



Fakultät für Medizin

Identifizierung und Charakterisierung von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren für die adoptive T-Zell-Therapie der Hepatitis B

Kai Niklas Metzger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ulrike Protzer
2. Prof. Dr. Hana Algül
3. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 08.04.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für die Medizin am 13.04.2022 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Hepatitis B Virus und seine experimentellen Tier- bzw. Zellkulturmodelle	3
1.1.1 Epidemiologie und klinischer Verlauf der Hepatitis B	4
1.1.2 Virusmorphologie, Genomstruktur und der Replikationszyklus des HBV . . .	7
1.1.3 Pathogenese und Rolle des Immunsystems im Infektionsverlauf	10
1.1.4 Prophylaxe und Therapie der HBV-Infektion	14
1.2 T-Zellen	16
1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor	17
1.2.2 TZR:Peptid:MHC-Interaktion	18
1.2.3 Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen	20
1.3 Adoptive T-Zell-Therapie	21
1.3.1 Historischer Rückblick und zukünftige Perspektiven zur adoptiven T-Zell- Therapie der Hepatitis B	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Ergebnisse	27
2.1 Identifizierung HBV-spezifischer T-Zell-Rezeptoren	27
2.2 Klonierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in retrovirale Vektoren	31
2.3 Überprüfung der Expression und Spezifität der isolierten TZR-Ketten	32
2.4 Optimierung der Expression der isolierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren . . .	34
2.5 Expression der optimierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen	35
2.6 Funktionelle Charakterisierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen	39
2.6.1 Zytokinproduktion transduzierter HBV-spezifischer T-Zellen	39
2.6.2 Zellvermittelte Zytotoxizität transduzierter HBV-spezifischer T-Zellen	42
2.6.3 Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden	45
2.6.4 Vergleich der MHC-Restriktion der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren	50
2.6.4.1 Kalkulation der Anzahl von potentiell mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren therapierbaren chronisch HBV-Infizierten	54
2.7 Expressionsanalyse und Testung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auf Funk- tionalität in murinen T-Zellen	57

2.7.1	Expression der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in murinen T-Zellen . . .	57
2.7.2	Erkennung des modifizierten MHC der HBV-A2 Mäuse durch die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren	58
3	Diskussion	63
3.1	Identifizierung von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren	63
3.2	Optimierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren	66
3.3	Expression der optimierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen	69
3.4	Funktionelle Charakterisierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen	72
3.4.1	Zytokinproduktion transduzierter HBV-spezifischer T-Zellen	72
3.4.2	Zellvermittelte Zytotoxizität der transduzierten HBV-spezifischen T-Zellen .	74
3.4.3	Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch die transduzierten HBV-spezifischen T-Zellen	75
3.4.4	Vergleich der MHC-Restriktion von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren . . .	77
3.5	Expression und Funktionalität der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in murinen T-Zellen	79
3.6	Zusammenfassende Bewertung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren	81
3.7	Bewertung des adoptiven T-Zell-Transfers mit natürlichen T-Zell-Rezeptoren als Immuntherapie der chronischen Hepatitis B und Ausblick	84
4	Material	89
4.1	Geräte	89
4.2	Verbrauchsmaterial	89
4.3	Chemikalien / Reagenzien / Medienzusätze	90
4.4	Enzyme	92
4.5	Kits	92
4.6	Puffer und Lösungen	93
4.7	Zellen	94
4.8	Zellkulturmedien	95
4.9	Mäuse	98
4.10	Peptide	99
4.11	Streptamere	99
4.12	Antikörper (AK)	100
4.13	Plasmide	101
4.14	Primer	103
4.15	Sonstiges	105
5	Methoden	107
5.1	Allgemeine Zellkultur	107
5.2	Retrovirale Transduktion von T-Zell-Rezeptoren in humane T-Zellen	107
5.2.1	Transfektion von 293T-Zellen	107

5.2.2	Vorbereitung der humanen PBMCs	108
5.2.3	Retrovirale Transduktion der humanen T-Zellen	108
5.3	Retrovirale Transduktion von T-Zell-Rezeptoren in murine T-Zellen	109
5.3.1	Transfektion der Verpackungszelllinie Plat-E	109
5.3.2	Aufreinigung von murinen Splenozyten	109
5.3.3	Aufreinigung von primären murinen Hepatozyten	109
5.3.4	Retrovirale Transduktion der murinen T-Zellen	110
5.4	Kokulturen und funktionelle Analysen der humanen T-Zellen	111
5.4.1	Separation der CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen	111
5.4.2	Kokultur mit Hepatomazellen und XTT-Test	112
5.4.3	Kokultur mit HepaRG	112
5.4.4	Kokultur mit lymphoblastoiden Zell-Linien (LCL)	113
5.4.5	Chromium-Release-Assay	113
5.5	Kokulturen und funktionelle Analysen der murinen T-Zellen	114
5.5.1	Kokultur der transduzierten murinen B3-Zellen mit murinen Splenozyten	114
5.5.2	Kokultur der transduzierten murinen B3-Zellen mit primär murinen Hepatozyten	114
5.5.3	β -Galaktosidase-Assay	115
5.6	Durchflusszytometrie	116
5.6.1	Streptamer- und Oberflächenfärbung	116
5.6.2	Kokultur mit T2-Zellen und intrazelluläre Zytokinfärbung	116
5.7	Molekularbiologische Methoden	117
5.7.1	RNA-Isolation	117
5.7.2	cDNA-Synthese	117
5.7.3	PCR-Verfahren zur Identifizierung der TZR-Ketten	117
5.7.3.1	PCR mit degenerierten Primern	118
5.7.3.2	PCR mit Primerset für TZR-Ketten	118
5.7.4	Klonierung der einzelnen TZR-Ketten	119
5.7.5	Klonierung der optimierten TZR-Konstrukte	120
5.7.6	Gelelektrophorese und Gelextraktion	122
5.8	Sequenzierung	123
5.9	Durchführung der Modellrechnung zur Schätzung der Anzahl behandelbarer Patienten	123
5.10	Statistik	125
 Literaturverzeichnis		 127
 Abkürzungsverzeichnis		 151
 Danksagung		 153

Abbildungsverzeichnis

1.1.1	Prävalenz der Hepatitis B Infektion weltweit im Jahr 2015.	5
1.1.2	Morphologie der Viruspartikel und schematische Darstellung der Genomstruktur des HBV.	7
1.1.3	Schematische Darstellung des Lebenszyklus des HBV.	9
1.2.1	Struktur des T-Zell-Rezeptors und Variabilität des T-Zell-Rezeptor-Repertoires. . .	17
1.2.2	Aufbau des MHC-Klasse-I-Moleküls.	18
1.2.3	T-Zell-Aktivierung über den TZR:Peptid:MHC-Komplex.	19
1.3.1	Gentechnische Modifizierung von T-Zellen in der adoptiven T-Zell-Therapie.	22
2.1.1	Schema des Protokolls zur Gewinnung HBV-spezifischer T-Zell-Klone.	28
2.1.2	Zusammensetzung der T-Zell-Klone pro Spender.	30
2.2.1	Klonierung der einzelnen TZR-Ketten in den retroviralen Vektor pMP71.	31
2.3.1	Überprüfung der Expression der T-Zell-Rezeptoren und deren Funktionalität. . . .	33
2.4.1	Schematische Darstellung der Fusion der optimierten TZR-Ketten.	34
2.5.1	Expression der optimierten TZR-Konstrukte in humanen T-Zellen.	36
2.5.2	Vergleich der TZR-Expression und Streptamerbindung von transduzierten CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen.	37
2.6.1	Zytokinproduktion von TZR ⁺ CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Zellen nach Kokultur mit Peptid-beladenen T2 Zellen.	40
2.6.2	Zytotoxizität der mit HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen.	43
2.6.3	Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch transduzierte C18-spezifische CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen.	45
2.6.4	Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch transduzierte S20-spezifische CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen.	47
2.6.5	Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch transduzierte S172-spezifische CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen.	48
2.6.6	Erkennung von HBV-infizierten HepaRG durch HBV-spezifische TZR-transduzierte T-Zellen.	49
2.6.7	Erkennung unterschiedlicher HLA-A*02-Subtypen durch die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren.	50
2.6.8	Häufigkeit und Vorkommen der von unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannten HLA-A2-Subtypen in der Weltbevölkerung.	53

2.6.9	Erkennung der genotypischen Varianten der HBV-Peptide auf den HLA-A2-Subtypen.	54
2.6.10	Anzahl von CHB-Patienten, die für eine adoptive T-Zell-Therapie mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren potentiell in Frage kommen.	55
2.7.1	Expression der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in der murinen T-Zell-Linie B3Z und in primären murinen T-Zellen.	58
2.7.2	Funktionalität der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in der murinen T-Zell-Linie B3Z.	59
2.7.3	Erkennung von primär murinen Hepatozyten durch transduzierte HBV-spezifische murine T-Zellen.	61
5.4.1	Zeitplan der separaten funktionellen Testung von transduzierten CD8 ⁺ und CD4 ⁺ Zellen (Zeit in d)	111

Tabellenverzeichnis

2.1.1 Informationen zu den Blutspendern für die Gewinnung der HBV-spezifischen T-Zell-Klone (modifiziert nach Wisskirchen et al., 2017)	28
2.1.2 Identifizierte HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren.	30
2.6.1 EC ₅₀ -Werte der spezifischen Lyse durch HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren nach Transduktion in CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen.	44
5.7.1 PCR zur Amplifikation der optimierten variablen und konstanten TZR-Regionen. . .	121
5.7.2 Fusions-PCR zur Generierung der optimierten TZR-Ketten.	122
5.7.3 Fusions-PCR zur Generierung der optimierten TZR-Konstrukte mit den über das P2A verbundene β und α -TZR-Ketten.	122

Zusammenfassung

Weltweit sterben jährlich ca. 1 Million Menschen an den Folgen der chronischen Hepatitis B bei weltweit 250 Millionen chronisch HBV-Infizierten. Die aktuell zur Verfügung stehenden medikamentösen Therapien der Hepatitis B sind nicht kurativ, da die Replikationsvorlage des Virus, die cccDNA, und somit das Virus trotz Therapie persistiert. Die akute Hepatitis B heilt hingegen selbstlimitierend aus. Dabei scheint eine effektive T-Zell-Antwort eine tragende Rolle in der Viruselimination zu spielen. Beim chronischen Verlauf der Hepatitis B fehlt diese starke T-Zell-Antwort und das Virus persistiert. Durch die chronische Inflammation kann es im weiteren Verlauf zu potentiell letalen Folgeerkrankungen wie Leberzirrhose oder einem hepatozellulären Karzinom kommen. Die Idee der adoptiven T-Zell-Therapie der chronischen Hepatitis B ist es, autologe T-Zellen von chronisch HBV-Infizierten mit einem HBV-spezifischen Antigenrezeptor zu versehen, mit dem Ziel durch Transfer dieser gentechnisch modifizierten T-Zellen in chronisch Infizierten eine Immunität gegen HBV zu erreichen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren für die potentielle Anwendung in der adoptiven T-Zell-Therapie der Hepatitis B zu identifizieren und zu charakterisieren. Es wurden hierfür aus der mRNA von HBV-spezifischen T-Zell-Linien bzw. -Klonen aus HLA-A*02:01⁺ Spendern die codierenden Sequenzen der α - und β -TZR-Ketten identifiziert und, nach Amplifikation der kompletten Ketten, diese in den retroviralen Vektor MP71 kloniert. Es gelang dabei die Identifikation von insgesamt 11 HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren. Fünf besaßen dabei eine Antigenpezifität für das C18-Peptid aus dem Core-Protein des Virus, vier für das S20-Peptid und zwei für das S172-Peptid. Beide letzteren Peptide sind aus den Surface-Proteinen des HBV. Die T-Zell-Rezeptoren wurden anschließend per retroviraler Transduktion in T-Zellen eingebracht und die Expression nach Streptamer- und Antikörperfärbung per FACS-Analyse überprüft. In einer Kokultur mit Peptid-beladenen Zielzellen wurde anschließend mittels IFN- γ -ELISA, die HBV-spezifische Effektorantwort überprüft. Jeder dieser elf HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurde nach retroviraler Transduktion in humanen T-Zellen exprimiert und verlieh diesen eine HBV-Spezifität. Um die Expressionsraten zu erhöhen, wurden die variablen Regionen der TZR-Ketten codonoptimiert, die konstanten Regionen der TZR-Ketten durch murine konstante Regionen ersetzt und diese optimierten TZR-Ketten eines T-Zell-Rezeptors, verbunden über ein P2A-Element, in denselben retroviralen Vektor eingefügt. Hierdurch konnte eine deutlich bessere Expression für die T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen erreicht werden. Es wurde nun überprüft, ob die mit den optimierten T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen auch eine HBV-spezifische Effektorfunktion durch die gentechnische Modifizierung erlangten bzw. wie sensitiv diese Effektorantwort war. Hierzu wurde nach Kokultur von transduzierten CD4⁺ bzw. CD8⁺

