des Weiteren zeigte der Vergleich von Ad-HBV 1.3 mit Ad-CMV-GL, dass bei einer Ad-HBV 1.3 Infektion die bei Ad-CMV-GL beobachteten Änderungen nicht einfach nur fehlen oder vermindert induziert werden, sondern dass HBV auch eine ganz individuelle transkriptionelle Signatur zeigt, welche für die Inhibierung der Sensibilisierung verantwortlich sein könnte. Insbesondere die Funktionen der hoch-regulierten Gene nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion im Vergleich zu einer Ad-CMV-GL Infektion sind interessant. Von den fünf hoch-regulierten Genen waren Pim3 und Pck1 bei Ad-CMV-GL runter-reguliert und tauchen bei den Veränderungen nach einer Ad-HBV 1.3 Infektion nur im direkten Vergleich zur Ad-CMV-GL Infektion auf (*siehe Anhang 6.3: Tabelle 2-4*). Nichtsdestotrotz kodieren 4 der 5 Gene, Egr1, Pim3, Prox1 und Eif4g1, für zentrale Proteine für Zellüberleben, Zelldifferenzierung, Entwicklung und Proteinexpression (*siehe Tabelle 1*). Diese Mechanismen werden von mTOR gesteuert, durch eine direkte Aktivierung der Protein-Translation, was sekundär das Zellüberleben und die Proliferation fördert. eIF4GI ist sogar ein direktes Zielprotein von mTOR und wird durch die Aktivierung von mTOR-Komplex 1 phosphoryliert, woraufhin es die Initiation der Translation begünstigt und entscheidend zur Zellproliferation beiträgt (Ramirez-Valle, Braunstein et al. 2008, Thoreen, Chantranupong et al. 2012). Eine mTOR Aktivierung führt auch zur Aktivierung verschiedener metabolischer Prozesse, allesamt mit dem Ziel zur Unterstützung von Translation und Zell-Proliferation (Saxton and Sabatini 2017). So hat mTOR auch einen direkten Einfluss auf den Metabolismus der Zelle und auf die Mitochondrien. Das könnte die Verbindung der HBV Infektion und der Mitochondrien sein, die zur Inhibierung der Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose führt, durch ein Aufrechterhalten der mitochondrialen Belastbarkeit.

Aus den beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass eine Verstärkung des mTOR-Komplex 1 für die Inhibierung der Sensibilisierung verantwortlich sein könnte. Allerdings widerspricht das bereits publizierten Daten, wonach eine HBV Infektion zu einer Aktivierung der Autophagie führt (Li, Liu et al. 2011), welche aber wiederum durch mTOR-Komplex 1 Aktivierung inhibiert werden würde. Wie oben erwähnt, könnte diese Unstimmigkeit auf das jeweils verwendete Modellsystem zurückzuführen sein. Alternativ wäre es auch denkbar, dass der mTOR-Komplex 1 je nach Stärke der

#### 4. Diskussion

Aktivierung oder Art des Stimulus verschiedene nachgeschaltete zelluläre Prozesse aktiviert bzw. inhibiert. Somit könnte beides denkbar sein, eine Aktivierung der Translation und die Hochregulation bestimmter Autophagie-assoziiierter Gene. Darüber hinaus könnte die Aktivierung der Autophagie nach einer HBV Infektion auch völlig unabhängig von mTOR geschehen, was wiederum eine Erklärung für beide Beobachtungen wäre. Die genaue Bedeutung von mTOR für das Umgehen der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion durch HBV muss allerdings erst noch charakterisiert werden.

#### **4.5 Translatationaler Ansatz zur Sensibilisierung von Ad-HBV 1.3 infizierten Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose**

Generell ist es für alle Viren von Bedeutung mit der infizierten Zelle zu interagieren, um die optimalen Bedingungen für die Replikation oder die Persistenz des Virus zu generieren. Allen voran ist für die virale Replikation die Bereitstellung von Energie, und DNA- und Protein-Bausteinen, sowie die Aktivierung der zellulären Genexpressions-Maschinerie von Bedeutung. Das kann entweder über eine gezielte Aktivierung der Genexpression und DNA-Replikation (für DNA-Viren), oder durch eine generelle Aktivierung des Zellzyklus erreicht werden. Deswegen ist für die verschiedensten Viren bereits beschrieben, dass sie mit der mTOR-vermittelten Translation oder mit dem Fortschritt des Zellzyklus interagieren. Beispielsweise ist für das humane CMV gezeigt, dass die Replikation nur stattfindet, wenn sich die infizierte Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus befindet. Das humane CMV induziert sogar den Eintritt in die G1-Phase und aktiviert die Expression bestimmter Gene charakteristisch für die S- und G2-Phase, ohne dass die Zelle in diese Phasen übergeht (Spector 2015). Außerdem kann es auch die Protein-Translation aktivieren, unabhängig von mTOR-Komplex 1 (Kudchodkar, Yu et al. 2004). Für HBV dagegen ist bekannt, dass es Teile der Protein-Translations-Maschinerie, wie den Initiationsfaktor eIF4E, abzieht und für andere Funktionen sozusagen zweckentfremdet (Kim, Wang et al. 2010, Ryu, Ahn et al. 2010). Natürlich können mTOR-vermittelte Protein-Translation und das Fortschreiten des Zellzyklus nicht komplett unabhängig voneinander betrachtet werden. Beide haben zwar ihre eigenen regulatorischen Mechanismen, wie die Regulation der Zellzyklus-Phasen durch die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und der Zellzyklus-Checkpoints, oder die Aktivität von mTOR durch den Inhibitor Rapamycin und posttranslationale Modifikationen, sind jedoch auch miteinander verbunden. So ist die Protein-Translation ein elementarer Bestandteil im Wachstum jeder Zelle und der

#### 4. Diskussion

Proliferation, wird aber beispielsweise während der Mitose spezifisch runterreguliert. Darüber hinaus kann CDK1 die Funktion von mTOR sogar übernehmen und auch bei einer Inhibierung von mTOR die 5'-Cap-abhängige Translations-Initiation ermöglichen (Shuda, Velasquez et al. 2015). Zudem sind beide Mechanismen, Translation und der Zellzyklus, sehr energieaufwändig und angewiesen auf die Bereitstellung von ausreichend ATP durch die Mitochondrien. Der Energiestatus der Zelle wird über die AMPK detektiert, und dann an die Mitochondrien weitergeleitet (Hardie and Lin 2017). Bei der mTOR Aktivierung gilt das Nährstoffangebot, und dadurch die Bereitstellung von Energie, als einer der Hauptaktivatoren, und im Zellzyklus sind vor jedem Phasenübergang Checkpoints, welche den Übergang erst erlauben, wenn die vorhergehende Phase erfolgreich abgeschlossen ist und genügend Energie für die nächste bereitsteht (Kim, Buel et al. 2013, Xie, Wang et al. 2019). Somit sind sowohl die Translation und der Zellzyklus, als auch die mitochondriale Aktivität eng miteinander verbunden und können über verschiedene Berührungspunkte miteinander kommunizieren.

Das legt auch die Vermutung nahe, dass sowohl die mTOR-vermittelte Protein-Translations-Maschinerie als auch die Zellzyklus-Regulation die mitochondriale Belastbarkeit beeinflussen und dadurch auch auf die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose Einfluss nehmen können. In diesen Interaktionen könnte also die molekulare Grundlage der Ad-CMV-GL-induzierten Sensibilisierung und auch der Ad-HBV 1.3-vermittelten Inhibierung ebendieser liegen. Eine Analyse der Änderungen auf Transkriptionsebene durch eine Ad-CMV-GL Infektion zeigte, dass durch die Infektion der Zellzyklus bzw. bestimmte Funktionen des Zellzyklus aktiviert werden. Bei der Analyse der differentiell exprimierten Gene (DEGs) konnten die KEGG-Signalwege Zellzyklus und DNA-Replikation, dessen Gene auch dem Signalweg Zellzyklus zugordnet werden, als die am stärksten hoch-regulierten Signalwege identifiziert werden (*siehe Anhang 6.4: Abbildung 21 und Anhang 6.3 Tabelle 4*). Allerdings konnte eine direkte Beteiligung der Zellzyklus-Checkpoints an der Etablierung der Sensibilisierung von Hepatozyten ausgeschlossen werden (Dr. Marianne Janas, nicht-publizierte Daten). Hingegen bei einer Ad-HBV 1.3 Infektion war der Zellzyklus im Vergleich weit weniger aktiviert, dafür gibt es Hinweise auf eine Verstärkung des mTOR Signalwegs und der Protein-Translation (*siehe Tabelle 1*). Eine mögliche Hypothese ist, dass Ad-CMV-GL Teile des Zellzyklus hoch-reguliert, wie die Zellzyklus regulierenden CDKs, um eine optimale Virus-vermittelte Genexpression zu ermöglichen. Durch die CDK-regulierte Genexpression wird eine Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose induziert. Wie bereits oben beschrieben, konnte der genaue Mechanismus dazu aber



#### 4. Diskussion

noch nicht identifiziert werden. Dagegen könnte HBV eine optimale Genexpression und Replikation, laut den Hinweisen aus den vorgelegten Experimenten, durch die Aktivierung von mTOR ermöglichen, was jedoch nicht die Belastbarkeit der Mitochondrien beeinflusst. Dann würde sich die Etablierung einer Sensibilisierung von Hepatozyten durch die Mechanismen entscheiden, welche zur optimalen viralen Genexpression und Replikation aktiviert werden. Diese Hypothese würde sich mit der Beobachtung, dass die Sensibilisierung abhängt von der RNA-Transkription und noch mehr von der Protein-Translation, vereinen lassen. Für weitere Untersuchungen muss aber allen voran noch die Bedeutung von mTOR bei der Ad-HBV 1.3 Infektion und von CDK-regulierten Prozessen für die Ad-CMV-GL Infektion, sowie der Zusammenhang dieser Mechanismen mit der mitochondrialen Belastbarkeit gezeigt werden. Sollte sich diese Hypothese aber bestätigen, so könnte man hepatische Virus-Infektionen in zwei Klassen unterteilen. Die einen, die wie Ad-CMV-GL zu einer Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose führen. Und die anderen, wie das angepasste Ad-HBV 1.3, welche der Sensibilisierung durch die Wahl anderer zellulären Angriffspunkte entgehen. HBV würde somit die Eliminierung durch die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion durch sorgfältig gewählte Virus-Wirt-Interaktionen umgehen.

Ein weiterführendes Ziel dieser Arbeit ist es, nach der Identifikation der molekularen Mechanismen, welche der Sensibilisierung nach einer Ad-CMV-GL Infektion und auch des Umgehens der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion durch HBV zu Grunde liegen, einen Weg zu finden, um HBV-infizierte Hepatozyten wieder gegenüber TNF-vermittelter Apoptose zu sensibilisieren. Sollte sich die mTOR-Aktivierung als Grund für die fehlende Sensibilisierung der Hepatozyten herausstellen, so könnte man therapeutisch genau an dieser Stelle eingreifen, den zu Grunde liegenden Mechanismus inhibieren und dadurch die Zellen gegenüber TNF-vermittelter Apoptose sensibilisieren. Dadurch wäre eine Eliminierung der HBV-infizierten Zellen durch TNF, im Rahmen der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion, möglich und eine chronische HBV Infektion könnte vielleicht vollständig geheilt werden. Vor allem vor dem Hintergrund, dass alle HBV-infizierten Zellen intrinsisch sensibilisiert werden würden, ohne dass eine Präsentation der Infektion nach außen hin nötig wäre.