T-Zellen mit Peptid-beladenen T2-Zellen mittels eines ICS die spezifische Zytokinproduktion der transduzierten T-Zellen und mittels eines Chrome-Release-Assays die spezifische Lyse von Zielzellen durch die Effektorzellen analysiert. Sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen wurden zu HBV-spezifischen Effektorzellen, die sogar picomolare Konzentrationen des entsprechenden Peptids erkannten. Die transduzierten CD8⁺ T-Zellen produzierten spezifisch IFN- γ und TNF- α und eliminierten spezifisch Zielzellen. Die Core-spezifischen T-Zellen waren dabei am sensitivsten gefolgt von den S20-spezifischen und dann den S172-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die transduzierten CD4⁺ T-Zellen, mit Ausnahme der mit den T-Zell-Rezeptoren FLP122 und WL31 transduzierten CD4⁺ T-Zellen, produzierten IFN- γ , TNF- α und IL-2 und zeigten ebenfalls eine zytotoxische Effektorantwort. Mit einer Kokultur der transduzierten T-Zellen mit HBV⁺ Hepatomazellen und anschließender Durchführung eines XTT-Viabilitätstests von den Hepatomazellen und einem IFN- γ -ELISA aus dem Überstand wurde überprüft, ob die Effektorzellen auch endogen prozessierte Peptide erkannten. Die transduzierten C18-spezifischen und S20-spezifischen T-Zellen erkannten auch das jeweilige Peptid, wenn es ihnen von HBV-replizierenden Hepatomazelllinien (HepG.2.2.15) per endogener Prozessierung auf MHC-I-Molekülen präsentiert wurde. Die S172-spezifischen T-Zellen erkannten hingegen die HBV-replizierenden Hepatomazelllinien HepG2.2.15 nicht, sondern nur die mit HBV-infizierten Zellen der Hepatomazelllinie HepaRG. Die HLA-Restriktion ist in der adoptiven T-Zell-Therapie ein limitierender Faktor. In einer Kokultur der transduzierten T-Zellen mit lymphoblastoiden Zelllinien, die unterschiedliche HLA-A2-Subtypen exprimierten, wurde mittels IFN-ELISA die T-Zell-Aktivierung bestimmt. Unsere T-Zell-Rezeptoren erkannten das entsprechende HBV-Peptid dabei nicht nur auf dem HLA-A*02:01-Molekül sondern auch unterschiedlich gut auf weiteren HLA-A2-Subtypen. Zusammenfassend wurden 11 der 12 getesteten HLA-A2-Subtypen bis auf den Subtyp HLA-A*02:08 durch mindestens einen unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannt. Dabei wurden auch die in China häufig vertretenen HLA-A2-Subtypen 02:03, 02:06 und 02:07 von mindestens einem T-Zell-Rezeptor erkannt. Nach einer Kalkulation in der die Prävalenz der HLA-A2-Subtypen und HBV-Genotypen pro Land mit einbezogen wurde, konnte gezeigt werden, dass theoretisch in China 29 Millionen und weltweit mindestens 60 Millionen chronisch HBV-Infizierte mit mindestens einem unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren behandelt werden könnten. Es wurden zudem alle T-Zell-Rezeptoren nach retroviraler Transduktion auch in murinen T-Zellen exprimiert, sodass sie sich auch für weitere *in-vivo* Analysen im Mausmodell eignen würden. Ebenso konnte demonstriert werden, dass die transduzierten murinen T-Zellen die HBV-Peptide auf dem modifizierten HLA-A2-Molekül „HHD“, welches in dem HBV- und HHD-transgenen Mausmodell HBV-A2 verwendet werden soll, erkannten.

Zusammenfassend wurden 11 HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren gegen 3 bekannte immunogene HBV-Peptide isoliert, die nach retroviraler Transduktion CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in hochavide polyfunktionale zytotoxische Effektor-T-Zellen umwandelten. Dieses T-Zell-Rezeptor-Repertoire ist dabei nicht HLA-A*02:01 restringiert, sondern deckt ein breiteres Spektrum an HLA-A2-Subtypen ab, darunter auch die in Asien gehäuft vorkommenden HLA-A2-Subtypen. Mit diesen Eigenschaften könnten unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren für die adoptive T-Zell-Therapie der Hepatitis B bestens geeignet sein, um das Ziel der HBV-Immunität per T-Zell-Transfer in chronisch HBV-Infizierten zu erreichen.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Hepatitis B Virus und seine experimentellen Tier- bzw. Zellkulturmodelle

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts zeigte sich, dass es verschiedene infektiöse Hepatitiden gibt (Trepo, 2014). Krugman und andere beschrieben 1967 zunächst zwei Formen: die klassische infektiöse Hepatitis, die der Hepatitis A entspricht, und die sogenannte Serum-Hepatitis, die wir heutzutage als Hepatitis B bezeichnen (Krugman et al., 1967). Zur selben Zeit entdeckten Blumberg und Kollegen ein Antigen, welches gehäuft im Blutserum von Patienten mit Down-Syndrom, Leukämie oder Hepatitis nachgewiesen werden konnte (Blumberg et al., 1967). Auch Prince und seine Kollegen beschrieben ein Antigen, welches sie bei der serologischen Untersuchung von Patienten mit transfusionsassoziierten Hepatitis fanden (Prince, 1968a). Es handelte sich in beiden Fällen um serologisch nachweisbare Hüllproteine des Hepatitis B Virus (HBV)(Prince, 1968b), die heute als Oberflächenantigen des HBV (*HBV surface antigen* (HBsAg)) bezeichnet werden. 1970 gelang es Dane und Kollegen erstmals das HBV als 42 nm großes Viruspartikel mit Nucleokapsid als Erreger der Serum-Hepatitis elektronenmikroskopisch darzustellen (Dane et al., 1970). Mit der Identifikation der Hepatitis B wurde eine weitere Form der transfusionsassoziierten Hepatitis beschrieben, die *Non-A-non-B*-Hepatitis. Als ursächlicher Erreger für diese wurde Ende der 1980er Jahre das Hepatitis C Virus identifiziert (Trepo, 2014).

Das humane HBV ist als partiell doppelsträngiges DNA-Virus das Paradebeispiel für die Familie der *Hepadnaviridae*. Kennzeichnend für die Hepadnaviren sind der Lebertropismus, ihre hohe Wirtsspezifität, der ähnliche morphologische und genetische Aufbau der Viren sowie die Replikation über eine RNA-Zwischenstufe (Mason et al., 2005).

Die Familie der Hepadnaviren wird in die zwei Gattungen *Orthohepadnavirus* und *Avihepadnavirus* unterteilt. Hepadnaviren, die Säugetiere wie Primaten und Nagetiere infizieren, werden der Gattung *Orthohepadnavirus* zugeteilt. Einige Tiere und ihre entsprechenden Hepatitisviren können als Tiermodelle für das HBV verwendet werden. Schimpansen können dabei auch mit dem humanen HBV infiziert werden (Barker et al., 1975), sind jedoch aufgrund ethischer Bedenken, hoher Kosten und aufwendiger Haltung kein geeignetes Tiermodell (Inuzuka et al., 2014). Das *woodchuck hepatitis virus* (WHV) des nordamerikanischen Waldmurmeltieres *Marmota monax* ist ein naher Verwandter

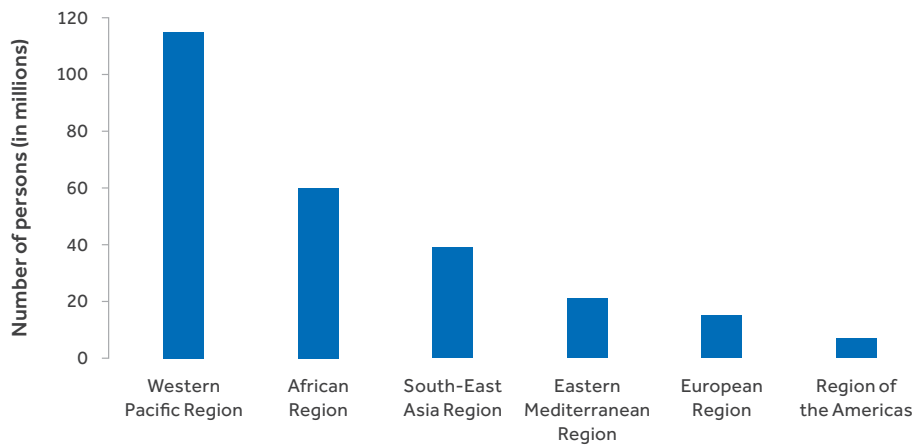
des HBV (Summers et al., 1978). Da Murmeltiere gut haltbare Labortiere sind, sind sie für die Forschung an WHV ein gerne verwendetes *in vivo* Modell für Hepadnaviren (Dandri et al., 2005). Der Gattung *Avihepadnavirus* werden die Hepadnaviren zugeschrieben, die in Vögeln zu finden sind, wie z.B. das *duck hepatitis B virus* (DHBV) in Enten (Mason et al., 1980). Das DHBV eignet sich als Tiermodell für HBV nur für gewisse Fragestellungen, da das Genom der Avihepadnaviren nur noch zu 40 % mit dem HBV Genom identisch ist (Schaefer, 2007) und auch die Ente als Wirt im Stoffwechsel deutliche Unterschiede zum Menschen aufweist (Dandri et al., 2005).

Da Mäuse nicht auf natürlichem Wege mit HBV infiziert werden können, wurden für die Hepatitis B verschiedene Mausmodelle entworfen. Eine Möglichkeiten besteht darin, Teile oder das ganze HBV-Genom als Transgen in die Maus einzubringen (Guidotti et al., 1995; Chisari et al., 1985). Hiermit wurde im Mausmodell von Guidotti und Kollegen eine HBV-Replikation in Leber- und Nierenzellen erreicht, die mit ihrer Viruslast der in chronisch infizierten Patienten ähnelt. Durch ihre zusätzliche Toleranz gegen HBV-Antigene, ist die transgene Maus deshalb ein Tiermodell für die chronische Hepatitis B (Guidotti et al., 1995). Als eine Alternative ermöglicht ein Adenovirus-vermittelter Genom-Transfer eine titrierbare HBV-Replikation in der Maus (Sprinzl et al., 2001). Dion und Kollegen entwickelten ein weiteres chronisches murines HBV-Modell, indem sie Leberzellen mit einem Adenovirus assoziierten Virus, der ein replikationsfähiges HBV-DNA Genom enthielt, transduzierten (Dion et al., 2013). Für die Untersuchung des HBV *in vitro* eignen sich Hepatoma-Zelllinien und primäre Hepatozyten. Humane Hepatozyten (Gripon et al., 1993) und auch primäre Hepatozyten des Spitzenhörnchens *Tupaia belangeri* wurden *in vitro* erfolgreich mit HBV infiziert (Walter et al., 1996). Eine Replikation des HBV in der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 konnte zunächst nur durch die Transfektion eines klonierten HBV-Genomes erreicht werden (Sells et al., 1987). Und erst mit der Generierung der HepaRG-Zell-Linie, deren Zellen nach Ausdifferenzierung humanen Hepatozyten ähneln, gelang die *in vitro* Infektion einer Hepatoma-Zelllinie mit HBV (Gripon et al., 2002). Mit der Entdeckung des *Na⁺ taurocholate cotransporter polypeptide* (NTCP) als Rezeptor für die rezeptorvermittelte Endozytose des HBV (Yan et al., 2013; Yan et al., 2012) gelang die Generierung eines *in vitro* Modells, welches die Untersuchung des gesamten HBV Lebenszyklus auch über eine längere Zeit ermöglicht (Ko et al., 2018).

1.1.1 Epidemiologie und klinischer Verlauf der Hepatitis B

Mit etwa 2 Milliarden Menschen, die eine HBV-Infektion durchgemacht haben oder aktuell durchlaufen, gehört die Hepatitis B zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit (Perz et al., 2006). Ca. 3,5 % der Weltbevölkerung, das entsprach im Jahr 2015 257 Millionen Menschen, leiden an einer chronischen Hepatitis B (CHB) (WHO, 2017) und haben somit ein erhöhtes Risiko, an den Folgeerkrankungen der Hepatitis B zu erkranken und zu versterben. Etwa 20–30 % der chronisch Hepatitis B infizierten Patienten entwickeln eine Leberzirrhose und/oder ein hepatozelluläres Karzinom (*WHO - Fact sheets: Hepatitis B* 2019). Im Jahr 2016 starben ca. 979 000 Menschen an Hepatitis B, davon ca. 111 000 Personen an einer akuten Hepatitis B, 382 000 Personen an einem hepatozellulären Karzinom und 486 000 Personen an einer Leberzirrhose aufgrund einer chronischen Hepatitis (WHO, 2018).

Es sind dabei deutliche geographische Unterschiede bezüglich der Prävalenz der Hepatitis B zu



WHO region	Estimates of the prevalence of HBV infection (%)			Estimated number of persons living with HBV (millions)		
	Uncertainty interval (95%)			Uncertainty interval (95%)		
	Best	Lower	Higher	Best	Lower	Higher
African Region	6.1	4.6	8.5	60	45	84
Region of the Americas	0.7	0.4	1.6	7 ^a	4	16
Eastern Mediterranean Region	3.3	2.6	4.3	21	17	28
European Region	1.6	1.2	2.6	15	11	23
South-East Asia Region	2.0	1.5	4.0	39	29	77
Western Pacific Region	6.2	5.1	7.6	115	93	140
Total	3.5	2.7	5.0	257	199	368

Abb. 1.1.1: Prävalenz der Hepatitis B Infektion (HBsAg) weltweit im Jahr 2015. Im Graphen ist die Anzahl der HBV-infizierten Personen im Jahr 2015 in den entsprechenden WHO-Regionen dargestellt. In der Tabelle die geschätzte Prävalenz der HBV-Infektion bzw. geschätzte Anzahl an HBV infizierten Personen (modifiziert nach WHO, 2017).

vermelden (s. Abb. 1.1.1). In Afrika und in der westpazifischen Region sind etwa 6 % der Einwohner mit HBV infiziert. Damit kommen 68 % aller HBV-infizierten Personen aus der westpazifischen Region und Afrika. Im östlichen Mittelmeerraum und in Südostasien liegt die Prävalenz bei 3,3 % bzw. 2,0 %. In Europa liegt die HBV-Prävalenz bei 1,6 % und in Amerika sogar mit 0,7 % unter 1 %.(WHO, 2017)

Die Art der Ansteckung mit HBV unterscheidet sich dabei in den Regionen mit unterschiedlicher Prävalenz. In Niedrigprävalenzgebieten wie z.B. in Deutschland erfolgt die HBV-Infektion meist durch sexuellen Verkehr oder durch anderweitigen Kontakt (insbesondere intravenösen Drogengebrauch) mit kontaminiertem Blut oder anderen Körperflüssigkeiten. In den hoch endemischen Gebieten erfolgt die Übertragung meist durch Kontakt mit mütterlichem HBV-positivem Blut im Rahmen der Geburt (perinatale oder vertikale Transmission) oder im späteren Kindesalter per horizontaler Transmission durch Kontakt mit infiziertem Blut.(Dudareva et al., 2019; WHO - Fact sheets: Hepatitis B 2019)

Bei Erwachsenen verläuft die HBV-Infektion meist asymptomatisch oder geht lediglich mit unspezifischen Beschwerden einher. In etwa einem Drittel der Fälle entwickelt sich eine akute Hepatitis mit reduziertem Allgemeinzustand, Oberbauchbeschwerden, Übelkeit und Erbrechen sowie einer

ikterischen Haut- bzw. Sklerenfarbe aufgrund des erhöhten Bilirubins im Rahmen des akuten Leberschadens. In 0,5 % Prozent kommt es zu einem fulminanten Krankheitsverlauf mit akutem Leberversagen. Während der akuten HBV-Infektion entwickeln die meisten Patienten durch Produktion von HBV-spezifischen Antikörpern eine lebenslange Immunität. Zwischen 5–10 % der mit HBV-infizierten Erwachsenen entwickeln allerdings eine subklinische chronische Hepatitis. Bei Kindern und immunsupprimierten Patienten ist die Wahrscheinlichkeit eine chronische HBV-Infektion zu entwickeln mit 90 % bzw. 30–90 % deutlich höher. (Dudareva et al., 2019)

Die Inkubationszeit für HBV beträgt zwischen 30 und 180 Tagen. Da die HBV-Infektion klinisch nicht von anderen Hepatitiden zu unterscheiden ist, erfolgt die Diagnose über direkten (HBV-PCR, HBV-Antigen) oder indirekten Erregernachweis (Antikörper gegen HBV-Antigene) im Labor. Nach einer Infektion kommt es zwischen der 1.–12. Woche zunächst zu einem Anstieg des HBsAg sowie der HBV-DNA im Serum. Ca. 2–6 Wochen später kommt es dann zum Anstieg der Lebertransaminasen und zur klinischen Manifestation. Obwohl das *HBV core antigen* (HBcAg) nicht routinemäßig im Serum nachzuweisen ist, können die Antikörper gegen HBcAg als erste HBV-spezifische Antikörper etwa 1–2 Wochen nach dem HBsAg-Anstieg detektiert werden. Anhand der Unterscheidung der Immunglobulinsubklassen in Anti-HBc-IgM und IgG kann dabei eine frische Infektion von einer schon länger bestehenden Infektion unterschieden werden. Vor allem während der hochaktiven Virusreplikation kann zudem auch das HBe-Antigen im Serum festgestellt werden, welches einen indirekten qualitativen Parameter für die Virusreplikation darstellt. Beim akuten Verlauf kommt es, kurz nachdem die Werte der Lebertransaminasen ihren Höhepunkt erreichen, zur Serokonversion von HBe zu Anti-HBe. Mit dem Verschwinden des HBsAg im Verlauf und dem Nachweis von Anti-HBs-Antikörpern und der somit lebenslangen Immunprotektion, spricht man von einer ausgeheilten akuten Hepatitis B. (Dienstag und Schmidt, 2009)

Wird das HBsAg länger als 6 Monate nachgewiesen, spricht man von einer chronischen Hepatitis B (CHB). Hierbei können mehrere Phasen durchlaufen werden. In der immuntoleranten Phase repliziert das Virus ungehindert. Dies führt zu hohen Konzentrationen an viraler DNA und HBeAg im Serum, bei normwertigen Lebertransaminasespiegeln. Daran schließt sich meist eine immunaktive Phase an, in der durch die hervorgerufene Immunreaktion einerseits die virale Replikation eingedämmt wird, es andererseits aber auch zu einer vermehrten Leberzellschädigung mit erhöhten Lebertransaminasen im Blut und einem zirrhotischen Umbau der Leber kommt. Bei 5–10 % Patienten pro Jahr geht dies anschließend in eine niedrig replikative Phase über, in der die Serum HBV-DNA unterhalb der Nachweisgrenze liegt und die inflammatorisch bedingte Leberzellschädigung zurückgeht. Dabei kommt es meist zur Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe (McMahon, 2009). Gelegentlich, insbesondere bei Immunsuppression, kann es auch zu einer erneuten Reaktivierung mit hohen Titern von HBV-DNA, HBeAg und Transaminasespiegeln kommen (Bessone und Dirchwolf, 2016).

Die chronische Hepatitis B und deren Heilung ist insbesondere aufgrund ihrer schweren und potentiell letalen Folgeerkrankungen weltweit von gesundheitspolitischem Interesse.

1.1.2 Virusmorphologie, Genomstruktur und der Replikationszyklus des HBV

HBV-infizierte Zellen bilden sowohl infektiöse ca. 42 nm große Virionen, als auch nicht infektiöse ca. 20 nm große subvirale Partikel. Letztere können eine sphärische oder eine tubuläre Form besitzen (s. Abb. 1.1.2 a-c) und kommen weitaus häufiger im Blut von HBV-Infizierten vor als das HBV-Virion (Kann und Gerlich, 2005).

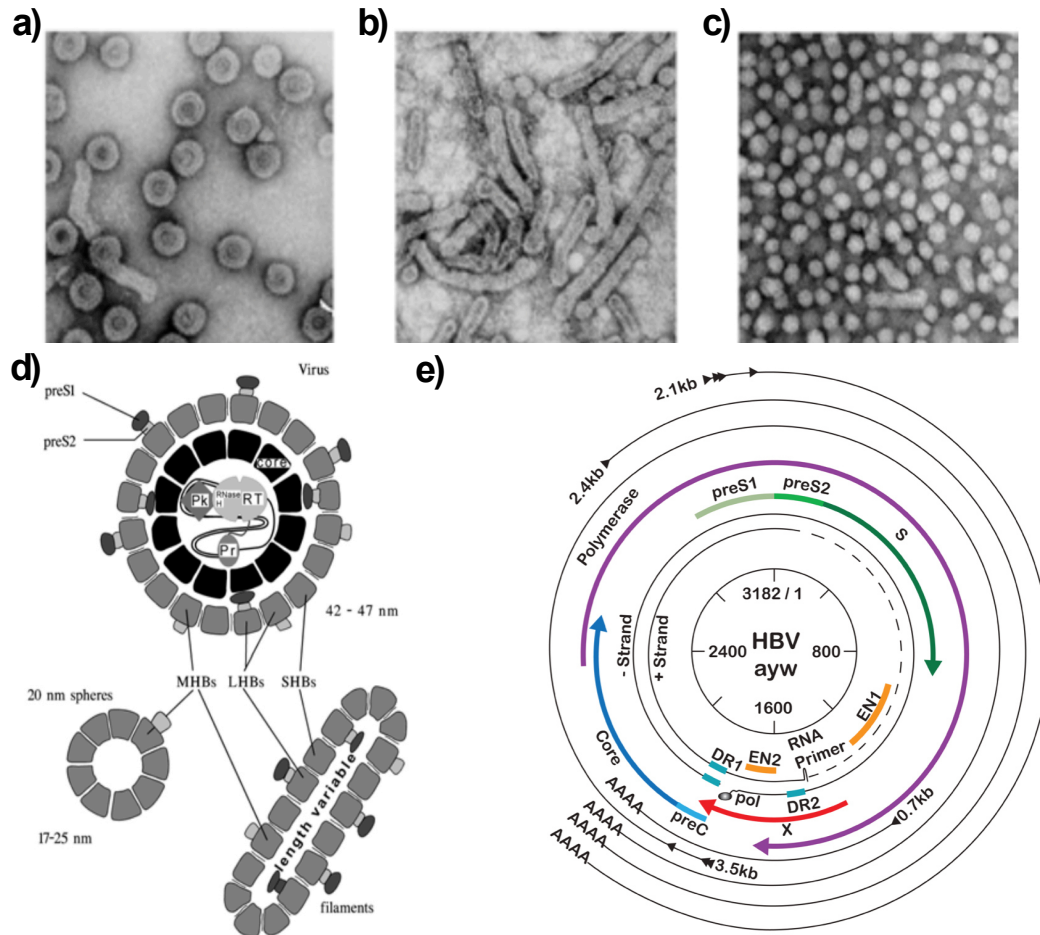


Abb. 1.1.2: Morphologie der Viruspartikel und schematische Darstellung der Genomstruktur, Gene und mRNA des HBV. a-c) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) infektiösen HBV-Viruspartikeln und (b) den nichtinfektiösen Filamenten und (c) Sphären (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005). d) Schematische Darstellung des Virion und subviraler Partikel. Die virale partiell-doppelsträngige DNA ist als Linie dargestellt. Assoziiert mit der DNA ist die virale Polymerase (grau) mit Primer-Domäne (Pr) und Reverse-Transkriptase-Domäne (RT). Das Nukleokapsid (schwarz) setzt sich aus 120 Dimeren des Core-Proteins zusammen. Die drei unterschiedlich großen Hüllproteine „S“ (*small*), „M“- (*middle*) oder „L“- (*large*) sind abhängig von ihrer Zusammensetzung in grau mit einer dunkelgrauen Prä-S1-Domäne, einer hellgrauen Prä-S2-Domäne und einer mittelgrauen S-Domäne dargestellt (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005). e) Beispielhafte Darstellung des HBV-Genoms (Genotyp ayw). Der innere Kreis zeigt die Position relativ zur EcoRI-Schnittstelle an Position 1. Dargestellt ist die rcDNA, wie sie in HBV-Virionen vorliegt, mit ihrem kompletten Minusstrang (-Strand), an der die virale Polymerase hängt, und dem Plusstrang (+Strand) mit dem inkompletten 3'-Ende (gestrichelt). Es sind die Bindungstellen der Primer und die zwei *direct repeat* Sequenzen DR1 und DR2, die wichtig für die DNA-Replikation sind, eingezeichnet. Die überlappenden *open reading frames* (ORFs) P, PreS1\PreS2\S, preC\Core und X sind farblich und dick hervorgehoben. Die äußeren Linien stellen die RNA-Transkripte (0,7-kb X mRNA (für das HBx), 2,1-kb S mRNA (für das M and S Hüllprotein), 2,4-kb preS mRNA (für das große L Hüllprotein), and die 3,5-kb lange pgRNA (für das Core-Protein und die virale Polymerase). Die 3,5-kb precore RNA, über die das HBeAg Protein exprimiert wird, ist nicht dargestellt (modifiziert nach Lamontagne et al., 2016).

Das HBV-Genom umfasst je nach Genotyp 3182 bis 3248 Basenpaare und beinhaltet vier überlappende

Leserahmen und codiert sieben Proteine (s. Abb. 1.1.2 e) (Schaefer, 2007; Seeger und Mason, 2015). Dabei hat das HBV das kleinste Genom unter den DNA-Viren und ist sehr kompakt in seinem Aufbau (Tong und Revall, 2016).

Der offene Leserahmen der HBV-Hüllproteine (präS1/präS2/S ORF) codiert die drei Hüllproteine des HBV. Abhängig vom jeweiligen Translationsstart in präS1, präS2 oder S entsteht das große Hüllprotein „L“ (PräS1+PräS2+S), das mittlere Hüllprotein „M“ (PräS2+S) oder das kleine Hüllprotein „S“ (S) (s. Abb. 1.1.2 d, e) (Heermann et al., 1984; Kann und Gerlich, 2005).