#### 4. Diskussion

Zusammenfassend konnte mit der nicht-kanonischen CD8 T Zell-Effektorfunktion ein weiterer antiviraler Mechanismus zur Unterstützung des Immunsystems beschrieben werden, um Virus-Infektionen in der immun-toleranten Leber eliminieren zu können. Nach einer hepatotropen Infektion führt die virale Genexpression zur Etablierung eines vor-apoptotischen Zustands der Zellen, welcher sich durch eine Verminderung der Belastbarkeit der Mitochondrien auszeichnet. Dieser vor-apoptotische Zustand mindert die Signalstärke, die nötig ist, um eine mitochondriale Permeabilitätstransition auszulösen und in deren Folge den Zelltod des infizierten Hepatozyten durch Apoptose. Zum einen können dadurch selektiv infizierte Hepatozyten eliminiert werden, ohne Kollateralschäden durch immunpathologische Prozesse, auch wenn die verantwortlichen Viren die klassische Apoptose bzw. die klassische CD8 T Zell Effektorfunktion unterdrücken. Darüber hinaus kann so auch die Effektorfunktion von nur wenigen Antigen-spezifischen CD8 T Zellen deutlich verstärkt werden, um eine große Zahl an infizierten Zellen zu eliminieren. Allerdings entwickeln Viren zu fast jedem antiviralen Mechanismus des Immunsystems eine Strategie, diesen zu umgehen. So verhindert HBV die Etablierung des vor-apoptotischen Zustands auf der Ebene der Mitochondrien und entkommt der Eliminierung durch die nicht-kanonische CD8 T Zell-Effektorfunktion.

## 5. Literaturverzeichnis

Amodeo, G. F., M. E. Solesio and E. V. Pavlov (2017). "From ATP synthase dimers to C-ring conformational changes: unified model of the mitochondrial permeability transition pore." Cell Death Dis **8**(12): 1.

Bagga, S. and M. J. Bouchard (2014). "Cell cycle regulation during viral infection." Methods Mol Biol **1170**: 165-227.

Bagur, R. and G. Hajnoczky (2017). "Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling." Mol Cell **66**(6): 780-788.

Banic, B., D. Nipic, D. Suput and I. Milisav (2011). "DMSO modulates the pathway of apoptosis triggering." Cell Mol Biol Lett **16**(2): 328-341.

Bartolome, A., A. Garcia-Aguilar, S. I. Asahara, Y. Kido, C. Guillen, U. B. Pajvani and M. Benito (2017). "MTORC1 Regulates both General Autophagy and Mitophagy Induction after Oxidative Phosphorylation Uncoupling." Mol Cell Biol **37**(23).

Baughman, J. M., F. Perocchi, H. S. Girgis, M. Plovanich, C. A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X. R. Bao, L. Strittmatter, O. Goldberger, R. L. Bogorad, V. Kotliansky and V. K. Mootha (2011). "Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter." Nature **476**(7360): 341-345.

Beharry, Z., S. Mahajan, M. Zemskova, Y. W. Lin, B. G. Tholanikunnel, Z. Xia, C. D. Smith and A. S. Kraft (2011). "The Pim protein kinases regulate energy metabolism and cell growth." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 528-533.

Berg, J. M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2007). Biochemistry, 6th edition. New York, W. H. Freeman and Company.

Bernardi, P., S. Vassanelli, P. Veronese, R. Colonna, I. Szabo and M. Zoratti (1992). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations." J Biol Chem **267**(5): 2934-2939.

Bhosale, G., J. A. Sharpe, S. Y. Sundier and M. R. Duchon (2015). "Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death." Ann N Y Acad Sci **1350**: 107-116.

## 5. Literaturverzeichnis

Bonora, M., C. Morganti, G. Morciano, G. Pedriali, M. Lebedzinska-Arciszewska, G. Aquila, C. Giorgi, P. Rizzo, G. Campo, R. Ferrari, G. Kroemer, M. R. Wieckowski, L. Galluzzi and P. Pinton (2017). "Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F1FO ATP synthase dimers and C-ring conformation." EMBO Rep **18**(7): 1077-1089.

Bour, E. S., L. K. Ward, G. A. Cornman and H. C. Isom (1996). "Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in hepatocytes in long-term culture." Am J Pathol **148**(2): 485-495.

Brand, M. D. and D. G. Nicholls (2011). "Assessing mitochondrial dysfunction in cells." Biochem J **435**(2): 297-312.

Brenner, D., H. Blaser and T. W. Mak (2015). "Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die." Nat Rev Immunol **15**(6): 362-374.

Bruck, R., H. Aeed, H. Shirin, Z. Matas, L. Zaidel, Y. Avni and Z. Halpern (1999). "The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure." J Hepatol **31**(1): 27-38.

Burke, Z. and G. Oliver (2002). "Prox1 is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm." Mech Dev **118**(1-2): 147-155.

Chance, B. and G. R. Williams (1955). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization." J Biol Chem **217**(1): 383-393.

Chang, W. and J. Teng (2018). "Prox1 is essential for oligodendrocyte survival and regulates oligodendrocyte apoptosis via the regulation of NOXA." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **50**(7): 709-717.

Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez and R. Lascurain (2009). "Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes." Cell Mol Immunol **6**(1): 15-25.

Chen, H., A. Chomyn and D. C. Chan (2005). "Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction." J Biol Chem **280**(28): 26185-26192.

Chung, S., T. Andersson, K. C. Sonntag, L. Bjorklund, O. Isacson and K. S. Kim (2002). "Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines." Stem Cells **20**(2): 139-145.

## 5. Literaturverzeichnis

Clapham, D. E. (1995). "Calcium signaling." Cell **80**(2): 259-268.

Cloonan, S. M. and A. M. Choi (2013). "Mitochondria: sensors and mediators of innate immune receptor signaling." Curr Opin Microbiol **16**(3): 327-338.

Colell, A., A. Morales, J. C. Fernandez-Checa and C. Garcia-Ruiz (2002). "Ceramide generated by acidic sphingomyelinase contributes to tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in human colon HT-29 cells through glycosphingolipids formation. Possible role of ganglioside GD3." FEBS Lett **526**(1-3): 135-141.

Couvillion, M. T., I. C. Soto, G. Shipkovenska and L. S. Churchman (2016). "Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs." Nature **533**(7604): 499-503.

Crawford, E. D. and J. A. Wells (2011). "Caspase substrates and cellular remodeling." Annu Rev Biochem **80**: 1055-1087.

Crispe, I. N. (2009). "The liver as a lymphoid organ." Annu Rev Immunol **27**: 147-163.

Dandri, M. and J. Petersen (2016). "Mechanism of Hepatitis B Virus Persistence in Hepatocytes and Its Carcinogenic Potential." Clin Infect Dis **62 Suppl 4**: S281-288.

de Klerk, E. and P. A. t Hoen (2015). "Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing." Trends Genet **31**(3): 128-139.

De Stefani, D., A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabo and R. Rizzuto (2011). "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter." Nature **476**(7360): 336-340.

De Stefani, D., R. Rizzuto and T. Pozzan (2016). "Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth." Annu Rev Biochem **85**: 161-192.

Deniaud, A., O. Sharaf el dein, E. Maillier, D. Poncet, G. Kroemer, C. Lemaire and C. Brenner (2008). "Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis." Oncogene **27**(3): 285-299.

Denton, R. M., P. J. Randle and B. R. Martin (1972). "Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase." Biochem J **128**(1): 161-163.

## 5. Literaturverzeichnis

Domijan, A. M., S. Kovac and A. Y. Abramov (2014). "Lipid peroxidation is essential for phospholipase C activity and the inositol-trisphosphate-related Ca(2)(+) signal." *J Cell Sci* **127**(Pt 1): 21-26.

Ebert, G., S. Preston, C. Allison, J. Cooney, J. G. Toe, M. D. Stutz, S. Ojaimi, H. W. Scott, N. Baschuk, U. Nachbur, J. Torresi, R. Chin, D. Colledge, X. Li, N. Warner, P. Reville, S. Bowden, J. Silke, C. G. Begley and M. Pellegrini (2015). "Cellular inhibitor of apoptosis proteins prevent clearance of hepatitis B virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(18): 5797-5802.

Egan, D. F., M. G. Chun, M. Vamos, H. Zou, J. Rong, C. J. Miller, H. J. Lou, D. Raveendra-Panickar, C. C. Yang, D. J. Sheffler, P. Teriete, J. M. Asara, B. E. Turk, N. D. Cosford and R. J. Shaw (2015). "Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates." *Mol Cell* **59**(2): 285-297.

Eisenberg-Bord, M. and M. Schuldiner (2017). "Ground control to major TOM: mitochondria-nucleus communication." *FEBS J* **284**(2): 196-210.

Emonet, S. E., S. Urata and J. C. de la Torre (2011). "Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies." *Virology* **411**(2): 416-425.

Espinar, L., M. A. Schikora Tamarit, J. Domingo and L. B. Carey (2018). "Promoter architecture determines cotranslational regulation of mRNA." *Genome Res* **28**(4): 509-518.

Ferreira, K. S., C. Kreutz, S. Macnelly, K. Neubert, A. Haber, M. Bogyo, J. Timmer and C. Borner (2012). "Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes." *Apoptosis* **17**(5): 503-515.

Fox, M. H. and T. M. Delohery (1987). "Membrane fluidity measured by fluorescence polarization using an EPICS V cell sorter." *Cytometry* **8**(1): 20-25.

Galluzzi, L., C. Brenner, E. Morselli, Z. Touat and G. Kroemer (2008). "Viral control of mitochondrial apoptosis." *PLoS Pathog* **4**(5): e1000018.

Galluzzi, L., O. Kepp and G. Kroemer (2016). "Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control." *Microb Cell* **3**(3): 101-108.

Galluzzi, L., O. Kepp, C. Trojel-Hansen and G. Kroemer (2012). "Mitochondrial control of cellular life, stress, and death." *Circ Res* **111**(9): 1198-1207.

Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. Garcia-Saez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jaattela, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenin, U. M. Moll, C. Munoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nunez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino and G. Kroemer (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." Cell Death Differ **25**(3): 486-541.

Gnaiger, E. (2014). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis. Austria, OROBOROS INSTRUMENTS Corp.

Graham, S. V. and A. A. A. Faizo (2017). "Control of human papillomavirus gene expression by alternative splicing." Virus Res **231**: 83-95.

Green, D. R., L. Galluzzi and G. Kroemer (2011). "Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging." Science **333**(6046): 1109-1112.