Der präC/C ORF kodiert das Core-Protein als Baustein des Nukleokapsids und das HBeAg. Abhängig davon ob die Translation vom Startcodon in der präC oder der C-Region beginnt, wird das HBeAg oder das *Core*-Protein (HBcAg) exprimiert (Tong und Revall, 2016).

Das Polymerase-Gen (P), welches die virale Polymerase codiert, überlappt mit dem 3'-Ende des Core-Gens, dem kompletten präS1/präS2/S ORF und dem 5'-Ende des X-Gens. Die virale Polymerase agiert sowohl als DNA-abhängige DNA-Polymerase wie auch als reverse Transkriptase, aber enthält im Gegensatz zur retroviralen Transkriptase keine Integrase (Kann und Gerlich, 2005).

Das x-Gen ist das vierte HBV-Gen, welches das nicht strukturelle X-Protein (HBx) kodiert. Dieses wird nach der Infektion der Wirtszelle exprimiert und reguliert die HBV-Transkription und ist sowohl für die Initiierung als auch für die Erhaltung der HBV-Replikation notwendig (Lucifora et al., 2011).

Das Eindringen in die Zelle gelingt dem Hepatitis B Virus durch rezeptorvermittelte Endozytose (s. Abb. 1.1.3 (1–3)). Bis vor kurzem war dabei unklar, an welchen Rezeptor das Virus bindet. Yan und Kollegen konnten 2012 das humane NTCP als den gesuchten Rezeptor identifizieren, an den das HBV mit seiner PräS1-Domäne des großen Hüllproteins bindet und in die Zielzelle eindringt. NTCP wird nur in humanen Leberzellen exprimiert, wodurch der Hepatotropismus und die Spezifität des HBV erklärt ist (Yan et al., 2013; Yan et al., 2012).

Die in das Zytoplasma freigegebenen Kapside und das darin verpackte Virusgenom werden aufgrund einer Kernlokalisierungssequenz über Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert (Rabe et al., 2003; Rabe et al., 2009) (s. Abb. 1.1.3 (4–5)). Dort wird das nichtkovalent geschlossene Virusgenom (*relaxed circular DNA* (rcDNA)) freigesetzt und gelangt dann in den Zellkern (s. Abb. 1.1.3 (6)). Hier wird die unvollständige rcDNA durch die virale Reverse Transkriptase oder zelluläre Transkriptasen vervollständigt, woraus der zirkulär geschlossene DNA-Doppelstrang entsteht (im eng. *covalently closed circular DNA* (cccDNA)) (s. Abb. 1.1.3 (7)). Die cccDNA stellt, an Histione gebunden, ein Minichromosom im Kern der Wirtszelle (Bock et al., 2001) dar und dient als Transkriptionsvorlage und zur viralen Replikation.

Von der cccDNA erfolgt die Transkription der fünf mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II (s. Abb. 1.1.3 (8)). Gemeinsam ist allen viralen mRNA-Transkripten das co-terminale polyadenylierte 3'-Ende. Von der 0,7- und 2,4-kb mRNA erfolgt die Translations des HBx-Proteins beziehungsweise des großen Hüllproteins „L“. Die 2,1-kb mRNA ist Vorlage sowohl für die Translation des mittleren Hüllproteins „M“ wie auch des kleinen Hüllproteins „S“. Des weiteren gibt es zwei 3,5-kb lange RNA-Stränge. Der etwas kürzere Strang wird als prägenomische RNA bezeichnet, die einerseits als Vorlage zur Synthese der Polymerase und des Core-Proteins, andererseits als Vorlage zur reversen Transkription für die virale Replikation dient. Von der etwas längeren 3,5-kb präCore-mRNA erfolgt

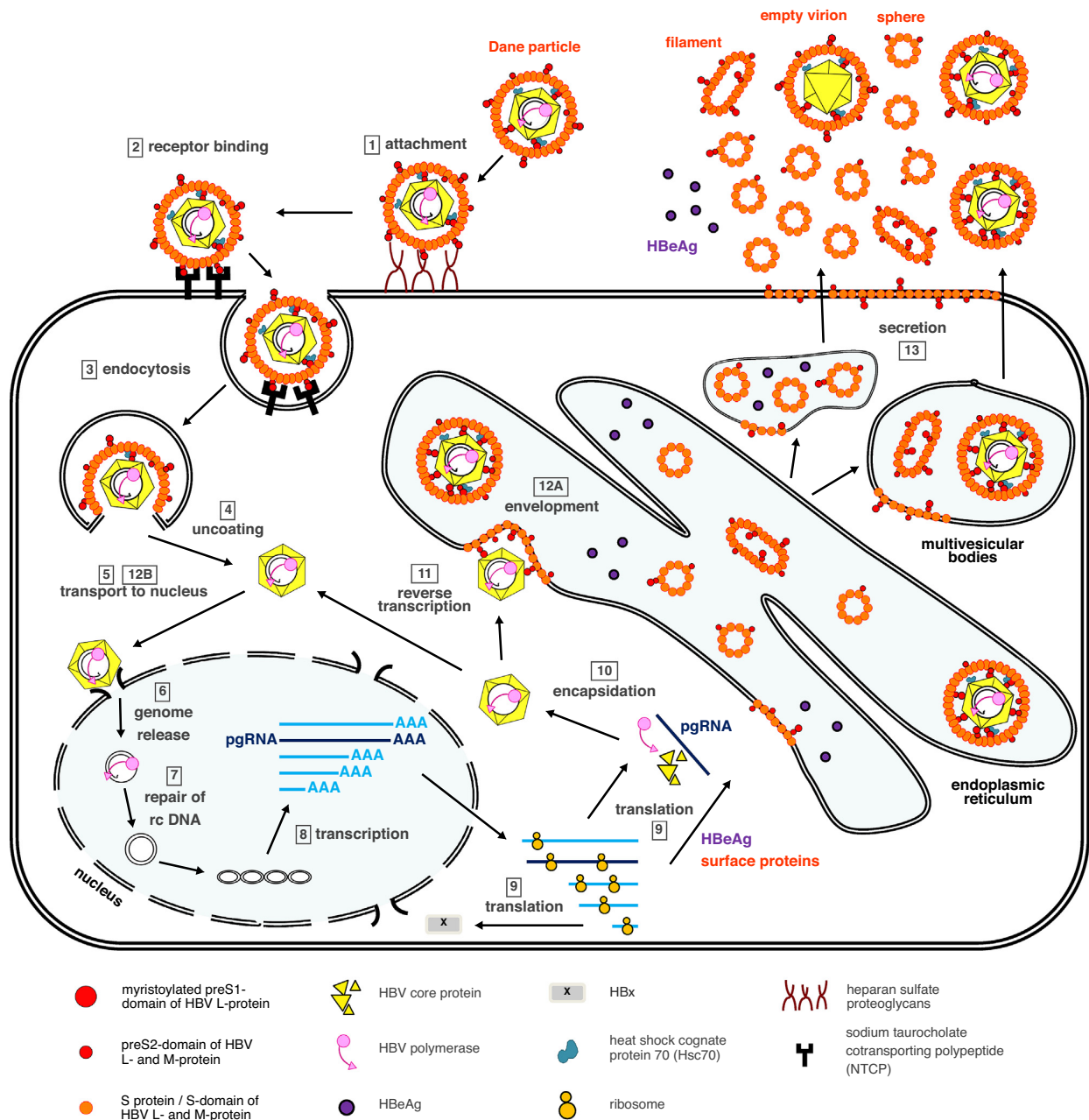


Abb. 1.1.3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus des HBV. (1) Unspezifische Bindung von HBV an Heparansulfat-Proteoglykane (2) spezifische Bindung an NTCP (3) rezeptorvermittelte Endozytose (4–5) Auspacken und Transport des Nukleokapsids zu den Kernporen (6) Freigabe des viralen DNA-Genoms (rcDNA) in den Zellkern (7) Vervollständigung zur cccDNA (8) Transkription (9) Translation: HBsAg und HBeAg am ER mit anschließendem Transport über den Golgi-Apparat; HBcAg, Polymerase und X-Protein an freien Ribosomen im Zytoplasma. (10) Bindung der Reversen Transkriptase an die prägenomische mRNA und Initiierung der Verpackung des Genoms mit Homodimeren des Core-Proteins (11) reverse Transkription der prägenomischen mRNA (12A) Ummantelung mit Lipidschicht und den Hüllproteinen des Viruskapsids oder (12B) Reimport reifer Viruskapside in den Zellkern (13) Sekretion der neu gebildeten Hepatitis B Viren (Ko et al., 2017).c

die Translation des „präcore\core“-Proteins. Mit der in der präC-Region codierten Signalsequenz wird das Transkript zum glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Mit der Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids und argininreicher Sequenzen am C-Terminus des „präcore\core“-Proteins entsteht das lösliche HBeAg, welches in das Lumen des ER abgegeben und dann über den

Golgi-Apparat und deren Vesikel sezerniert wird (s. Abb. 1.1.3 (9)). (Tong und Revill, 2016)

Die Bildung der Oberflächenproteine erfolgt ebenfalls am rauen endoplasmatischen Retikulum (s. Abb. 1.1.3 (9)). Die Oberflächenproteine werden dort mittels ihrer Transmembrandomänen in der Lipidschicht verankert.

Indem das P-Protein an eine stabile Haarnadelschleife (ε -Verpackungssignal) der prägenomischen RNA bindet, wird der Initiationskomplex der Replikation gebildet (s. Abb. 1.1.3 (10)) und die Verpackung des viralen Genoms in die Kapside eingeleitet (Bartenschlager und Schaller, 1992). Die Kapside werden dabei aus Homodimeren des Core-Proteins gebildet und durch weitere zelluläre Proteine modifiziert. In den reifenden Nukleokapsiden erfolgt währenddessen die reverse Transkription der prägenomischen RNA (s. Abb. 1.1.3 (11–12A)) in den DNA-Negativstrang und die unvollständige Bildung des DNA-Positivstrangs, was dann die bereits erwähnte rcDNA darstellt (Seeger und Mason, 2015).

Nach diesem Reifungsprozess werden die Kapside durch die HBsAg-enthaltende ER-Membran umhüllt und die fertigen Viruspartikel wahrscheinlich über Golgi-Vesikel an der Zelloberfläche freigesetzt. Einige der Nukleokapside werden nicht umhüllt und nicht sezerniert und gelangen darum über ihre Signalsequenz zurück zum Zellkern (s. Abb. 1.1.3 (12B)). Durch diesen Reimport akkumulieren die Virusgenome mit bis zu 100 cccDNA-Kopien im Zellkern (Modrow et al., 2010). Dieser komplexe Replikationszyklus mit Generierung der cccDNA als hocheffiziente Transkriptionsvorlage scheint u.a. ausschlaggebend für die Persistenz der Infektion bei chronisch Infizierten zu sein. Die cccDNA ist daher ein wichtiger Angriffspunkt bei der Entwicklung neuerer Therapien zu Heilung der Hepatitis B.

1.1.3 Pathogenese und Rolle des Immunsystems im Infektionsverlauf

Die Immunantwort auf eine HBV-Infektion ist entscheidend für den klinischen Verlauf und die Pathogenese der Hepatitis B. Das HBV ist ein nicht zytopathisches Virus und erst durch die Immunantwort kommt es zur Zerstörung HBV-infizierter Leberzellen und somit zur Leberschädigung (Rehermann und Nascimbeni, 2005). Diese These wird u.a. durch die Beobachtung gestützt, dass sogenannte asymptomatische HBV-Träger keine oder nur minimale pathologische Veränderungen der Leber aufweisen (Franchis, 1993).

An der Immunantwort gegen HBV sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt. Dem angeborenen Immunsystem wird insbesondere initial eine Rolle zugeschrieben und es ist wichtig für die Induktion der adaptiven Immunantwort (Bauer et al., 2011).

Freigesetzte HBV-Antigene, wie z.B. HBcAg (Arzberger et al., 2010), werden dabei über *Pattern-Recognition*-Rezeptoren, wie z.B. dem *toll-like-receptor 2* (TLR2), vom angeborenen Immunsystem erkannt (Cooper et al., 2005). Die Aktivierung von *Toll-like*-Rezeptoren, mit Ausnahme für den TLR2, führt über die Ausschüttung von antiviralen Zytokinen, wie z.B. Typ I Interferonen (IFN α /IFN β), zur Hemmung der HBV-Replikation (Isogawa et al., 2005). IFN- α führt dabei zur Induktion von APOPEC Deaminasen (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide*), die mittels des Core-Proteins in Kontakt mit der cccDNA treten und durch Deaminierung zur Degradierung der cccDNA führen (Lucifora et al., 2014). Für TLR2 hingegen konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine TLR2 Aktivierung in Kupfferzellen durch HBcAg zu einer Inhibition der T-Zell-

Antwort führt (Li et al., 2015). Auch die anderen Bestandteile der angeborenen Immunantwort, wie Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), tragen einerseits zur antiviralen Immunantwort bei, spielen andererseits aber auch eine Rolle bei der Suppression der erworbenen antiviralen Immunantwort und bei der Immunpathologie der chronischen Hepatitis B (Maini und Gehring, 2016).

Für den klinischen Verlauf, d.h. ob es nach HBV-Infektion zu einer akuten Hepatitis mit folgenloser Ausheilung kommt oder ob das Virus im Rahmen einer chronischen Hepatitis persistiert, ist die Stärke, Spezifität und der Beginn der adaptiven Immunantwort entscheidend (Rehermann und Nascimbeni, 2005; Bauer et al., 2011; Bertolotti und Ferrari, 2013). Eine sehr wichtige Rolle in der Elimination des HBV spielen dabei die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen. Thimme und Kollegen stellten in Tierversuchen an HBV-infizierten Schimpansen fest, dass die Depletion von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen, die TNF- α (Tumornekrosefaktor) positiv waren, den Krankheitsverlauf und das Plateau an hoher Viruslast verlängerte und eine Elimination des HBV sich bis zum Wiedererlangen virusspezifischer T-Zellen hinauszögerte (Thimme et al., 2003).

Zytotoxische T-Zellen führen durch ihre zellvermittelte Zytotoxizität zur Elimination HBV-infizierter Hepatozyten (Ando et al., 1994). Zudem sezernieren sie Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , die die Virusreplikation hemmen (Guidotti et al., 1996; Thimme et al., 2003). IFN- γ scheint dabei den größten antiviralen Effekt zu haben (McClary et al., 2000), indem es posttranskriptionell den Replikationszyklus hemmt (Tsui et al., 1995).

Mittels der Zytokine IFN- γ und TNF- α scheinen die T-Zellen bereits vor der Infiltration des Leberparenchyms die Virusreplikation nicht zytopathisch zu hemmen (Guidotti et al., 1996) und eliminieren anschließend die restlichen HBV-infizierten Hepatozyten im direkten Zell-Zell-Kontakt (Thimme et al., 2003; Wieland et al., 2004). IFN- γ und TNF- α induzieren die Deaminierung der cccDNA mittels APOBEC-Deaminasen, wodurch es zum Zerfall der cccDNA ohne Schädigung der Zelle kommt (Xia et al., 2016).

In Patienten mit einer akuten Hepatitis B findet sich dabei eine multispezifische $CD8^+$ T-Zell-Antwort gegen verschiedene Epitope der viralen Antigene HBcAg (Core-Protein), HBsAg (Surface-Protein, S-Protein), viralen Polymerase und dem HBx Protein (Rehermann et al., 1995a; Nayarsina et al., 1993; Bertolotti et al., 1991). Die $CD4^+$ T-Helferzellen sind wichtig für die Aktivierung und Stimulation der zytotoxischen T-Zellen mittels Kreuzpräsentation und für die Antikörperproduktion der B-Zellen. Es ist eine starke, vorwiegend HBcAg- bzw. HBeAg-spezifische T-Helfer-Zell-Antwort im Blut von Patienten mit akuter Hepatitis zu finden. Diese Core-spezifische T-Helfer-Zell-Antwort geht zeitlich mit dem Verschwinden von HBsAg einher. Eine T-Zell-Antwort gegen Teile der Hüllproteine ist dabei in den meisten Fällen nicht zu finden (Ferrari et al., 1990). Dies ist aber nicht auf eine generell schwache Immunogenität von HBsAg zurückzuführen. Denn sowohl in HBsAg Geimpften als auch in Personen mit einer akuten Hepatitis B ist im Vergleich zu chronisch Infizierten eine stärkere HBsAg-spezifische B- und T-Zell-Antwort vorzufinden (Böcher et al., 1999). Die HBcAg-spezifische $CD4^+$ T-Helfer-Zellen aus Patienten mit akuter Hepatitis produzieren im Sinne einer T_H1 -Antwort vorwiegend IFN- γ und tragen somit zur antiviralen Immunantwort aber auch zum Leberschaden bei (Penna et al., 1997). Trotz einer adäquaten Immunantwort im Rahmen einer akuten Hepatitis kann HBV-DNA in geringen Mengen noch Jahre persistieren und es können

aktivierte T-Zellen nachgewiesen werden (Rehermann et al., 1996). Damit es zu einer spontanen „funktionellen Ausheilung“ (Definition siehe Block et al., 2013) nach einer HBV-Infektion kommt, ist deshalb eine starke und multispezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zell-Antwort sowie eine adäquate Unterstützung dieser durch CD4⁺ T-Helferzellen erforderlich (Rehermann und Nascimbeni, 2005). Im Gegensatz dazu kommt es beim chronischen Verlauf der Hepatitis B zu einem Ausfall der antiviralen Immunabwehr. Die genauen Mechanismen, die zu einer chronischen HBV-Infektion führen, sind dabei noch nicht vollständig geklärt. Wichtige Faktoren scheinen aber die Beeinträchtigung der T-Zell-Antwort, das immuntolerante Milieu in der Leber und erfolgreiche Fluchtmechanismen des HBV vor der Immunabwehr zu sein (Protzer et al., 2012).

Insbesondere die qualitativen und quantitativen Veränderungen der CD8⁺ T-Zell-Antwort sind charakteristisch für die nicht funktionierende Immunabwehr in der chronischen Hepatitis B. Die Anzahl und die Funktionalität HBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen scheint sich dabei invers zur HBV-Replikation (Sobao et al., 2002; Webster et al., 2004; Boni et al., 2007) zu verhalten, so konnten bei einer Viruslast von 1×10^7 Kopien/ml HBcAg-spezifische T-Zellen nicht mehr detektiert werden (Webster et al., 2004). Bei niedrigerer Viruslast können hingegen mit moderneren Aufreinigungsverfahren durchaus HBV-spezifische T-Zellen in 80 % der Patienten detektiert werden, allerdings scheint die Frequenz und Effektorfunktion abhängig von der Epitopspezifität zu sein (Schuch et al., 2018).

Betrachtet man intrahepatische T-Zellen in chronisch HBV-Infizierten, scheinen diese unabhängig von ihrer Spezifität in ihrer IL-2 Produktion und Zellproliferation eingeschränkt zu sein. Sie produzieren aber weiterhin antivirale Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α (Das et al., 2008).

Bezüglich des Verlustes von HBV-spezifischen T-Zellen wurde festgestellt, dass bei HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen die Expression des proapoptotischen Proteins *Bcl2-interacting mediator* hochreguliert ist (Lopes et al., 2008). Die Apoptoseneigung könnte dabei durch den Ort der T-Zell-Aktivierung beeinflusst werden. Bowen und Kollegen stellten in einem Mausmodell fest, dass naive T-Zellen, die in der Leber ihren ersten Antigenkontakt hatten, in ihrer Effektorfunktion eingeschränkt sind und eine verkürzte Halbwertszeit besitzen (Bowen et al., 2004). Dies könnte auch im Zusammenhang mit der beobachteten Toleranz von CD8⁺ T-Zellen stehen, die sie erlangen, wenn ihnen exogenes Antigen über Sinusendothelzellen kreuzpräsentiert wird (Limmer et al., 2000).

Abgesehen von dem quantitativen Mangel an HBV-spezifischen T-Zellen, liegt auch eine qualitative Beeinträchtigung der noch vorhandenen HBV-spezifischen T-Zellen vor. Dieser Status von T-Zell-Dysfunktion wird unter dem englischen Fachbegriff *T cell exhaustion* zusammengefasst und wird bei vielen chronischen Infektionen und Tumorerkrankungen beobachtet. Der T-Zell-Dysfunktion liegt u.a. ein Überwiegen coinhibitorischer Signale zu Grunde, wie z.B. durch das *programmed cell death protein 1* (PD1) (Wherry, 2011). Auch bei Patienten mit CHB (chronischer Hepatitis B) ist PD1 in HBV-spezifischen T-Zellen vermehrt exprimiert und durch Blockade des PD1-Signalwegs kann die Effektorfunktion wieder hergestellt werden (Fisicaro et al., 2010).

Die Dysfunktion der T-Zellen in chronisch HBV-Infizierten ist dabei nicht nur auf ein Überwiegen inhibitorischer Signalwege zurückzuführen. Fisicaro und Kollegen konnten mit einer Transkriptomanalyse HBV-spezifischer T-Zellen aus chronisch HBV-Infizierten eine Herunterregulierung der Genexpression für verschiedene Zellprozesse im Vergleich zu T-Zellen aus akuten Infizierten bzw.

ausgeheilten Patienten feststellen. Insbesondere eine mitochondriale Dysfunktion beeinträchtigt die T-Zell-Funktion in chronisch HBV-Infizierten. Durch Gabe von Antioxidantien kann daher sowohl die mitochondriale Dysfunktion in den HBV-spezifischen T-Zellen sowie deren antivirale Effektorantwort verbessert werden und ermöglicht somit neue therapeutische Angriffspunkte (Fiscaro et al., 2017). Zudem liegt im Vergleich zu akut Infizierten in den CD8⁺ T-Zellen chronisch Infizierter eine Dysregulation des Transkriptionsfaktors T-bet vor, über den die Produktion von IFN- γ und anderen zytotoxischen Molekülen geregelt wird (Kurktschiev et al., 2014). Die Mechanismen, die zu diesem dysfunktionalen Zustand der T-Zellen bei der chronischen Hepatitis B führen, sind noch nicht gut verstanden. Möglicherweise hängt es mit dem *Priming* der T-Zellen zusammen, d.h. von welchem Zelltyp die T-Zellen das Antigen präsentiert bekommen haben. Bénéchet et al., 2019 konnten in einem Mausmodell zeigen, dass, wenn das *Priming* von HBV-spezifischen T-Zellen durch Kupffer-Zellen erfolgt, die T-Zellen zu Effektorzellen differenzierten. Erfolgte hingegen das *Priming* der T-Zellen durch Hepatozyten, konnte zwar eine Proliferation aber keine Differenzierung der T-Zellen hin zu Effektorzellen nachgewiesen werden.

Ein weiterer Grund für die schwache Immunantwort bei der chronischen Hepatitis B scheint auch das Fehlen einer adäquaten HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Antwort zu sein. So führte eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen vor Inokulation mit HBV zu einer chronischen Infektion in Schimpansen (Asabe et al., 2009). Die Rolle von regulatorischen T-Zellen wird kontrovers diskutiert bezüglich ihrer erhöhten Häufigkeit in chronisch HBV-infizierten Patienten und ihrem Bezug zum Virus-Titer. Allerdings führt die Entfernung *in vitro* zu einer besseren T-Zell-Proliferation (Stoop et al., 2005). Der Beitrag der humoralen Immunantwort zur Kontrolle der chronischen HBV-Infektion ist nicht geklärt. Die gegen HBsAg gerichteten Antikörper sind erst nach Ausheilung der HBV-Infektion detektierbar. Sie können auch durch eine Impfung induziert werden (siehe Kapitel 1.1.4) und verleihen dem Patienten in beiden Fällen eine protektive Immunität.

Das lokale Milieu in der Leber scheint die Immunantwort gegen HBV durch immunregulatorische Zytokine wie IL-10 und Entzug von Aminosäuren zu supprimieren (Protzer et al., 2012; Dunn et al., 2009; Peppas et al., 2010). Auch das HBV selbst beeinflusst die Immunantwort gegen sich selbst. Studien in der Maus zeigten, dass das HBV direkt durch sein virales Antigen HBeAg den T-Zell-Phänotyp moduliert (Milich et al., 1997) und eine HBeAg vermittelte T-Zell-Toleranz induzieren kann (Chen et al., 2004).

Wie man in dem vorangehenden Kapitel erkennen kann, spielen viele Faktoren bei der Entwicklung einer chronischen Hepatitis B eine Rolle. Die quantitativ wie auch qualitativ eingeschränkte T-Zell-Antwort scheint aber entscheidend für den Infektionsverlauf und die Immunpathologie der CHB zu sein.

1.1.4 Prophylaxe und Therapie der HBV-Infektion

Eine prophylaktische aktive Immunisierung ist seit 1983 möglich. Der erste Hepatitis-B-Impfstoff bestand aus hoch gereinigten, nicht infektiösen 22 nm HBsAg-Partikeln, die aus HBsAg⁺-Trägern isoliert wurden. Dieser wurde 5 Jahre später durch einen rekombinanten Impfstoff mit HBsAg aus Hefezellen ersetzt.

Zunächst war die Hepatitis-B-Impfung nur für Personen mit einem erhöhten Expositionsrisiko empfohlen worden, wie z.B. Angestellte im Gesundheitswesen oder Pflegeeinrichtungen, Personen mit intravenösem Drogenabusus oder häufig wechselnden Geschlechtspartnern sowie Patienten, die Hämodialyse oder häufige Bluttransfusionen erhielten. Da in Ländern mit bereits geringer HBV-Prävalenz mit diesen Impfrichtlinien keine Senkung der HBV-Inzidenz erreicht wurde, ist die aktuelle Empfehlung jedes Kleinkind ab dem 3. Lebensmonat gegen HBV zu impfen. Eine kleine Gruppe der Geimpften zeigt keine ausreichende Immunantwort und hat somit keine präventive Antikörperbildung gegen Hepatitis B, weswegen die Bestimmung des Anti-HBs-Titers zur Überprüfung des Impfschutzes empfohlen wird. Zur Postexpositionsprophylaxe bei ungeimpften Personen, z.B. bei perinataler Exposition, kann gleichzeitig eine passive Impfung mit Hepatitis-B-Immunglobulinen und die aktive Impfung erfolgen (Dienstag und Schmidt, 2009; Modrow et al., 2010).