## 5. Literaturverzeichnis

Guerrieri, F., L. Belloni, D. D'Andrea, N. Pediconi, L. Le Pera, B. Testoni, C. Scisciani, O. Floriot, F. Zoulim, A. Tramontano and M. Levrero (2017). "Genome-wide identification of direct HBx genomic targets." BMC Genomics **18**(1): 184.

Guidotti, L. G., M. Isogawa and F. V. Chisari (2015). "Host-virus interactions in hepatitis B virus infection." Curr Opin Immunol **36**: 61-66.

Guidotti, L. G., B. Matzke, H. Schaller and F. V. Chisari (1995). "High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice." J Virol **69**(10): 6158-6169.

Guo, Z. S., L. H. Wang, R. C. Eisensmith and S. L. Woo (1996). "Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer." Gene Ther **3**(9): 802-810.

Halestrap, A. P., C. P. Connern, E. J. Griffiths and P. M. Kerr (1997). "Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury." Mol Cell Biochem **174**(1-2): 167-172.

Halestrap, A. P., K. Y. Woodfield and C. P. Connern (1997). "Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase." J Biol Chem **272**(6): 3346-3354.

Hardie, D. G. and S. C. Lin (2017). "AMP-activated protein kinase - not just an energy sensor." F1000Res **6**: 1724.

Herzer, K., M. F. Sprinzl and P. R. Galle (2007). "Hepatitis viruses: live and let die." Liver Int **27**(3): 293-301.

Hinkle, P. C., M. A. Kumar, A. Resetar and D. L. Harris (1991). "Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation." Biochemistry **30**(14): 3576-3582.

Hoeben, R. C. and T. G. Uil (2013). "Adenovirus DNA replication." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(3): a013003.

Hoffmann, A. and D. Baltimore (2006). "Circuitry of nuclear factor kappaB signaling." Immunol Rev **210**: 171-186.



## 5. Literaturverzeichnis

Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott and D. Baltimore (2002). "The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation." Science **298**(5596): 1241-1245.

Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal and D. V. Goeddel (1996). "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." Immunity **4**(4): 387-396.

Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan and D. V. Goeddel (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.

Hsu, H., J. Xiong and D. V. Goeddel (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.

Huster, D., A. J. Jin, K. Arnold and K. Gawrisch (1997). "Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by <sup>17</sup>O NMR." Biophys J **73**(2): 855-864.

Janas, M. K. (2015). Molekulare Mechanismen TNF-vermittelter viraler Hepatitis. Dr. rer. nat., Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Jones, R. G., D. R. Plas, S. Kubek, M. Buzzai, J. Mu, Y. Xu, M. J. Birnbaum and C. B. Thompson (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." Mol Cell **18**(3): 283-293.

Jost, P. J., S. Grabow, D. Gray, M. D. McKenzie, U. Nachbur, D. C. Huang, P. Bouillet, H. E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser and T. Kaufmann (2009). "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." Nature **460**(7258): 1035-1039.

Kalkavan, H. and D. R. Green (2018). "MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business." Cell Death Differ **25**(1): 46-55.

Kanehisa, M. (2019). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kyoto, Japan, Kanehisa Laboratories.

Kantari, C. and H. Walczak (2011). "Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria." Biochim Biophys Acta **1813**(4): 558-563.

## 5. Literaturverzeichnis

Kim, S., H. Wang and W. S. Ryu (2010). "Incorporation of eukaryotic translation initiation factor eIF4E into viral nucleocapsids via interaction with hepatitis B virus polymerase." *J Virol* **84**(1): 52-58.

Kim, S. G., G. R. Buel and J. Blenis (2013). "Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway." *Mol Cells* **35**(6): 463-473.

Knolle, P. A. and R. Thimme (2014). "Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection." *Gastroenterology* **146**(5): 1193-1207.

Kon, N., A. Satoh and N. Miyoshi (2017). "A small-molecule DS44170716 inhibits Ca(2+)-induced mitochondrial permeability transition." *Sci Rep* **7**(1): 3864.

Koshiba, T. (2013). "Mitochondrial-mediated antiviral immunity." *Biochim Biophys Acta* **1833**(1): 225-232.

Koshiba, T., K. Yasukawa, Y. Yanagi and S. Kawabata (2011). "Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling." *Sci Signal* **4**(158): ra7.

Kosinska, A. D., A. Moeed, N. Kallin, J. Festag, J. Su, K. Steiger, M. L. Michel, U. Protzer and P. A. Knolle (2019). "Synergy of therapeutic heterologous prime-boost hepatitis B vaccination with CpG-application to improve immune control of persistent HBV infection." *Sci Rep* **9**(1): 10808.

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, M. T. Grijalba, E. J. Bechara and A. E. Vercesi (1996). "Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca<sup>2+</sup> ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation." *J Biol Chem* **271**(6): 2929-2934.

Kreuz, S., D. Siegmund, P. Scheurich and H. Wajant (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." *Mol Cell Biol* **21**(12): 3964-3973.

Kroemer, G., L. Galluzzi and C. Brenner (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* **87**(1): 99-163.

Kropp, K. A., W. Y. Hsieh, E. Isern, T. Forster, E. Krause, W. Brune, A. Angulo and P. Ghazal (2015). "A temporal gate for viral enhancers to co-opt Toll-like-receptor transcriptional activation pathways upon acute infection." *PLoS Pathog* **11**(4): e1004737.

## 5. Literaturverzeichnis

Kudchodkar, S. B., Y. Yu, T. G. Maguire and J. C. Alwine (2004). "Human cytomegalovirus infection induces rapamycin-insensitive phosphorylation of downstream effectors of mTOR kinase." J Virol **78**(20): 11030-11039.

Kurts, C., B. W. Robinson and P. A. Knolle (2010). "Cross-priming in health and disease." Nat Rev Immunol **10**(6): 403-414.

Lakhani, S. A., A. Masud, K. Kuida, G. A. Porter, Jr., C. J. Booth, W. Z. Mehal, I. Inayat and R. A. Flavell (2006). "Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis." Science **311**(5762): 847-851.

Laster, S. M., J. G. Wood and L. R. Gooding (1988). "Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis." J Immunol **141**(8): 2629-2634.

Leist, M., F. Gantner, I. Bohlinger, P. G. Germann, G. Tiegs and A. Wendel (1994). "Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest." J Immunol **153**(4): 1778-1788.

Lemasters, J. J. (2007). "Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism." J Gastroenterol Hepatol **22 Suppl 1**: S31-37.

Li, H., M. Kobayashi, M. Blonska, Y. You and X. Lin (2006). "Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation." J Biol Chem **281**(19): 13636-13643.

Li, J., Y. Liu, Z. Wang, K. Liu, Y. Wang, J. Liu, H. Ding and Z. Yuan (2011). "Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment." J Virol **85**(13): 6319-6333.

Li, J., T. McQuade, A. B. Siemer, J. Napetschnig, K. Moriwaki, Y. S. Hsiao, E. Damko, D. Moquin, T. Walz, A. McDermott, F. K. Chan and H. Wu (2012). "The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis." Cell **150**(2): 339-350.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.

Li, Y. Y., B. K. Popivanova, Y. Nagai, H. Ishikura, C. Fujii and N. Mukaida (2006). "Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in

## 5. Literaturverzeichnis

human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines." Cancer Res **66**(13): 6741-6747.

Lin, S. and Y. J. Zhang (2017). "Interference of Apoptosis by Hepatitis B Virus." Viruses **9**(8).

Lin, Y., C. Wu, X. Wang, T. Kemper, A. Squire, M. Gunzer, J. Zhang, X. Chen and M. Lu (2019). "Hepatitis B virus is degraded by autophagosome-lysosome fusion mediated by Rab7 and related components." Protein Cell **10**(1): 60-66.

Liu, F. and M. R. Green (1990). "A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein." Cell **61**(7): 1217-1224.

Liu, M. X., L. Jin, S. J. Sun, P. Liu, X. Feng, Z. L. Cheng, W. R. Liu, K. L. Guan, Y. H. Shi, H. X. Yuan and Y. Xiong (2018). "Metabolic reprogramming by PCK1 promotes TCA cataplerosis, oxidative stress and apoptosis in liver cancer cells and suppresses hepatocellular carcinoma." Oncogene **37**(12): 1637-1653.

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

Lowin, B., M. Hahne, C. Mattmann and J. Tschopp (1994). "Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways." Nature **370**(6491): 650-652.

Lu, J., L. Zhu, L. P. Zheng, Q. Cui, H. H. Zhu, H. Zhao, Z. J. Shen, H. Y. Dong, S. S. Chen, W. Z. Wu and J. M. Tan (2018). "Overexpression of ULK1 Represents a Potential Diagnostic Marker for Clear Cell Renal Carcinoma and the Antitumor Effects of SBI-0206965." EBioMedicine **34**: 85-93.

Ma, Q. and Y. Wang (2012). "Comprehensive analysis of the prevalence of hepatitis B virus escape mutations in the major hydrophilic region of surface antigen." J Med Virol **84**(2): 198-206.

Macosko, E. Z., A. Basu, R. Satija, J. Nemeshe, K. Shekhar, M. Goldman, I. Tirosh, A. R. Bialas, N. Kamitaki, E. M. Martersteck, J. J. Trombetta, D. A. Weitz, J. R. Sanes, A. K. Shalek, A. Regev and S. A. McCarroll (2015). "Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets." Cell **161**(5): 1202-1214.

Magee, N. and Y. Zhang (2017). "Role of early growth response 1 in liver metabolism and liver cancer." Hepatoma Res **3**: 268-277.

## 5. Literaturverzeichnis

Mahoney, D. J., H. H. Cheung, R. L. Mrad, S. Plenchette, C. Simard, E. Enwere, V. Arora, T. W. Mak, E. C. Lacasse, J. Waring and R. G. Korneluk (2008). "Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(33): 11778-11783.

Marchant, J. S. and C. W. Taylor (1997). "Cooperative activation of IP<sub>3</sub> receptors by sequential binding of IP<sub>3</sub> and Ca<sup>2+</sup> safeguards against spontaneous activity." Curr Biol **7**(7): 510-518.

McBride, H. M., M. Neuspiel and S. Wasiak (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse." Curr Biol **16**(14): R551-560.

Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.

Mor, I., E. C. Cheung and K. H. Vousden (2011). "Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **76**: 211-216.

Murata, Y., K. Kawashima, K. Sheikh, Y. Tanaka and M. Isogawa (2018). "Intrahepatic Cross-Presentation and Hepatocellular Antigen Presentation Play Distinct Roles in the Induction of Hepatitis B Virus-Specific CD8(+) T Cell Responses." J Virol **92**(21).

Murphy, C. M., Y. Xu, F. Li, K. Nio, N. Reszka-Blanco, X. Li, Y. Wu, Y. Yu, Y. Xiong and L. Su (2016). "Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication." Cell Rep **16**(11): 2846-2854.

Mutz, P., P. Metz, F. A. Lempp, S. Bender, B. Qu, K. Schoneweis, S. Seitz, T. Tu, A. Restuccia, J. Frankish, C. Dachert, B. Schusser, R. Koschny, G. Polychronidis, P. Schemmer, K. Hoffmann, T. F. Baumert, M. Binder, S. Urban and R. Bartenschlager (2018). "HBV Bypasses the Innate Immune Response and Does Not Protect HCV From Antiviral Activity of Interferon." Gastroenterology **154**(6): 1791-1804 e1722.