Eine medikamentöse Therapie ist bei jedem Patienten mit einer CHB zu erwägen, bei einer akuten Hepatitis B normalerweise nur bei drohendem akutem oder subakutem Leberversagen (Cornberg et al., 2011; Lampertico et al., 2017). Weltweit gesehen ist man von diesen Empfehlungen weit entfernt. Im Jahr 2016 wussten weltweit schätzungsweise nur 10,5 % aller HBV-Infizierten von ihrer Erkrankung, wovon wieder nur 16,7 % eine Therapie erhielten (*WHO - Fact sheets: Hepatitis B* 2019).

Das Haupttherapieziel bei chronisch HBV-Infizierten ist die Lebensdauer und die Lebensqualität des Patienten zu verbessern, indem durch die Therapie das Risiko für einen weiteren Krankheitsprogress und die konsekutive Erkrankung an einem hepatozellulären Karzinom gesenkt wird. Hierzu wird der optimale Behandlungsendpunkt einer „funktionellen Heilung“ angestrebt, welcher als fehlender HBsAg Nachweis mit oder ohne Nachweis von Anti-HBsAg definiert ist und eine starke Suppression der HBV-Replikation und Expression viraler Proteine bedeutet (Lampertico et al., 2017). Eine „funktionelle Heilung“ unter antiviraler Therapie führt zu einem deutlich reduzierten Risiko für Krankheitsprogress und Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (Lauret et al., 2015). Zu einer spontanen Anti-HBs Serokonversion kommt es in ca. 0,2–1 % der chronisch infizierten Patienten pro Jahr (McMahon, 2009).

Eine Therapie ist indiziert bei Patienten mit einer Virämie größer 2000 IU/ml und erhöhten Leberwerten, insbesondere wenn eine deutliche oder fortschreitende Leberzirrhose vorliegt (Cornberg et al., 2011), da hier das Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms erhöht ist. Bei unklaren Fällen, wenn z.B. die Viruslast über dem Grenzwert von 2000 IU/ml liegt, aber die Transaminasen auch in mehrfachen Kontrollen nicht erhöht sind, ist eine Leberbiopsie anzustreben und bei Nachweis einer relevanten Fibrose eine Therapie indiziert. Nicht behandelt werden müssen inaktive HBsAg-Träger (mit anhaltend niedriger Viruslast kleiner 2000 IU/ml und anhaltend normalen Transaminasen)(Cornberg et al., 2011). Die weitere Unterscheidung von chronisch HBV-Infizierten in HBeAg positiv und negativ ist sinnvoll, da bei HBeAg⁺ Patienten im Verlauf das Risiko ein

hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln deutlich erhöht ist (Yang et al., 2002). Patienten mit einer chronischen Hepatitis B Infektion können dabei entweder eine Interferontherapie mit (pegyliertem) IFN- α oder eine Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga wie Lamivudin, Entecavir, Telbivudin bzw. Tenofovir alafenamid, Tenofovir disoproxil fumarat oder Adefovir erhalten (Lampertico et al., 2017).

Mit der Interferontherapie erhofft man eine andauernde Immunkontrolle der Virusinfektion durch Stimulation der antiviralen Immunantwort zu erreichen (Seeger und Mason, 2015). So kommt es in 30 % der Fälle zur Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe, Senkung der Viruslast und Rückgang der Lebertransaminasen, wobei initial stark erhöhte Lebertransaminasewerte bei gleichzeitig niedriger viraler DNA im Serum dies begünstigen (Hoofnagle, 1990; Janssen et al., 2005). In bis zu 7 % kann sogar ein Verschwinden von HBsAg bzw. eine Serokonversion zu anti-HBs erreicht werden (Janssen et al., 2005; Trépo et al., 2014). Die Serokonversion hält dabei auch nach Beenden der Therapie in den meisten Patienten an (Buster et al., 2008). Bei Patienten, die mit dem Genotyp A infiziert waren, sprachen 40 % der Patienten im Vergleich zu 28 % für Genotyp B und 25 % für Genotyp C auf die Interferontherapie an, sodass der Therapieerfolg auch vom vorliegenden Genotyp abhängt (Janssen et al., 2005). Nachteile der Interferontherapie sind die subkutane Applikationsform und die unangenehmen Nebenwirkungen mit grippeähnlichen Beschwerden, wie Myalgien und Fieber, sowie das Auftreten von Thrombozytopenien und Depressionen, die dazu führen, dass viele Patienten die Therapie abbrechen. Außerdem ist die Interferontherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Leberversagen kontraindiziert, da durch die Therapie ein akutes Leberversagen ausgelöst werden kann (Ganem und Prince, 2004).

Die Nukleosid- und Nukleotidanaloga unterbrechen die virale DNA-Synthese, indem sie die Reverse Transkription der prägenomischen RNA in DNA inhibieren. Auf die bereits vorliegende cccDNA in den infizierten Zellen haben die Virostatika keinen direkten Effekt und somit kann das Virus von der persistierenden cccDNA als Transkriptvorlage sich immer wieder replizieren (Dandri et al., 2000; Moraleda et al., 1997). Daraus folgt ein Nachteil der antiviralen Therapie mit Nukleos(t)idanaloga, nämlich dass eine lebenslange Therapie erforderlich ist, da keine Immunkontrolle des Virus bzw. komplette Elimination erreicht wird. Daher ist die Therapie kostenintensiv und erfordert eine gute Compliance von Seiten des Patienten (Seeger und Mason, 2015). Der Vorteil von Virostatika ist die bessere Verträglichkeit (orale Einnahme und besseres Nebenwirkungsprofil) im Vergleich zu Interferon- α und auch die Möglichkeit Patienten mit schwerem Leberschaden einer antiviralen Therapie zuzuführen (Ganem und Prince, 2004). Problematisch ist wiederum die Entstehung von Resistenzmutationen unter Monotherapie mit den älteren Basenanaloga wie Lamivudin. Nach einem Jahr Monotherapie mit Lamivudin war in 15 % der Patienten die Resistenzmutation YMDD im aktiven Zentrum der Polymerase nachzuweisen und nach zwei Jahren bereits in 38 % (Liaw et al., 2000). Diese Virusmutanten können wieder ungehindert replizieren und führen zu erneuten Entzündungsherden und zum zirrhotischen Umbau der Leber. Für die neuen Medikamente wie Entecavir und Tenofovir disoproxil fumarat sind Resistenzmutationen auch nach 5 Jahren Therapie nur selten (Tenney et al., 2009) bzw. gar nicht beschrieben. Das neueste zugelassene Medikament Tenofovir alafenamid scheint nach der aktuellen Datenlage bei der Behandlung therapie-naiver Patienten das wirksamste Virostatikum zu sein und wird daher zusammen mit Tenofovir disoproxil

fumarat und Entecavir als Erstlinientherapie für die chronische Hepatitis B empfohlen (Wong et al., 2019). Trotz der verschiedensten Präparate an Virostatika und der Kombinationsmöglichkeit ist die Wahrscheinlichkeit die Endpunkte HBeAg-Serokonversion oder die anhaltende Elimination von HBsAg zu erreichen niedrig (Wong et al., 2019). So kommt es nach einem Jahr Therapie mit Nukleotid- bzw. Nukleosidanaloga nur bei 0–3 % der Patienten zu einem HBsAg Verlust, nach 5–10 Jahren Therapie erhöht sich dies nur geringfügig auf 0–10 % der Patienten (Trépo et al., 2014).

Die Problematik der aktuell zur Verfügung stehenden Medikamente ist, dass in den meisten Fällen nur eine Reduktion der Viruslast und keine vollständige Elimination des Virus erreicht wird und dadurch auch das Risiko der Folgeerkrankung mit Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom auch unter den aktuellen Therapien nicht vollständig eliminiert werden kann (Ko et al., 2017). Denn selbst ein fehlender HBsAg-Nachweis spricht nicht für eine vollständige Elimination des HBV und somit Erreichen einer vollständigen Heilung. So kann 5 Jahre nach Erreichen eines fehlenden HBsAg-Nachweises in 21 % der Patienten immer noch HBV-DNA im Serum und bei einem noch größeren Anteil HBV-DNA in der Leber nachgewiesen werden (McMahon, 2009). Zudem besteht auch Jahre nach HBsAg-Verlust weiterhin ein erhöhtes Risiko ein HCC zu entwickeln (Ahn et al., 2005). Die Entwicklung von Therapien, die eine vollständige Elimination des HBV anstreben, wären deshalb erstrebenswert. Dies wird mit hoher Wahrscheinlichkeit nur erreicht, wenn es gelingt die cccDNA als Replikationsvorlage des Hepatitis B Virus vollständig zu eliminieren.

1.2 T-Zellen

T-Zellen bilden zusammen mit den B-Zellen das adaptive Immunsystem und sind für die antigenspezifische, zellvermittelte Immunantwort verantwortlich. Mit Hilfe eines Antigenrezeptors, dem T-Zell-Rezeptor, erkennen T-Zellen spezifisch virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen. Der T-Zell-Rezeptor erkennt Peptidfragmente von viralen Proteinen oder Onkogenen, die an der Zelloberfläche über die sogenannten MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) präsentiert werden. Es gibt dabei zwei Klassen von MHC-Molekülen – MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur und den Expressionsleveln in den einzelnen Geweben. Beim Menschen werden die MHC-Moleküle nach dem Humanen Leukozytenantigenensystem eingeteilt (*human leukocyte antigen*, HLA).

T-Zellen reifen im Thymus aus Abkömmlingen der lymphatischen Progenitorzellen des Knochenmarks heran. Hier wird durch Kontakt mit dem Thymusgewebe eine Neuordnung bestimmter Gensegmente induziert, die dann als Transkriptionsvorlage für den T-Zell-Rezeptor dienen (siehe Kapitel 1.2.2). Es erfolgt zunächst eine positive Selektion, in der nur die wenigen T-Zellen zur weiteren Proliferation angeregt werden, die an die körpereigenen MHC I und MHC II Moleküle binden. Anschließend erfolgt die negative Selektion in der alle T-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, durch Apoptose eliminiert werden. Im Verlauf des Reifungsprozesses exprimieren die T-Zellen zusätzlich zum T-Zell-Rezeptor die Korezeptoren CD4 und CD8, anhand derer die T-Zellen in CD4⁺ T-Helferzellen und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen eingeteilt werden. Die CD4⁺ T-Helferzellen sezernieren, nach spezifischer Aktivierung, unterschiedliche Zytokine, wodurch sie auf verschiedene Weise die angeborene als auch erworbene Immunantwort modulieren bzw. unterstützen. Die Hauptaufgabe von T-Zellen ist das gezielte Erkennen und Töten von virusinfizierten oder maligne

entarteten Zellen. (Kapitel wurde zusammengefasst aus Murphy et al., 2009)

1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor

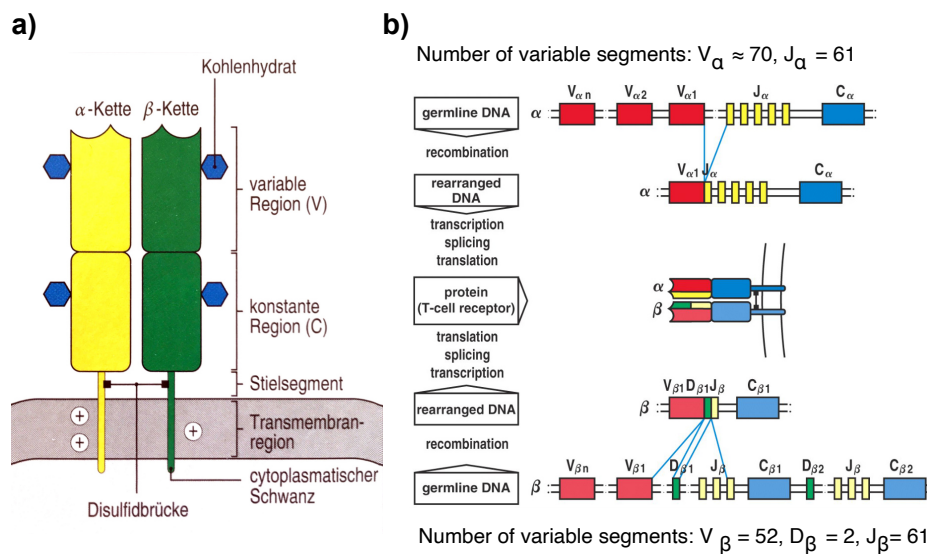


Abb. 1.2.1: Struktur des T-Zell-Rezeptors und Variabilität des T-Zell-Rezeptor-Repertoires. a) Der T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei Polypeptidketten der TZR- α -Kette und der TZR- β -Kette. Die für die Antigenerkennung zuständigen variablen Regionen sind am aminoterminalen Ende der TZR-Ketten zu finden. An diese schließt sich jeweils die konstante Region an, gefolgt von einer Stielregion, in der sich die Cystein-Reste für die Disulfidbrücke befinden. Über eine hydrophobe Transmembrandomäne sind die TZR-Ketten in der Zellmembran verankert, wobei ein kurzer Teil der Ketten in das Zytoplasma ragt (Murphy et al., 2009). b) Die TZR-Ketten werden im Rahmen der somatischen Rekombination aus Gensegmenten zusammengesetzt. Die variable Region der β -TZR-Kette setzt sich dabei aus je einem V-, D- und J-Segment zusammen, die variable Region der α -TZR-Kette aus je einem V- und D-Segment. An den Verknüpfungsstellen der Segmente können zusätzlich Nukleotide eingefügt oder entfernt werden (modifiziert nach Murphy et al., 2005).