Nicholls, D. G. and S. Chalmers (2004). "The integration of mitochondrial calcium transport and storage." J Bioenerg Biomembr **36**(4): 277-281.

Norenberg, M. D. and K. V. Rao (2007). "The mitochondrial permeability transition in neurologic disease." Neurochem Int **50**(7-8): 983-997.

Nowycky, M. C. and A. P. Thomas (2002). "Intracellular calcium signaling." J Cell Sci **115**(Pt 19): 3715-3716.

## 5. Literaturverzeichnis

Ow, Y. P., D. R. Green, Z. Hao and T. W. Mak (2008). "Cytochrome c: functions beyond respiration." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(7): 532-542.

Parekh, S., C. Ziegenhain, B. Vieth, W. Enard and I. Hellmann (2016). "The impact of amplification on differential expression analyses by RNA-seq." Sci Rep **6**: 25533.

Park, Y., R. D. Smith, A. B. Combs and J. P. Kehrer (1988). "Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by dimethyl sulfoxide." Toxicology **52**(1-2): 165-175.

Pasparakis, M. and P. Vandenabeele (2015). "Necroptosis and its role in inflammation." Nature **517**(7534): 311-320.

Pernas, L. and L. Scorrano (2016). "Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function." Annu Rev Physiol **78**: 505-531.

Pich, S., D. Bach, P. Briones, M. Liesa, M. Camps, X. Testar, M. Palacin and A. Zorzano (2005). "The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system." Hum Mol Genet **14**(11): 1405-1415.

Pinton, P., D. Ferrari, E. Rapizzi, F. Di Virgilio, T. Pozzan and R. Rizzuto (2001). "The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action." EMBO J **20**(11): 2690-2701.

Pinton, P., C. Giorgi, R. Siviero, E. Zecchini and R. Rizzuto (2008). "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis." Oncogene **27**(50): 6407-6418.

Prins, D. and M. Michalak (2011). "Organelle calcium buffers." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(3).

Protzer, U., M. K. Maini and P. A. Knolle (2012). "Living in the liver: hepatic infections." Nat Rev Immunol **12**(3): 201-213.

Purushothaman, S., J. Cama and U. F. Keyser (2016). "Dependence of norfloxacin diffusion across bilayers on lipid composition." Soft Matter **12**(7): 2135-2144.

## 5. Literaturverzeichnis

- Qin, J., J. Zhai, R. Hong, S. Shan, Y. Kong, Y. Wen, Y. Wang, J. Liu and Y. Xie (2009). "Prospero-related homeobox protein (Prox1) inhibits hepatitis B virus replication through repressing multiple cis regulatory elements." J Gen Virol **90**(Pt 5): 1246-1255.
- Radhakrishnan, A. and R. Green (2016). "Connections Underlying Translation and mRNA Stability." J Mol Biol **428**(18): 3558-3564.
- Ramirez-Valle, F., S. Braunstein, J. Zavadil, S. C. Formenti and R. J. Schneider (2008). "eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy." J Cell Biol **181**(2): 293-307.
- Rasola, A. and P. Bernardi (2011). "Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis." Cell Calcium **50**(3): 222-233.
- Reichert, M., H. Schaller, W. Kunz and G. Gerber (1978). "The dependence on the extramitochondrial ATP/ADP-ratio of the oxidative phosphorylation in mitochondria isolated by a new procedure from rat skeletal muscle." Acta Biol Med Ger **37**(8): 1167-1176.
- Reshef, L., R. W. Hanson and F. J. Ballard (1970). "A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue." J Biol Chem **245**(22): 5979-5984.
- Rich, P. R. and A. Marechal (2010). "The mitochondrial respiratory chain." Essays Biochem **47**: 1-23.
- Rizzuto, R., D. De Stefani, A. Raffaello and C. Mammucari (2012). "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(9): 566-578.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft and T. Pozzan (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses." Science **280**(5370): 1763-1766.
- Roger, A. J., S. A. Munoz-Gomez and R. Kamikawa (2017). "The Origin and Diversification of Mitochondria." Curr Biol **27**(21): R1177-R1192.
- Rojas-Hernandez, N., D. Veliz and C. Vega-Retter (2019). "Selection of suitable reference genes for gene expression analysis in gills and liver of fish under field pollution conditions." Sci Rep **9**(1): 3459.
- Rui, L. (2014). "Energy metabolism in the liver." Compr Physiol **4**(1): 177-197.

## 5. Literaturverzeichnis

Rutter, G. A. and R. M. Denton (1988). "Regulation of NAD<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca<sup>2+</sup> ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD<sup>+</sup> ratios." Biochem J **252**(1): 181-189.

Ryu, D. K., B. Y. Ahn and W. S. Ryu (2010). "Proximity between the cap and 5' epsilon stem-loop structure is critical for the suppression of pgRNA translation by the hepatitis B viral polymerase." Virology **406**(1): 56-64.

Sakamoto, K. M. and D. A. Frank (2009). "CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy." Clin Cancer Res **15**(8): 2583-2587.

Sanchez, E. L. and M. Lagunoff (2015). "Viral activation of cellular metabolism." Virology **479-480**: 609-618.

Sassano, M. L., A. R. van Vliet and P. Agostinis (2017). "Mitochondria-Associated Membranes As Networking Platforms and Regulators of Cancer Cell Fate." Front Oncol **7**: 174.

Saxton, R. A. and D. M. Sabatini (2017). "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." Cell **169**(2): 361-371.

Schaack, J., H. F. Maguire and A. Siddiqui (1996). "Hepatitis B virus X protein partially substitutes for E1A transcriptional function during adenovirus infection." Virology **216**(2): 425-430.

Schinazi, R. F., M. Ehteshami, L. Bassit and T. Asselah (2018). "Towards HBV curative therapies." Liver Int **38 Suppl 1**: 102-114.

Schwartz, R. M. and M. O. Dayhoff (1978). "Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts." Science **199**(4327): 395-403.

Serviddio, G. and J. Sastre (2010). "Measurement of mitochondrial membrane potential and proton leak." Methods Mol Biol **594**: 107-121.

Shan, M., Z. Shen, H. Sun, J. Zheng and M. Zhang (2017). "The enrichment of HBV immune-escape mutations during nucleoside/nucleotide analogue therapy." Antivir Ther **22**(8): 717-720.



## 5. Literaturverzeichnis

Shuda, M., C. Velasquez, E. Cheng, D. G. Cordek, H. J. Kwun, Y. Chang and P. S. Moore (2015). "CDK1 substitutes for mTOR kinase to activate mitotic cap-dependent protein translation." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(19): 5875-5882.

Singh, G., G. Pratt, G. W. Yeo and M. J. Moore (2015). "The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion." Annu Rev Biochem **84**: 325-354.

Sir, D., Y. Tian, W. L. Chen, D. K. Ann, T. S. Yen and J. H. Ou (2010). "The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4383-4388.

Solesio, M. E. G. d. M., L. C.; Elustondo, P. A.; Diao, C.; Chang, J. C.; Pavlov, E. V. (2018). "Inorganic polyphosphate (polyP) is required for sustained free mitochondrial calcium elevation, following stimulated calcium uptake." bioRxiv, The preprint server for biology.

Sparagna, G. C., K. K. Gunter, S. S. Sheu and T. E. Gunter (1995). "Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode." J Biol Chem **270**(46): 27510-27515.

Spector, D. H. (2015). "Human cytomegalovirus riding the cell cycle." Med Microbiol Immunol **204**(3): 409-419.

Spinelli, J. B. and M. C. Haigis (2018). "The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism." Nat Cell Biol **20**(7): 745-754.

Sprinzl, M. F., H. Oberwinkler, H. Schaller and U. Protzer (2001). "Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier." J Virol **75**(11): 5108-5118.

Sun, L., H. Wang, Z. Wang, S. He, S. Chen, D. Liao, L. Wang, J. Yan, W. Liu, X. Lei and X. Wang (2012). "Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase." Cell **148**(1-2): 213-227.

Szalai, G., R. Krishnamurthy and G. Hajnoczky (1999). "Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals." EMBO J **18**(22): 6349-6361.

Szymanski, J., J. Janikiewicz, B. Michalska, P. Patalas-Krawczyk, M. Perrone, W. Ziolkowski, J. Duszynski, P. Pinton, A. Dobrzyn and M. R. Wieckowski (2017). "Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane

in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure." Int J Mol Sci **18**(7).

Tal, M. C., M. Sasai, H. K. Lee, B. Yordy, G. S. Shadel and A. Iwasaki (2009). "Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2770-2775.

Tang, H., L. Da, Y. Mao, Y. Li, D. Li, Z. Xu, F. Li, Y. Wang, P. Tiollais, T. Li and M. Zhao (2009). "Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression." Hepatology **49**(1): 60-71.

Thomas, H. E., Y. Zhang, J. A. Stefely, S. R. Veiga, G. Thomas, S. C. Kozma and C. A. Mercer (2018). "Mitochondrial Complex I Activity Is Required for Maximal Autophagy." Cell Rep **24**(9): 2404-2417 e2408.

Thoreen, C. C., L. Chantranupong, H. R. Keys, T. Wang, N. S. Gray and D. M. Sabatini (2012). "A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation." Nature **485**(7396): 109-113.

Thorn, M. B. (1953). "Malonate inhibition of succinic dehydrogenase." Biochem J **53**(1): i.

Tian, Y., D. Sir, C. F. Kuo, D. K. Ann and J. H. Ou (2011). "Autophagy required for hepatitis B virus replication in transgenic mice." J Virol **85**(24): 13453-13456.

Tokunaga, F., S. Sakata, Y. Saeki, Y. Satomi, T. Kirisako, K. Kamei, T. Nakagawa, M. Kato, S. Murata, S. Yamaoka, M. Yamamoto, S. Akira, T. Takao, K. Tanaka and K. Iwai (2009). "Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation." Nat Cell Biol **11**(2): 123-132.

Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, T. Kafri, D. R. Green and I. M. Verma (1996). "Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB." Science **274**(5288): 787-789.

van der Blik, A. M., M. M. Sedensky and P. G. Morgan (2017). "Cell Biology of the Mitochondrion." Genetics **207**(3): 843-871.

Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2012). "Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview." Cell Death Differ **19**(1): 75-86.

## 5. Literaturverzeichnis

Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, V. Luria, N. Chiannikulchai, J. S. Beckmann, I. L. Mett, D. Rebrikov, V. M. Brodianski, O. C. Kemper, O. Kollet, T. Lapidot, D. Soffer, T. Sobe, K. B. Avraham, T. Goncharov, H. Holtmann, P. Lonai and D. Wallach (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally." *Immunity* **9**(2): 267-276.

Walsh, C. M. (2014). "Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. necroptosis." *Front Cell Dev Biol* **2**: 3.

Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova and G. J. Gatto, Jr. (2005). "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications." *Angew Chem Int Ed Engl* **44**(45): 7342-7372.