Der T-Zell-Rezeptor setzt sich aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten zusammen, der sogenannten T-Zell-Rezeptor- α -Kette und der T-Zell-Rezeptor- β -Kette (s. Abb. 1.2.1 a). Ähnlich wie Antikörper bestehen die TZR-Ketten am aminoterminalen Ende aus einer variablen Region, an die sich eine konstante Region anschließt, der eine kurze Stielregion folgt, in der sich die Cystein-Reste für die Disulfidbrücke befinden. Die Ketten sind über eine hydrophobe Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert und ragen mit einem kurzen Abschnitt in das Zytoplasma der T-Zelle. (Murphy et al., 2009)

Für eine funktionierende T-Zell-Antwort wird ein breites T-Zell-Repertoire benötigt, welches eine Vielfalt an unterschiedlichen Antigenen erkennen kann. Dies wird durch hochvariable Aminosäuresequenzen (AS) im Bereich der Antigenbindungsstellen erreicht. Die hohe Variabilität in der AS-Sequenz der variablen Regionen wird durch Umlagerung und Zusammenbau von Gensegmenten im Sinne eines Baukastensystems erreicht. Dieser Vorgang ist auch bei der Generierung von Immunglobulinen vorzufinden und wird als somatische Rekombination bezeichnet. So setzt sich die variable Region der β -TZR-Kette aus je einem V(*variable*)-, D(*diversity*)- und J(*joining*)-Segment zusammen und die variable Region der α -Kette aus je einem V- und J-Segment (s. Abb. 1.2.1 b). Durch die Kombination unterschiedlicher Gensegmente kann ein breites Spektrum an verschiedenen variablen Regionen

erzeugt werden, man spricht hier von der kombinatorischen Vielfalt. Zusätzlich werden während der Rekombination an den Verknüpfungsstellen der Gensegmente Nukleotide zufällig eingefügt oder entfernt und somit die Vielfalt an variablen Regionen weiter erhöht. Dies wird unter dem Begriff junktionale Diversität zusammengefasst. (Murphy et al., 2009)

In der variablen Region beider Ketten liegen drei unterschiedliche Regionen (*complementarity determining region*, CDR), die Schleifen bilden und entscheidend an der Bindung an den Peptid:MHC-Komplex beteiligt sind. Die weniger variablen CDR1- bzw. CDR2-Schleifen interagieren dabei vorwiegend mit Anteilen des präsentierenden MHC-Moleküls. Die hochvariable CDR3-Region liegt im Zentrum der Antigenbindungsstelle und interagiert hauptsächlich mit dem Peptid. Die CDR3-Region der TZR-Ketten ist dabei in der hypervariablen Region vorzufinden, die aus Teilen des V-Segments sowie dem D- und/oder J-Segment besteht. (Kapitel ist eine Zusammenfassung aus Murphy et al., 2009)

1.2.2 TZR:Peptid:MHC-Interaktion

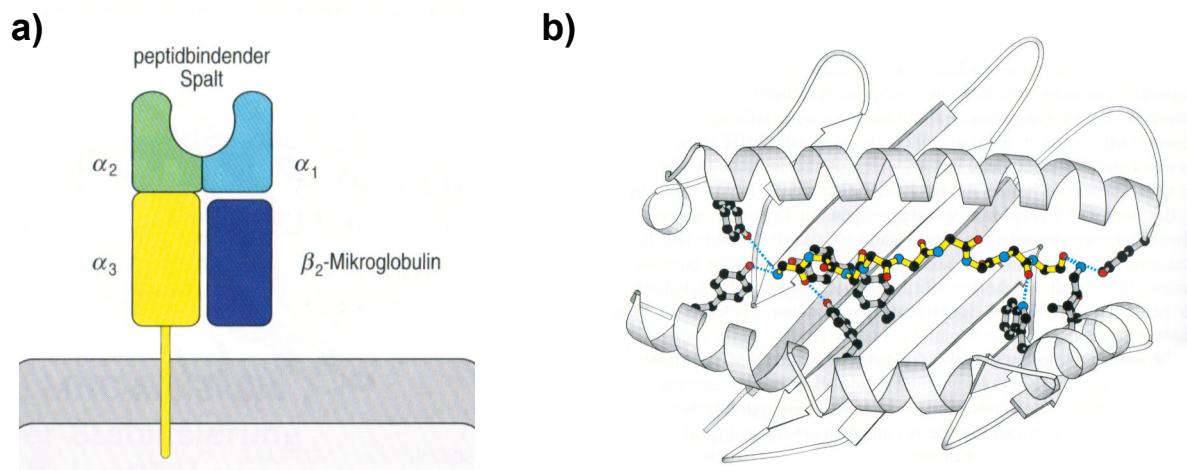


Abb. 1.2.2: Aufbau des MHC-Klasse-I-Moleküls. a) Schematische Darstellung eines MHC-Klasse-I-Moleküls. Das Heterodimer besteht aus einer α -Kette, welche in die drei Domänen α_1 , α_2 und α_3 unterteilt wird, an die als 4. Domäne eine nichtkovalente kleinere Kette, das β_2 -Mikroglobulin, angelagert ist. Die α_3 -Domäne und das β_2 -Mikroglobulin haben eine gefaltete Struktur, die der Immunglobulindomäne stark ähnelt. Die α_1 - und α_2 -Domäne bilden die Wände des peptidbindenden Spalts, in der das zu bindende Peptid gebunden wird. b) Im peptidbindenden Spalt liegt das Peptid längs zur Furche, sodass das MHC-Molekül durch Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen mit den Enden des Peptides interagiert. Die Aminosäurereste, über die das MHC-Molekül mit den Peptiden eine Verbindung eingeht, sind in allen MHC-Molekülen gleich. Am Aminoende (in Abb. links) wird das Peptid über Wasserstoffbrücken durch Tyrosinreste des MHC-Moleküls gebunden. Am Carboxylende (in Abb. rechts) entstehen Bindungen durch eine zweite Gruppe von Aminosäureresten die Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen mit dem Rückgrat am Carboxylende und mit dem Carboxyrest selbst eingehen. (Grafik a) und b) modifiziert nach Murphy et al., 2009)

T-Zell-Rezeptoren erkennen ihre Antigene in Form von Peptidfragmenten, wenn diese ihnen an MHC-Moleküle gebunden präsentiert werden. Die T-Zell-Rezeptoren der $CD8^+$ T-Zellen binden unter Mitbeteiligung des $CD8$ -Korezeptors konventionell nur an MHC-Moleküle der Klasse I.

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer größeren α -Kette, welche in drei Domänen eingeteilt wird (α_1 bis α_3) und über eine Transmembrandomäne in der Zellwand verankert ist, sowie einer kleineren nichtkovalent angelagerten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (s. Abb. 1.2.2 a). Die von MHC-Molekülen

der Klasse I gebundenen Peptide sind normalerweise 8 bis 10 Aminosäuren lang. Die Peptide binden in einer Furche an der Oberfläche des MHC-I-Moleküls, dem peptidbindenden Spalt, dessen Wände von den Domänen α_1 und α_2 gebildet werden. (Murphy et al., 2009)

Die Bindung eines Peptids wird an beiden Enden durch Wechselwirkungen zwischen Atomen der endständigen Amino- bzw. Carboxylgruppen des Peptids mit AS-Resten des MHC-Moleküls stabilisiert (s. Abb. 1.2.2 b). Letztere sind an jedem Ende der Spalte aller MHC-Klasse-I-Moleküle zu finden und scheinen durch ihren Kontakt mit den Peptidenden wesentlich zur Stabilisierung des Peptid:MHC-Klasse-I-Komplexes beizutragen. Abgesehen von diesen Stellen sind MHC-Moleküle äußerst polymorph. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen allelischen MHC-Varianten vor allem an gewissen Stellen im peptidbindenden Spalt, sodass in verschiedenen MHC-Varianten an gewissen Schlüsselpositionen unterschiedliche Aminosäuren vorliegen und somit unterschiedliche Peptide von den MHC-Varianten bevorzugt gebunden werden. Die Peptide, die wiederum von einer MHC-Variante bevorzugt gebunden werden, haben innerhalb der Peptidsequenz an 2-3 definierten Stellen dieselben oder sehr ähnliche AS-Reste. Über diese sogenannten Verankerungsreste binden die Peptide ans MHC-Molekül. (Murphy et al., 2009)

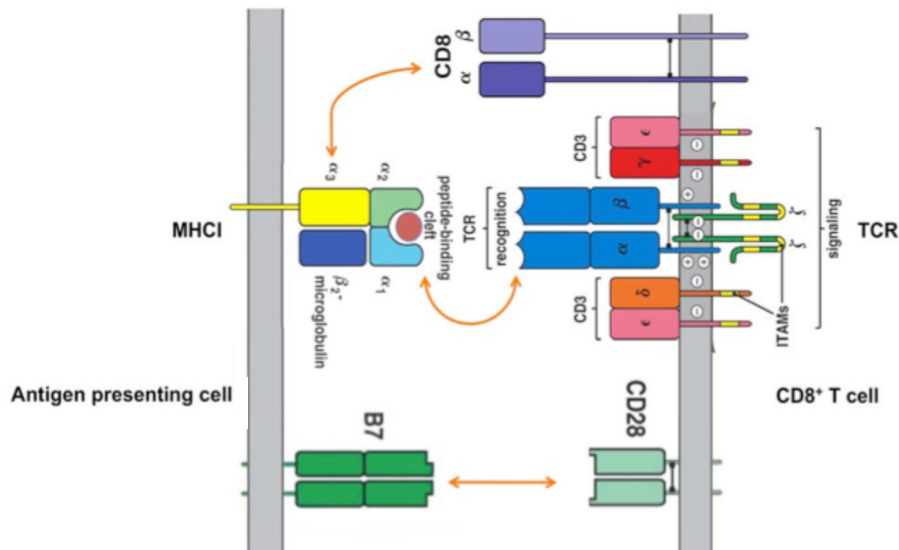


Abb. 1.2.3: T-Zell-Aktivierung über den TZR:Peptid:MHC-Komplex. Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung. Das TZR-Heterodimer aus α - und β -Kette bildet mit dem CD3-Komplex, bestehend aus den Proteinketten CD3 δ , 2x CD3 ϵ und CD3 γ , und der ζ -Kette, die als Homodimer mit Disulfidbrücke vorliegt, den T-Zell-Rezeptor-Komplex, der das TZR-Heterodimer stabilisiert und die Signaltransduktion bei Aktivierung ermöglicht. Wenn der TZR spezifisch zusammen mit dem CD8-Korezeptor an den Peptid-MHC-I-Komplex bindet, wird die Signaltransduktion durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten an zyttoplasmatischen Regionen der CD3-Ketten und der ζ -Kette initiiert, die sogenannten ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Zur Aktivierung der T-Zelle ist eine Ko-Stimulation über B7 und CD28 elementar (modifiziert nach Murphy et al., 2005).