Wang, D., M. P. Guan, Z. J. Zheng, W. Q. Li, F. P. Lyv, R. Y. Pang and Y. M. Xue (2015). "Transcription Factor Egr1 is Involved in High Glucose-Induced Proliferation and Fibrosis in Rat Glomerular Mesangial Cells." *Cell Physiol Biochem* **36**(6): 2093-2107.

Wang, X. T., K. D. McCullough, X. J. Wang, G. Carpenter and N. J. Holbrook (2001). "Oxidative stress-induced phospholipase C-gamma 1 activation enhances cell survival." *J Biol Chem* **276**(30): 28364-28371.

Wang, Z. and P. A. Burke (2010). "Hepatocyte nuclear factor-4alpha interacts with other hepatocyte nuclear factors in regulating transthyretin gene expression." *FEBS J* **277**(19): 4066-4075.

Watanabe, R., L. Wei and J. Huang (2011). "mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets." *J Nucl Med* **52**(4): 497-500.

Wei, A. C., T. Liu, R. L. Winslow and B. O'Rourke (2012). "Dynamics of matrix-free Ca<sup>2+</sup> in cardiac mitochondria: two components of Ca<sup>2+</sup> uptake and role of phosphate buffering." *J Gen Physiol* **139**(6): 465-478.

WHO. (2019, 18.07.2019). "Fact Sheet Hepatitis B July 2019." Retrieved 02.08.2019, 2019, from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.

Willimsky, G., U. Protzer, P. Knolle and M. Heikenwalder (2013). "Adoptive T-cell therapy to treat liver cancer: is the liver microenvironment key?" *Oncotarget* **4**(8): 1117-1118.

Witting, M., T. V. Maier, S. Garvis and P. Schmitt-Kopplin (2014). "Optimizing a ultrahigh pressure liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry approach

using a novel sub-2µm core-shell particle for in depth lipidomic profiling of *Caenorhabditis elegans*." J Chromatogr A **1359**: 91-99.

Wohlleber, D., H. Kashkar, K. Gartner, M. K. Frings, M. Odenthal, S. Hegenbarth, C. Borner, B. Arnold, G. Hammerling, B. Nieswandt, N. van Rooijen, A. Limmer, K. Cederbrant, M. Heikenwalder, M. Pasparakis, U. Protzer, H. P. Dienes, C. Kurts, M. Kronke and P. A. Knolle (2012). "TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation." Cell Rep **2**(3): 478-487.

Wu, J., Z. Huang, J. Ren, Z. Zhang, P. He, Y. Li, J. Ma, W. Chen, Y. Zhang, X. Zhou, Z. Yang, S. Q. Wu, L. Chen and J. Han (2013). "Mkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl in necroptosis." Cell Res **23**(8): 994-1006.

Wu, Z. J., Y. Zhu, D. R. Huang and Z. Q. Wang (2010). "Constructing the HBV-human protein interaction network to understand the relationship between HBV and hepatocellular carcinoma." J Exp Clin Cancer Res **29**: 146.

Xie, B., S. Wang, N. Jiang and J. J. Li (2019). "Cyclin B1/CDK1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance." Cancer Lett **443**: 56-66.

Yang, Y., Wu, J., Wang, J. (2015). "A database and functional annotation of NF-κB target genes." International Journal of Clinical and Experimental Medicine **9**(5): 7986-7995.

Yasukawa, K., H. Oshiumi, M. Takeda, N. Ishihara, Y. Yanagi, T. Seya, S. Kawabata and T. Koshiba (2009). "Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling." Sci Signal **2**(84): ra47.

Yazdanpanah, B., K. Wiegmann, V. Tchikov, O. Krut, C. Pongratz, M. Schramm, A. Kleinriders, T. Wunderlich, H. Kashkar, O. Utermohlen, J. C. Bruning, S. Schutze and M. Kronke (2009). "Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase." Nature **460**(7259): 1159-1163.

Yewdell, J. W. and J. R. Bennink (1999). "Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 579-606.

Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.

## 5. Literaturverzeichnis

Yoo, S. M. and Y. K. Jung (2018). "A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics." Mol Cells **41**(1): 18-26.

Zamzami, N., N. Larochette and G. Kroemer (2005). "Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1478-1480.

Zeng, X. R., Y. Sun, L. Wenger and H. S. Cheung (2005). "Basic calcium phosphate crystal-induced Egr-1 expression stimulates mitogenesis in human fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 658-664.

Zhang, H. T., G. G. Chen, B. G. Hu, Z. Y. Zhang, J. P. Yun, M. L. He and P. B. Lai (2014). "Hepatitis B virus x protein induces autophagy via activating death-associated protein kinase." J Viral Hepat **21**(9): 642-649.

Zhang, L., L. Ouyang, Y. Guo, J. Zhang and B. Liu (2018). "UNC-51-like Kinase 1: From an Autophagic Initiator to Multifunctional Drug Target." J Med Chem **61**(15): 6491-6500.

Zhang, N. and M. J. Bevan (2011). "CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system." Immunity **35**(2): 161-168.

Zhou, X., W. Jiang, Z. Liu, S. Liu and X. Liang (2017). "Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis." Viruses **9**(11).

Zid, B. M. and E. K. O'Shea (2014). "Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast." Nature **514**(7520): 117-121.

Zou, Z. Q., L. Wang, K. Wang and J. G. Yu (2016). "Innate immune targets of hepatitis B virus infection." World J Hepatol **8**(17): 716-725.

Zuniga, E. I., M. Macal, G. M. Lewis and J. A. Harker (2015). "Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections." Annu Rev Virol **2**(1): 573-597.

## 6. Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> TNF-vermittelte Apoptose in Adenovirus-infizierten Hepatozyten .....	52
<b>Abbildung 2:</b> Apoptose in Adenovirus-infizierten Hepatozyten unabhängig von Caspase 8 .....	54
<b>Abbildung 3:</b> Apoptose Signalweg über mitochondriale Permeabilitätstransition (mPT) ..	56
<b>Abbildung 4:</b> Sensibilisierung erst durch Virus-vermittelte Genexpression .....	59
<b>Abbildung 5:</b> Einfluss einer Adenovirus-Infektion auf Lipidzusammensetzung und Membranfluidität von Mitochondrien .....	61
<b>Abbildung 6:</b> Oxidative Phosphorylierung in isolierten Mitochondrien.....	64
<b>Abbildung 7</b> Kopplung und Effektivität von isolierten Mitochondrien nach Adenovirus-Infektion.....	65
<b>Abbildung 8</b> OCR Kinetik in isolierten Mitochondrien nach ADP Zugabe.....	66
<b>Abbildung 9</b> Sensitivität von Mitochondrien gegenüber $Ca^{2+}$ .....	67
<b>Abbildung 10</b> Ad-HBV 1.3 Infektion in der Maus-Leber .....	69
<b>Abbildung 11</b> TNF-vermittelte Apoptose in Ad-HBV 1.3 und Ad-CMV-GL infizierten Mäusen.....	71
<b>Abbildung 12</b> Expression von Adenovirus-Genen in murinen Lebern und HEK293 Zellen	72
<b>Abbildung 13</b> Sensitivität von Mitochondrien aus Ad-HBV 1.3 infizierten Mäusen gegenüber $Ca^{2+}$ .....	74
<b>Abbildung 14</b> Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF-vermittelter Apoptose nach Ad-CMV/GFP-HBV Infektion .....	75
<b>Abbildung 15</b> mRNA Sequenzierung nach Infektion mit Ad-CMV-GL, Ad-HBV 1.3 oder Ad-ctrl .....	78
<b>Abbildung 16</b> Rolle der Mitophagie für die Sensibilisierung von infizierten Mäusen gegenüber TNF-vermittelter Apoptose .....	81
<b>Abbildung 17</b> Infektions-vermittelte Sensibilisierung bei verschiedenen HBV Knockout-Konstrukten .....	84
<b>Abbildung 18</b> Sensibilisierung nach Ad-HBV 1.3 KO Infektion.....	85
<b>Abbildung 19</b> Einfluss des Promotors auf die Sensibilisierung nach Virus-Infektion .....	87
<b>Abbildung 20</b> Einfluss von Transkription und Translation auf die Sensibilisierung von Hepatozyten .....	88
<b>Abbildung 21</b> KEGG-Signalweg-Analyse der hoch-regulierten DEGs in Ad-CMV-GL infizierten Lebern im Vergleich zu Ad-ctrl.....	145

## 6.2 Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
°C	Grad Celsius
$\Delta\Psi$	delta psi (Membranpotential)
ADP	Adenosindiphosphat
Ad/AdV	Adenovirus
(s)ALT	(Serum) Alaninaminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANT	engl.: adenine nucleotide translocator
APAF-1	engl.: apoptotic protease-activating factor 1
APC	engl.: antigen presenting cell
ASMase	engl.: acid sphingomyelinase
ATG	Start-Codon: Adenin-Thymin-Guanin
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	engl.: Bcl-2 antagonist/killer-1
Bax	engl.: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	engl.: B-cell lymphoma 2
Bid	engl.: BH3 interacting domain death agonist
Bim	engl.: Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA	engl.: bovine serum albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
Casp8 <sup>flox/flox</sup>	Transgener Mausstamm mit Gen für Caspase 8 flankiert von 2 loxP Stellen
Caspase	engl.: cysteinyl aspartic acid protease
CBG99	engl.: luciferase click beetle green 99
cccDNA	engl.: covalently closed circular DNA
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CCD	engl.: charge-coupled device
CDK	engl.: cyclin-dependent kinase
CD	engl.: cluster of differentiation
cDNA	komplementäre (engl.: complementary) DNA

6. Anhang

cIAP	engl.: cellular inhibitor of apoptosis protein
cm	centi-Meter
(h)CMV	(humanes) Cytomegalievirus
CoA	Coenzym A
CREB	engl.: cAMP response element-binding protein
CsA	Cyclosporin A
Da (kDa)	Dalton (kilo-Dalton)
DC	dendritische Zelle
DDR	engl.: DNA damage response
DEG	differentiell exprimierte Gene
DMEM	engl.: Duplecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene
ECM	engl.: extracellular matrix
Eif4g1/eIF4G1	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4 Gamma 1
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETC	engl.: electron transport chain
FADD	engl.: Fas associated death domain
FasL	Fas-Ligand
FCS	engl.: fetal calf serum
FELASA	engl.: Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
gDNA	genomische DNA
GEO	engl.: Gene Expression Omnibus
(e)GFP	(engl.: enhanced) grün fluoreszierendes Protein
HBeAg	HBV e-Antigen
HBsAg	HBV S-Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HEB	engl.: Hepes buffered saline
HEK293	engl.: human embryonic kidney cells 293
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	engl.: horseradish peroxidase
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös



## 6. Anhang

IFU	engl.: infectious units
I $\kappa$ B	NF $\kappa$ B Inhibitor
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
IMM	Innere mitochondriale Membran
IMS	engl.: intermembrane space
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
IRF3	engl.: interferon regulatory factor 3
IU	engl.: international unit
IVIS	engl.: <i>in vivo</i> imaging system
KEGG	engl.: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kg	kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	engl.: Knock-out
L	Liter
LCMV	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus
LSEC	engl.: liver sinusoidal endothelial cell
MAM	engl.: mitochondria associated membrane
MAVS	engl.: mitochondrial antiviral signaling
MCU	mitochondrialer Calcium-Uniporter
μg	mikrogramm
mg	milligramm
MHC I	engl.: major histocompatibility complex I
min	Minute
μl	mikro-Liter
ml	milli-Liter
MLKL	mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MLKL <sup>-/-</sup>	Transgener Mausstamm mit Knock-out des MLKL Gens
μm	mikro-Meter
μM	Mikro-Molar
mM	milli-Molar
MMP	mitochondriales Membranpotential
mPT	Mitochondriale Permeabilitätstransition
mPTP	mPT-Pore
mRNA	engl.: messenger RNA
MS	Massenspektrometrie / -meter
MTBE	Methyl-tert-butylether

6. Anhang

mTOR	engl.: mechanistic Target of Rapamycin
mV	milli-Volt
m/z	Masse/Ladung (Messeinheit der MS)
n	Gruppengröße/Anzahl
NCLX	engl.: Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Exchanger
NFκB	engl.: nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
ng	nanogramm
NK	engl.: natural killer (cells)
NKT	engl.: natural killer T (cells)
NLR	engl.: NOD-like receptor
nm	nano-Meter
nmol	nano-mol
NOD	engl.: nucleotide-binding oligomerization domain
NOX	NADPH Oxidase
NTCP	engl.: sodium taurocholate cotransporting polypeptide
OCR	engl.: oxygen consumption rate
OD	Optische Dichte
OMM	engl.: outer mitochondrial membrane
ORF	engl.: open reading frame
p	Photonen
P	Polarisation
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PC1/2	engl.: principal component 1/2
PCA	engl.: principal component analysis
(q)PCR	engl.: (quantitative) polymerase chain reaction
PEIU	engl.: Paul-Ehrlich-Institut Units
PLC γ	Phospholipase C γ
pmol	pico-mol
PRR	engl.: pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RaM	engl.: rapid uptake mode
RFU	engl.: relative fluorescence units
Rh123	Rhodamin 123
RIG-I	engl.: retinoic acid inducible gene I
RIPK	engl.: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase
RLR	engl.: RIG-I like receptor

## 6. Anhang

RNA	engl.: ribonucleic acid
ROS	engl.: reactive oxygen species
rpm	engl.: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT (PCR)	engl.: real time (PCR)
RTG	retrograde Regulationsproteine
s / sec	Sekunde
SEM	engl.: standard error of the mean
SPF	engl.: specific pathogen free
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
sr	Steradian (Maßeinheit für den Raumwinkel)
tBid	engl.: truncated Bid
TBS-T	engl.: Tris buffered saline with Tween
TCA	engl.: tricarboxylic acid cycle
TLR	engl.: Toll-like receptor
TNF	engl.: tumor necrosis factor
TNFR	TNF-Rezeptor
TPP+	Tetraphenylphosphonium-Kation
TRADD	engl.: TNF associated death domain
TRAF2	engl.: TNF receptor-associated factor 2
Treg	regulatorische T Zelle
TSO	engl.: template-switch oligonucleotides
TTR	Transthyretin-Rezeptor
U	engl.: units (internationale Einheit der Enzymaktivität)
ULK1/2	engl.: Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2
UMI	engl.: unique molecular identifiers
UPLC	engl.: ultra-performance liquid chromatography
UZ	Ultrazentrifuge
VDAC	engl.: voltage-dependent anion channel
WHO	engl.: world health organization
w/o	engl.: without (deutsch: ohne)
wt	Wildtyp
XIAP	engl.: X-linked inhibitor of apoptosis protein

## 6.3 Tabellen

**Tabelle 2** DEGs ( $\log_2FC=0,66$ ) in Ad-HBV 1.3 infizierten Lebern im Vergleich zu Ad-CMV-GL

Gen	Log <sub>2</sub> FoldChange	Regulation	pvalue	padj
Egr1	1,414767399	Hoch	2,28E-14	4,73E-11
Pim3	0,771484038	Hoch	4,83E-05	0,008714916
Prox1	0,732500551	Hoch	6,89E-05	0,010779039
Eif4g1	0,69185892	Hoch	7,70E-06	0,002162057
Pck1	0,670365897	Hoch	0,000438327	0,044898799
Tuba1b	-0,684669667	Down	3,61E-07	0,000143238
Fbxo5	-0,690664399	Runter	0,000365455	0,03887406
Mid1ip1	-0,690906367	Runter	7,82E-06	0,002162057
Ccna2	-0,696501196	Runter	0,000352798	0,038015113
Ccnf	-0,707692933	Runter	9,52E-05	0,013624336
Cenpe	-0,715125367	Runter	0,000241699	0,029063405
Cdca2	-0,715305913	Runter	0,000249316	0,029551074
Ddit4l	-0,720826809	Runter	0,000147417	0,019111255
Gm15452	-0,726893228	Runter	8,40E-05	0,012667297
Lig1	-0,733936213	Runter	8,93E-05	0,012997088
Incnp	-0,736302202	Runter	0,000143188	0,018857668
Kif20b	-0,736478223	Runter	0,00013722	0,0183632
Cyp26a1	-0,744080879	Runter	0,000107716	0,015147795
Gsta1	-0,760084892	Runter	5,94E-05	0,009667375
Ccdc34	-0,766187256	Runter	5,13E-05	0,008884128
Pbk	-0,775179573	Runter	5,34E-05	0,008986964
Pclaf	-0,792873358	Runter	3,68E-05	0,00781927
Hmgb2	-0,794550959	Runter	4,54E-05	0,008568913
Car2	-0,798535018	Runter	3,94E-06	0,00121406
Mt2	-0,81278691	Runter	2,94E-05	0,006786198
Hmmr	-0,827610621	Runter	2,11E-05	0,005478774
Prc1	-0,864956284	Runter	4,52E-06	0,001338267
Plk1	-0,868600533	Runter	8,72E-06	0,002334038
Cdca8	-0,895079912	Runter	1,08E-06	0,000390232
Rrm2	-0,909808735	Runter	1,05E-10	8,74E-08
Nusap1	-0,913462402	Runter	2,91E-06	0,000965013
Tubb6	-0,916157121	Runter	3,63E-07	0,000143238
Ccnb2	-0,921046305	Runter	1,96E-06	0,000677391
Birc5	-1,061147545	Runter	4,42E-10	3,33E-07
Ccnb1	-1,073787665	Runter	3,28E-08	1,51E-05

## 6. Anhang

Cdca3	-1,097105287	Runter	1,17E-09	7,44E-07
Cenpa	-1,116852475	Runter	4,93E-11	5,12E-08
H2afx	-1,132021763	Runter	6,27E-21	5,06E-17
Ccne2	-1,15350647	Runter	1,02E-09	7,06E-07
Ube2c	-1,200135263	Runter	8,21E-12	9,73E-09
Aurka	-1,228733872	Runter	6,46E-11	5,95E-08
Cdk1	-1,253217849	Runter	2,11E-13	3,51E-10
Cdkn1a	-1,260602155	Runter	3,63E-17	1,00E-13
Cdc20	-1,290379242	Runter	1,37E-12	1,90E-09
Ccne1	-1,435153279	Runter	1,22E-20	5,06E-17

**Tabelle 3** DEGs ( $\log_2FC=0,66$ ) in Ad-HBV 1.3 infizierten Lebern im Vergleich zu Ad-ctrl

Gen	$\log_2$ FoldChange	Regulation	pvalue	padj
Arntl	0,931639998	Hoch	3,22017E-06	0,0007946
Hbb-bs	0,930901591	Hoch	2,77825E-06	0,000729782
Igfbp1	0,927604683	Hoch	7,3881E-07	0,000261571
Chka	0,903223075	Hoch	1,95108E-07	8,68621E-05
Cdkn1a	0,864180789	Hoch	2,46587E-06	0,000678759
Elovl3	0,848739662	Hoch	3,34416E-22	1,36157E-18
Nfil3	0,843675496	Hoch	1,08161E-06	0,000366981
Smc2	0,834554814	Hoch	2,27986E-05	0,00397659
Mthfd2	0,82353433	Hoch	3,7321E-05	0,005525544
Arl4a	0,8161265	Hoch	4,96738E-09	4,04494E-06
Tubb2a	0,81220047	Hoch	1,62639E-05	0,00317248
Hsph1	0,78692301	Hoch	1,62912E-05	0,00317248
Cry1	0,782109991	Hoch	8,46672E-05	0,009575626
Nat8f5	0,76080541	Hoch	1,12242E-07	5,71241E-05
Gm4739	0,755631609	Hoch	0,000118745	0,011433285
Top2a	0,733891867	Hoch	0,000251385	0,01878008
Serpinh1	0,717863072	Hoch	0,000214894	0,017675586
Eif4g1	0,71517152	Hoch	1,35929E-06	0,000409952
Rad51	0,712236899	Hoch	0,00024243	0,018449577
Slfn9	0,710500054	Hoch	0,000239293	0,018449577
Esco2	0,690018673	Hoch	0,000574699	0,035452826
Tcf19	0,681919513	Hoch	0,000351947	0,024287318
Eea1	0,679124181	Hoch	1,5154E-05	0,003164087
Rnf125	0,66645824	Hoch	1,787E-07	8,55971E-05
Uggt1	0,663032307	Hoch	0,000499365	0,031521911
Ccne1	0,660104351	Hoch	0,000603303	0,036661905
Nr1d1	-0,664952896	Runter	0,000323162	0,022882693
Saa2	-0,670495221	Runter	0,000161804	0,014972343
Dedd2	-0,67789881	Runter	4,25922E-05	0,006084703
Tob2	-0,694222299	Runter	0,000160849	0,014972343
Inca1	-0,699267712	Runter	6,37114E-05	0,007619105
Slc12a7	-0,701400754	Runter	0,000101731	0,010758435
Ripk2	-0,705946372	Runter	0,000380536	0,02560912
Tef	-0,732065499	Runter	0,000197806	0,017319682
Sertad2	-0,732247213	Runter	0,000113507	0,011410994
Id3	-0,744486123	Runter	1,94735E-08	1,21979E-05
Pim3	-0,752608036	Runter	1,19398E-06	0,000388903
Odf3b	-0,774253748	Runter	9,43252E-06	0,002184093
Hnf4aos	-0,778655026	Runter	0,000103598	0,010815328
Sds	-0,836299432	Runter	1,58314E-13	2,57829E-10
Id1	-0,838485108	Runter	1,68577E-06	0,000490259

## 6. Anhang

Orm2	-0,946158293	Runter	1,33292E-14	2,7135E-11
Upp2	-0,987954933	Runter	2,71508E-13	3,68482E-10
Usp2	-1,008521108	Runter	4,24658E-07	0,000157181
Pcsk4	-1,058836967	Runter	9,66085E-08	5,35785E-05
Mafb	-1,224605172	Runter	3,94344E-12	4,58735E-09
Bhlhe40	-1,334320575	Runter	1,21263E-17	3,29149E-14
Dbp	-1,962735951	Runter	1,41592E-24	1,15299E-20

**Tabelle 4** DEGs ( $\log_2FC=0,66$ ) in Ad-CMV-GL infizierten Lebern im Vergleich zu Ad-ctrl

Gen	$\log_2$ FoldChange	Regulation	pvalue	padj
Cdkn1a	2,336874546	Hoch	2,20E-43	2,51E-39
Ccne1	2,30053825	Hoch	2,34E-37	1,34E-33
Ube2c	1,983642924	Hoch	2,06E-22	4,69E-19
Ccne2	1,911124918	Hoch	8,39E-19	1,20E-15
Cdk1	1,897260534	Hoch	5,68E-23	1,62E-19
Cdc20	1,761214771	Hoch	4,24E-17	4,84E-14
Nusap1	1,758894458	Hoch	1,69E-14	1,01E-11
Pbk	1,747577072	Hoch	7,60E-15	5,10E-12
Pclaf	1,689413171	Hoch	1,51E-14	9,57E-12
Top2a	1,670480327	Hoch	5,56E-14	3,17E-11
H2afx	1,658777269	Hoch	9,25E-30	3,52E-26
Cdca8	1,65475026	Hoch	8,69E-16	7,09E-13
Gm4739	1,641698106	Hoch	1,43E-12	5,64E-10
Prc1	1,6258391	Hoch	2,81E-13	1,33E-10
Ccnb1	1,621953808	Hoch	2,00E-13	1,04E-10
Tubb6	1,613071164	Hoch	7,17E-15	5,10E-12
Cdca3	1,587379109	Hoch	4,65E-15	3,54E-12
Aurka	1,57640711	Hoch	3,09E-13	1,41E-10
Hmmr	1,559648968	Hoch	5,81E-12	2,01E-09
Asf1b	1,548179675	Hoch	9,20E-12	3,09E-09
Lig1	1,505648265	Hoch	8,32E-13	3,51E-10
Ccnb2	1,486394822	Hoch	5,59E-11	1,77E-08
Cenpf	1,45449996	Hoch	4,92E-10	1,28E-07
Fbxo5	1,437861609	Hoch	8,25E-10	2,09E-07
Plk1	1,403668828	Hoch	1,22E-09	2,96E-07
Cenpa	1,397880471	Hoch	6,88E-14	3,74E-11
Ckap2l	1,395443184	Hoch	1,95E-09	3,91E-07
Cenpe	1,392255759	Hoch	1,81E-09	3,80E-07
Slfn9	1,384793536	Hoch	3,37E-09	6,42E-07
Ccna2	1,369898343	Hoch	2,39E-09	4,62E-07
Knstrn	1,359305117	Hoch	6,66E-09	1,12E-06
Ccdc34	1,33676745	Hoch	1,89E-10	5,40E-08
Esco2	1,33376376	Hoch	1,26E-09	2,99E-07
Tcf19	1,313407905	Hoch	6,29E-11	1,94E-08
Kif20b	1,29979136	Hoch	2,92E-08	4,17E-06
Rad51	1,297450661	Hoch	3,09E-08	4,29E-06
Ddit4l	1,277677298	Hoch	5,00E-08	6,64E-06
Incenp	1,274905214	Hoch	4,65E-08	6,25E-06
Figl1	1,272721463	Hoch	5,59E-08	7,33E-06
Smc2	1,260250454	Hoch	7,31E-08	9,48E-06
Hmgb2	1,249249722	Hoch	2,61E-08	3,81E-06
Birc5	1,245140481	Hoch	9,42E-08	1,18E-05



## 6. Anhang

Tpx2	1,237586437	Hoch	1,21E-07	1,47E-05
Shcbp1	1,235992172	Hoch	1,29E-07	1,55E-05
Hbb-bs	1,233934122	Hoch	3,98E-09	7,33E-07
Racgap1	1,21509556	Hoch	1,95E-07	2,23E-05
Ckap2	1,210854684	Hoch	1,64E-07	1,93E-05
Tuba1b	1,201488894	Hoch	2,04E-16	1,94E-13
Gins2	1,198987526	Hoch	2,24E-07	2,50E-05
Gtse1	1,198736207	Hoch	3,04E-07	3,30E-05
Tyms	1,179092282	Hoch	1,04E-16	1,08E-13
Fen1	1,163493181	Hoch	3,02E-08	4,25E-06
E2f8	1,153506314	Hoch	1,12E-07	1,37E-05
Mcm3	1,151178529	Hoch	2,45E-07	2,69E-05
Tacc3	1,137218765	Hoch	1,18E-06	0,000114004
Cenpu	1,136737463	Hoch	9,51E-07	9,51E-05
Ncapd3	1,133712241	Hoch	1,14E-06	0,000113401
Hba-a2	1,122240333	Hoch	1,62E-06	0,000148107
Topbp1	1,113581268	Hoch	1,97E-06	0,00016893
Mki67	1,113484869	Hoch	1,81E-06	0,000162462
Lockd	1,107459209	Hoch	1,97E-06	0,00016893
Rrm1	1,103155684	Hoch	1,90E-08	2,97E-06
Dek	1,103066589	Hoch	1,38E-17	1,74E-14
Mad2l1	1,095350544	Hoch	4,49E-07	4,79E-05
Dtl	1,086598106	Hoch	2,19E-06	0,000184763
Chaf1b	1,080324357	Hoch	1,21E-06	0,000115712
Slbp	1,077092976	Hoch	8,88E-07	8,96E-05
Hat1	1,072029237	Hoch	1,01E-08	1,65E-06
Smc4	1,069274524	Hoch	1,85E-09	3,80E-07
Car2	1,066859391	Hoch	2,24E-09	4,41E-07
Cdkn3	1,05646223	Hoch	5,95E-06	0,000452799
Mcm5	1,053572339	Hoch	3,17E-06	0,000256297
Mthfd2	1,04168757	Hoch	3,33E-06	0,000267351
Cdca2	1,032467874	Hoch	1,02E-05	0,0007211
Cenpm	1,01225766	Hoch	1,84E-06	0,000163762
Dnajc9	1,006253662	Hoch	9,37E-08	1,18E-05
Dck	0,996075221	Hoch	4,86E-06	0,000382252
Kif20a	0,987523194	Hoch	2,41E-05	0,001455597
Hells	0,982036529	Hoch	2,78E-05	0,001663369
Kif22	0,981307521	Hoch	2,58E-05	0,001547911
Eif2ak2	0,979735138	Hoch	2,89E-05	0,001715968
Prim1	0,975435512	Hoch	1,08E-05	0,000756687
Tmpo	0,974047514	Hoch	1,15E-08	1,85E-06
Rrm2	0,969472187	Hoch	3,44E-05	0,001955557
Mcm7	0,967529631	Hoch	5,23E-06	0,000402899
Eri1	0,966965206	Hoch	2,86E-08	4,14E-06
Ube2t	0,961655248	Hoch	4,04E-05	0,002226048

## 6. Anhang

Tubb5	0,952551726	Hoch	7,82E-13	3,43E-10
Ppp1r3b	0,949199845	Hoch	1,90E-06	0,000165785
Cdt1	0,948814201	Hoch	1,73E-06	0,000156542
Ect2	0,94769799	Hoch	4,25E-05	0,002318752
Tceal9	0,94310007	Hoch	3,14E-11	1,02E-08
Nuf2	0,941744739	Hoch	7,08E-06	0,000521341
Hsp90aa1	0,939137743	Hoch	1,97E-08	3,04E-06
Aurkb	0,932986161	Hoch	6,85E-05	0,003430142
Arhgap11a	0,93289279	Hoch	3,08E-05	0,001792587
Pcna	0,932093268	Hoch	7,12E-07	7,32E-05
Rad51c	0,9305952	Hoch	7,17E-05	0,003558322
Mcm2	0,927233751	Hoch	3,56E-05	0,001989685
Anln	0,922655006	Hoch	4,79E-05	0,002576434
Ppil1	0,912605748	Hoch	1,45E-09	3,30E-07
Tubb4b	0,912382853	Hoch	2,48E-13	1,23E-10
Inhba	0,910284249	Hoch	6,89E-06	0,000511517
Serpnb8	0,909803207	Hoch	9,89E-05	0,004684322
Cdc6	0,909311456	Hoch	4,35E-05	0,002366195
Nt5dc2	0,906907655	Hoch	9,41E-05	0,004491307
Tubb2a	0,906751393	Hoch	1,14E-05	0,000779231
Cenpi	0,902880419	Hoch	3,63E-05	0,002019003
Nop58	0,883475562	Hoch	5,12E-09	8,98E-07
Rad51ap1	0,881127253	Hoch	0,000103587	0,004883999
Pkmyt1	0,878897452	Hoch	0,000130834	0,005763765
Cenpw	0,878258872	Hoch	0,000147989	0,006300568
Pgp	0,874948855	Hoch	2,37E-12	8,74E-10
Lbr	0,865319372	Hoch	3,34E-05	0,001917727
Usp1	0,865081017	Hoch	8,67E-05	0,004193323
Mcm6	0,855225093	Hoch	6,37E-07	6,67E-05
Gm8203	0,851222916	Hoch	1,62E-06	0,000148107
Arntl	0,85058432	Hoch	0,000230129	0,008781846
Cenpq	0,847703668	Hoch	0,000207903	0,008239689
Gemin6	0,84601059	Hoch	1,55E-05	0,001010582
Mis18bp1	0,841464757	Hoch	0,00012135	0,005488757
Poc1a	0,839594694	Hoch	0,000320471	0,011719805
Gm12346	0,838819787	Hoch	1,98E-06	0,00016893
Sgo2a	0,838742773	Hoch	0,000210632	0,00831596
Usp37	0,837602712	Hoch	0,000326051	0,011847886
Fam83d	0,83346538	Hoch	0,000354038	0,012695965
Pold3	0,828983777	Hoch	0,000118707	0,005417794
Zfp367	0,820810021	Hoch	6,07E-05	0,003120272
Trim59	0,81365756	Hoch	0,000148687	0,006306742
Mcm4	0,813628913	Hoch	0,000321971	0,01173704
Cks1b	0,811412063	Hoch	1,37E-05	0,000906157
Ighm	0,81101806	Hoch	0,000492422	0,016464016

## 6. Anhang

Chaf1a	0,810822304	Hoch	0,000541477	0,017856213
Ezh2	0,804613219	Hoch	0,000436513	0,015001849
Golt1b	0,803775124	Hoch	0,000370313	0,013121965
Ctps	0,801017831	Hoch	0,000457914	0,01559641
Wdr76	0,794877036	Hoch	0,000179033	0,007321748
Lsm3	0,793953212	Hoch	0,00034905	0,01256358
Mxd3	0,792907057	Hoch	8,11E-05	0,003970504
4930579G24 Rik	0,790137705	Hoch	0,000568676	0,018449799
Arhgef39	0,787028579	Hoch	0,000780649	0,023256417
Cnot9	0,784896444	Hoch	8,65E-05	0,004193323
Rpa1	0,784480309	Hoch	5,11E-06	0,000396412
Gas2l3	0,784027477	Hoch	0,000675717	0,020894115
Suv39h1	0,783530143	Hoch	0,000814039	0,024062653
Chka	0,783478683	Hoch	2,18E-05	0,001343432
Slc10a2	0,783056786	Hoch	0,000109207	0,005044759
Srsf7	0,782870078	Hoch	5,56E-06	0,000426137
Dtymk	0,780649582	Hoch	3,30E-08	4,54E-06
Plk4	0,775949457	Hoch	0,000394475	0,013722438
Gm35986	0,771724524	Hoch	0,00060348	0,019126974
Knl1	0,76877007	Hoch	0,000471123	0,015856963
Rflnb	0,767933653	Hoch	0,000654385	0,020400358
Tubgcp2	0,764143266	Hoch	0,000232447	0,008840739
Cep76	0,762083063	Hoch	0,001096274	0,030508506
Rhno1	0,761100505	Hoch	0,000905937	0,026436683
Lzts2	0,758773314	Hoch	0,000728424	0,022045945
Hist1h1b	0,756489025	Hoch	0,001089185	0,030385326
Haus4	0,756354422	Hoch	6,65E-06	0,00049909
Dhrs13	0,751909759	Hoch	0,000310674	0,011471799
Ercc6l	0,743377651	Hoch	0,000219478	0,008520124
Acaca	0,7430487	Hoch	0,000599807	0,019063516
Haus3	0,743026395	Hoch	0,001473317	0,038556306
Pcna-ps2	0,741915301	Hoch	0,001547425	0,039766028
Uhrf1	0,739935319	Hoch	0,000914362	0,026614473
Mis18a	0,738797676	Hoch	0,001620692	0,040731487
Melk	0,737428349	Hoch	0,000692083	0,021114075
Rnf168	0,73701093	Hoch	0,000253908	0,009541932
Pgd	0,736773186	Hoch	2,92E-05	0,00171895
Gtdc1	0,73554304	Hoch	0,00160021	0,040672136
Ccp110	0,735425313	Hoch	0,001399808	0,037143733
Hba-a1	0,733308542	Hoch	0,001739572	0,042776983
Rfc4	0,731494633	Hoch	0,000127898	0,005700464
Nolc1	0,728771053	Hoch	0,000769968	0,022998267
Zfp54	0,722113968	Hoch	0,002034078	0,048151107
Rfc5	0,719859772	Hoch	5,03E-05	0,002684344

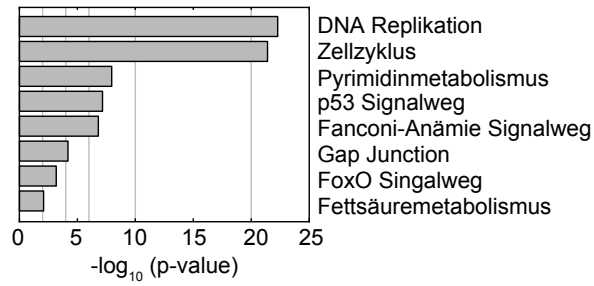
## 6. Anhang

G2e3	0,718946657	Hoch	0,001822088	0,044234094
Aacs	0,718371776	Hoch	6,73E-05	0,003381598
Bcl7c	0,713882544	Hoch	0,001335535	0,035939753
Gm30692	0,709159458	Hoch	0,001485268	0,038603428
Hmgb3	0,708517334	Hoch	0,000188327	0,007592984
Dut	0,708192183	Hoch	1,53E-06	0,000144148
Atpif1	0,706682114	Hoch	2,94E-06	0,000239903
Cdkn2d	0,704234171	Hoch	0,001772137	0,043403871
Gsta1	0,704150354	Hoch	0,000688303	0,021068481
Hyls1	0,704136731	Hoch	0,002141869	0,049672206
Gmnn	0,703857508	Hoch	0,00013414	0,005864128
Fasn	0,703533756	Hoch	0,002124331	0,049567732
H2afz	0,700251783	Hoch	0,000671522	0,020877574
Cbfb	0,700109534	Hoch	0,001905095	0,045858944
Ddias	0,692393105	Hoch	0,001669516	0,041501473
Pms2	0,687317309	Hoch	0,001663758	0,041448639
Rpa2	0,685745054	Hoch	0,000421428	0,014527187
Kif2c	0,680543762	Hoch	0,001611687	0,040684387
Aaas	0,679461298	Hoch	0,000641015	0,020148028
Hsph1	0,678848795	Hoch	0,001484596	0,038603428
Kif4	0,674397624	Hoch	0,000943458	0,027183992
Orc6	0,67429483	Hoch	0,000547786	0,018012229
Dctpp1	0,672158942	Hoch	1,22E-05	0,000826334
Sae1	0,672023535	Hoch	3,77E-05	0,00208951
Tpm4	0,666933221	Hoch	0,00039628	0,013743325
Elovl6	0,661924401	Hoch	0,000127879	0,005700464
Clec2h	-0,664802983	Runter	0,001437831	0,037801048
Pnpla2	-0,666302365	Runter	0,00010704	0,005026013
Slc25a47	-0,667424649	Runter	4,37E-09	7,91E-07
Gpcpd1	-0,670638355	Runter	0,00095513	0,027423015
Oaf	-0,671455099	Runter	1,41E-12	5,64E-10
Eps8l2	-0,67366014	Runter	4,13E-05	0,002266632
Slc22a7	-0,68562259	Runter	0,000355029	0,012695965
Fbxo21	-0,710962112	Runter	4,74E-06	0,000375938
Gne	-0,71100178	Runter	1,46E-06	0,000138531
Arsa	-0,711478646	Runter	0,00056124	0,018296428
Slc7a2	-0,712857495	Runter	1,15E-09	2,84E-07
Gnpda1	-0,716299701	Runter	0,00204692	0,048354774
Socs3	-0,719849385	Runter	0,002091135	0,049145529
Tns2	-0,727546984	Runter	0,001541823	0,039711509
Tmem140	-0,727835837	Runter	2,24E-05	0,001376584
Cyr61	-0,728106178	Runter	0,001216195	0,033284497
Eva1a	-0,728712096	Runter	4,47E-10	1,19E-07
Dedd2	-0,744791057	Runter	6,21E-05	0,003165619
Id1	-0,757389771	Runter	5,54E-05	0,002925401

## 6. Anhang

Klhl21	-0,766669298	Runter	2,31E-05	0,001404936
Ciart	-0,766756171	Runter	0,000219537	0,008520124
Trib3	-0,781748142	Runter	0,000747931	0,022576428
Inca1	-0,785939482	Runter	3,12E-05	0,001805884
Lims2	-0,788911597	Runter	2,41E-08	3,57E-06
Klf15	-0,799588542	Runter	2,13E-12	8,09E-10
Mir22hg	-0,831676008	Runter	1,55E-06	0,000145132
Junb	-0,843597977	Runter	0,000318772	0,01169514
Plk3	-0,882377072	Runter	0,000133049	0,005838797
1810055G02				
Rik	-0,928601123	Runter	4,18E-07	4,50E-05
Tef	-0,953256519	Runter	1,68E-05	0,00106606
Pck1	-0,95752642	Runter	4,98E-06	0,000389516
Bhlhe40	-0,967900536	Runter	1,87E-09	3,80E-07
Sds	-0,985509951	Runter	7,48E-16	6,57E-13
Upp2	-1,005989273	Runter	6,58E-07	6,82E-05
Angptl4	-1,010860392	Runter	2,16E-10	6,02E-08
Rnf186	-1,030989551	Runter	2,59E-06	0,000213941
Nr1d1	-1,158896381	Runter	2,25E-08	3,38E-06
Mafb	-1,236188524	Runter	4,35E-10	1,18E-07
Pcsk4	-1,382257069	Runter	1,34E-09	3,13E-07
Pim3	-1,709269232	Runter	1,76E-19	2,88E-16
Dbp	-2,038095002	Runter	5,19E-22	9,86E-19

#### 6.4 Zusätzliche Abbildung



**Abbildung 21** KEGG-Signalweg-Analyse der hoch-regulierten DEGs in Ad-CMV-GL infizierten Lebern im Vergleich zu Ad-ctrl

Sequenzierung von mRNA aus dem Lebergewebe mittels Illumina-Technologie, 2 Tage nach Infektion mit Ad-CMV-GL oder Ad-ctrl (je  $5 \times 10^8$  IFU/Maus *i.v.*),  $n=3-4$  Mäuse pro Gruppe; KEGG-Signalweg-Analyse der hoch-regulierten DEGs ( $\log_2\text{FC}=0,66$ ) in Ad-CMV-GL infizierten Lebern im Vergleich zu Ad-ctrl.

## 6.5 Publikation

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

## 6.6 Vorveröffentlichungen

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil von folgenden Konferenzbeiträgen:

Kurz S., Janas M. K., Lohr K., Klingenspor M., Wettmarshausen J., Perocchi F., Knolle P. A., Wohlleber D. „Mitochondria as immune sensors of viral infection in hepatocytes.“

Poster auf der *European Bioenergetics Conference*, 2016, Riva del Garda, Italien.

Kurz S., Janas M. K., Schneider A., Lohr K., Wettmarshausen J., Perocchi F., Knolle P. A., Wohlleber D. „Mitochondria as immune sensors of viral infection in hepatocytes.“

Vortrag auf dem *46<sup>th</sup> Annual Meeting of German Society for Immunology (DGfI)*, 2016, Hamburg, Deutschland.

Kurz S., Steiger K., Protzer U., Knolle P. A., Wohlleber D. „Hepatitis B virus escapes non-canonical CTL effector function.“

Vortrag auf dem *International HBV Meeting*, 2017, Washington DC, USA.

Kurz S., Janas M. K., Schneider A., Lohr K., Wettmarshausen J., Perocchi F., Knolle P. A., Wohlleber D. „Regulation of viral infection induced immune response in hepatocytes.“

Poster auf dem *47<sup>th</sup> Annual Meeting of German Society for Immunology (DGfI)*, 2017, Erlangen, Deutschland.

Kurz S., Steiger K., Protzer U., Knolle P. A., Wohlleber D. „Hepatitis B virus escapes non-canonical CTL effector function.“

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

Kurz S., Steiger K., Protzer U., Knolle P. A., Wohlleber D. „Hepatitis B virus escapes non-canonical CD8 T cell effector function.“

## 6. Anhang

Vortrag auf dem 28<sup>th</sup> *Annual Meeting of the Society for Virology (GfV)*, 2018, Würzburg, Deutschland

Kurz S., Steiger K., Protzer U., Knolle P. A., Wohlleber D. „Hepatitis B virus escapes non-canonical CD8 T cell effector function.“

Poster auf dem *International HBV Meeting*, 2018, Taormina, Italien

Kurz S., Janas M. K., Brugger M., Steiger K., Heikenwälder M., Knolle P. A., Wohlleber D. „Interplay of caspase activation, calcium signaling and decreased mitochondria resilience enables viral clearance in the liver.“

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