Das auf dem MHC präsentierte Peptid kann durch das Antigen-bindende TZR-Heterodimer, bestehend aus α - und β -TZR-Kette erkannt werden. Das TZR-Heterodimer geht, damit es auf der Zelloberfläche stabil exprimiert wird und eine Signaltransduktion zur Aktivierung der T-Zelle möglich ist, einen Komplex mit 6 Signalketten ein (s. Abb. 1.2.3). Dieser Komplex wird als T-Zell-Rezeptor-Komplex bezeichnet und besteht aus zwei CD3 ϵ -Ketten, einer CD3 δ -Kette, und einer CD3 γ -Kette, die zusammen den sogenannten CD3-Komplex bilden, und der ζ -Kette, die als Homo-

dimer mit Disulfidbrücke vorliegt. Wenn der TZR spezifisch an den Peptid-MHC-Komplex bindet, wird die Signaltransduktion durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten an zytoplasmatischen Regionen der CD3-Ketten und der ζ -Kette initiiert und die T-Zelle aktiviert, wenn zudem auch eine Ko-Stimulation über B7 oder CD28 erfolgt. (Murphy et al., 2009)

Der TZR tritt bei der Antigenerkennung sowohl mit dem Peptid als auch mit dem präsentierenden MHC-Komplex in Interaktion. Für eine spezifische Antigenerkennung mit stabiler Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid:MHC-Komplex muss deshalb der T-Zell-Rezeptor nicht nur spezifisch das Peptid binden, sondern auch das MHC-Molekül. Dieses Phänomen, dass T-Zell-Rezeptoren ihr Antigen nur erkennen, wenn es auch auf dem passenden MHC-Molekül präsentiert wird, nennt man MHC- bzw. HLA-Restriktion. (Murphy et al., 2009)

Zusätzlich zur Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid-MHC-Komplex ist für eine effiziente T-Zell-Antwort die Stabilisierung des TZR:Peptid:MHC-Komplexes durch sogenannte Korezeptoren nötig. Bei T-Helferzellen unterstützt der CD4-Korezeptor die Bindung an MHC-II-Moleküle. Bei zytotoxischen Zellen verstärkt der CD8-Korezeptor die Bindung an MHC-I-Moleküle. Dadurch wird in beiden Fällen die Empfindlichkeit der T-Zelle gegenüber ihrem Antigen um das Hundertfache erhöht. (Kapitel ist eine Zusammenfassung aus Murphy et al., 2009)

1.2.3 Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen

Nach der Aktivierung der T-Zelle über eine spezifische TZR:Peptid:MHC Interaktion geht die zytotoxische CD8⁺ T-Zelle ihrer namensgebenden Eigenschaft nach, nämlich die Zielzelle, welche das Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentiert, zu töten. Dies kann durch das Freisetzen der in den zytotoxischen Granula gespeicherten zytotoxischen Proteine Perforin, Granzyme und Granulysin erfolgen. Perforin scheint dabei ausschlaggebend an der Freisetzung der Granzyme in das Zytoplasma der Zielzelle beteiligt zu sein. Granzyme sind Serinproteasen, die über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose der Zielzelle einleiten. Des Weiteren exprimieren CD8⁺ T-Zellen den Fas-Ligand. Darüber kann in Zellen, die den Fas-Rezeptor exprimieren, ebenfalls der programmierte Zelltod eingeleitet werden. Dieser Mechanismus scheint jedoch eher bei der Regulation der zellvermittelten Immunantwort als beim Abtöten von infizierten Zielzellen eine Rolle zu spielen. (Murphy et al., 2009)

Abgesehen von diesen direkt zytotoxischen Proteinen produzieren und sezernieren aktivierte T-Zellen auch Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und Lymphotoxin (LT), die wichtige Botenstoffe in der Zytokinantwort sind. Das Zytokin IFN- γ kann dabei direkt die virale Replikation hemmen, aktiviert Makrophagen und führt zu einer vermehrten Expression von MHC-I Molekülen und Proteinen, die der Peptidprozessierung und MHC-Beladung dienen. Letzteres ermöglicht ein besseres Erkennen von infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen. TNF- α und LT haben, wie IFN- γ , eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen und können zudem über die Bindung an den TNF-Rezeptor die Apoptose einer Zelle einleiten. (Murphy et al., 2009)

Will man T-Zellen hinsichtlich ihrer Effektorfunktion beurteilen, gibt es zwei wesentliche Parameter, nämlich die Polyfunktionalität und die funktionelle Avidität von T-Zellen. Diese zwei Parameter sind ausschlaggebend für eine effektive T-Zell-Antwort gegen Viren oder Krebszellen. Unter Polyfunktionalität versteht man, dass die spezifisch stimulierte T-Zelle verschiedene für ihre Effektorfunktion wichtige Proteine produziert und sezerniert, wie z.B. die Zytokine IFN- γ , TNF- α und Interleukin-2

oder Serinproteasen wie Granzym B. In Individuen, in denen es zu einer Kontrolle der Virusinfektion kommt, sind polyfunktionelle Zellen in hoher Anzahl anzutreffen (Harari et al., 2006).

Die funktionelle Avidität beschreibt, wie gut eine T-Zelle *in vitro* auf eine gewisse Konzentration des spezifischen Peptids reagiert. Hoch avide T-Zellen reagieren bereits bei geringen Antigenkonzentrationen. Niedrig avide T-Zellen benötigen hingegen eine weitaus höhere Antigenkonzentration, damit eine ähnlich starke Effektorantwort wie in den hoch aviden T-Zellen hervorgerufen wird (Viganò et al., 2012). Durch Bestimmung der T-Zellfunktionen wie IFN- γ -Produktion, Zytotoxizität oder Proliferation in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration kann die funktionelle Avidität experimentell ermittelt werden. Folgende Faktoren beeinflussen dabei die funktionelle Avidität: die Bindungsstärke des T-Zell-Rezeptors zum MHC-Molekül (der sogenannten Affinität), das Expressionslevel des TZR und der Korezeptoren und die vorliegende Verteilung und Anordnung von intrazellulären Signalmolekülen (Viganò et al., 2012).

1.3 Adoptive T-Zell-Therapie

Die adoptive T-Zell-Therapie ist eine zellbasierte Immuntherapie. Beim adoptiven T-Zell-Transfer erhalten Patienten, die an einer Tumor- oder Viruserkrankung leiden, T-Zellen, die zuvor *ex vivo* expandiert und eventuell modifiziert wurden (Restifo et al., 2012).

Die Idee der adoptiven T-Zell-Therapie entstand im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT). Denn mit der Entdeckung der antileukämischen Wirkung der Spender-Gegen-Wirt-Reaktion (auch bekannt als *Graft-versus-Host-Erkrankung*) entwickelte sich die Idee durch adoptiven T-Zell-Transfer einen antileukämischen Effekt zu erzielen, um z.B. ein Leukämie-Rezidiv durch Infusion von peripheren Spender-Lymphozyten zu behandeln (Porter et al., 1994). Ebenso entwickelte sich die Idee in den nach Stammzelltransplantation stark immunsupprimierten Patienten die virus-spezifische T-Zell-Immunität durch Infusion von peripheren Lymphozyten aus Spendern wieder herzustellen und damit das Risiko schwerwiegender viraler Infektionen (z.B. durch das Cytomegalievirus (CMV) zu senken (Walter et al., 1995).

Seitdem konnte in verschiedenen klinischen Studien die Wirksamkeit der adoptiven T-Zell-Therapie sowohl für hämatoonkologische Erkrankungen (Maude et al., 2018) als auch für solide Tumoren, wie z.B. für das metastasierte Melanom (Rosenberg et al., 2011) oder für Sarkome (Robbins et al., 2011), gezeigt werden. Auch in der Behandlung von chronischen Viruserkrankungen wie zum Beispiel mit dem HIV konnte gezeigt werden, dass die adoptive T-Zell-Therapie im klinischen Setting durchführbar und sicher ist, wenn auch noch ohne durchschlagenden Erfolg hinsichtlich einer vollständigen Elimination des HIV-Reservoirs (Deeks et al., 2002).

Durch die hohe Spezifität und dem Versprechen einer potentiell langanhaltenden Immunprotektion stellt die adoptive T-Zell-Therapie eine interessante, zukunftsorientierte Therapiemöglichkeit für virale und maligne Erkrankungen dar, die auch gut mit konservativen Therapien kombiniert werden kann (Yee, 2014). Aber auch für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen durch Transfer modifizierter regulatorischer T-Zellen scheint sie Potenzial zu haben (Wright et al., 2009).

Während beim Melanom sogenannte Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) aus dem immunsuppressiven Tumormilieu isoliert werden können und nach *ex vivo* Expansion im Sinne der adoptiven T-Zell-Therapie wieder zugeführt werden und zur Tumorregression führen (Rosenberg et al., 2011),

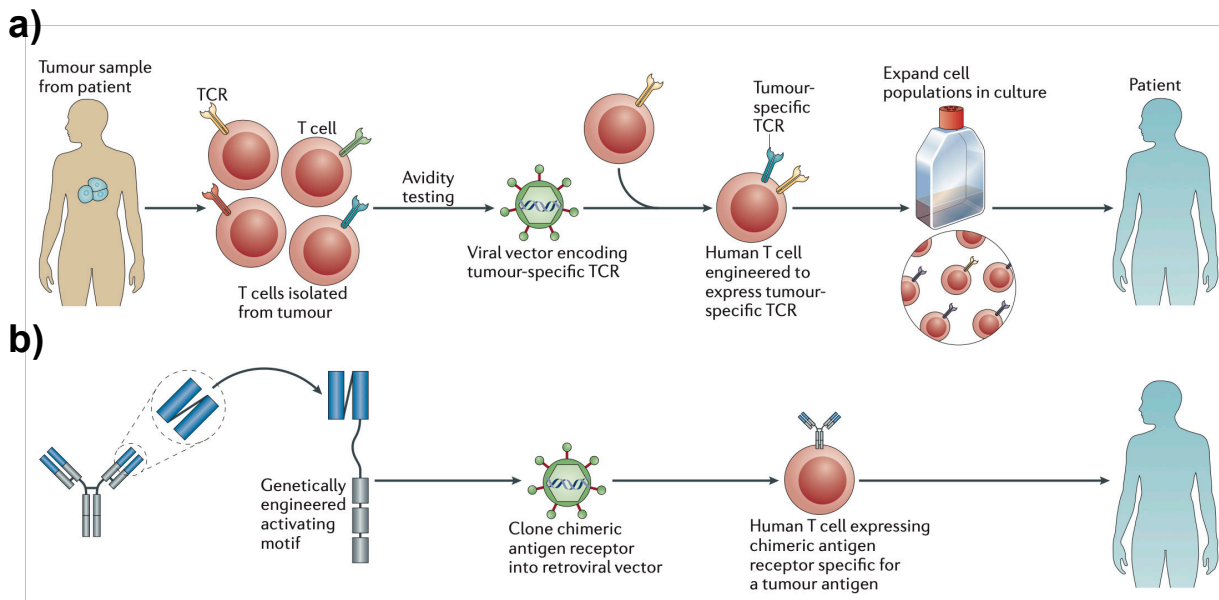


Abb. 1.3.1: Gentechnische Modifizierung von T-Zellen in der adoptiven T-Zell-Therapie. a) Aus Patienten mit einer guten T-Zell-Antwort gegen ein Malignom oder ein Virus, werden Antigen-spezifische T-Zellen isoliert. Deren natürlicher endogener TZR wird bestimmt und in einen viralen Vektor kloniert, um diesen dann in autologe Lymphozyten des Empfängers gentechnisch einzubringen und ihnen somit die entsprechende neue Spezifität zu verleihen. b) Chimäre Antigen-Rezeptoren bestehen, als Einzelkette konstruiert, aus der variablen Domäne eines Antikörpers, einem Abstandhalter und einer Signaldomäne, über die es zur Aktivierung der T-Zelle kommt. Das chimäre Proteinkonstrukt kann dann ebenfalls per viralem Vektor in die Empfänger-Lymphozyten eingebracht werden und ermöglicht eine MHC-I unabhängige Antigenerkennung (modifiziert nach Restifo et al., 2012)

sind für die meisten anderen Tumorentitäten und chronischen viralen Erkrankungen kaum spezifische T-Zellen im Tumorgewebe oder im peripheren Blutkreislauf zu finden (Restifo et al., 2012). Um trotzdem eine ausreichende Anzahl spezifischer T-Zellen zu erhalten, gibt es mehrere Möglichkeiten, T-Zellen gentechnisch eine neue Spezifität zu verleihen (s. Abb 1.3). So kann ein spezifischer TZR, der z.B. aus Patienten mit einer adäquaten T-Zell-Antwort isoliert wurde, mittels lenti- oder retroviraler Vektoren in T-Zellen des Empfängers eingebracht werden und diesen die entsprechende HLA-restringierte Antigenspezifität verleihen (Morgan et al., 2006). Eine andere Möglichkeit ist das Einbringen eines chimären Antigen-Rezeptors (CAR), der eine MHC I unabhängige Antigenerkennung ermöglicht. Das chimäre Protein besteht aus einer variablen Antikörperdomäne, die über eine Transmembrandomäne mit einer intrazellulären TZR-Signal-Domäne verbunden ist, durch die die T-Zellen aktiviert werden können (Gross et al., 1989).

Mit Tisagenlecleucel zur Behandlung der therapierefraktären CD19⁺ akuten lymphatischen Leukämie (Maude et al., 2018) und Axicabtagene Ciloleucel zur Behandlung therapierefraktärer B-Zell-Lymphome (Locke et al., 2019), gibt es auch nun die ersten offiziell zugelassenen T-Zell-Therapien auf dem Markt. Damit ist die T-Zell-Therapie im klinischen Alltag angekommen und es besteht Hoffnung, dass sie auch bei der Behandlung anderer Erkrankungen, wie z.B. der chronischen Hepatitis B, mit dem Ziel der anhaltenden Heilung von klinischer Relevanz sein wird.

1.3.1 Historischer Rückblick und zukünftige Perspektiven zur adoptiven T-Zell-Therapie der Hepatitis B

Damit es zu einer kompletten Ausheilung der Hepatitis B kommt, ist eine Elimination von HBV-infizierten Zellen und der darin enthaltenen cccDNA, die dem HBV als Replikationsvorlage dient, nötig (Wieland et al., 2004). Wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, ist dafür eine starke multispezifische T-Zell-Antwort essentiell. Der Transfer von HBV-spezifischen T-Zellen in chronisch HBV-Infizierte könnte wieder eine suffiziente Immunantwort herstellen und zu einer Ausheilung der chronischen Hepatitis B führen.

Erste Erkenntnisse zur adoptiven T-Zell-Therapie der Hepatitis B wurden im Zusammenhang mit Knochenmarktransplantationen zur Therapie von hämatologischen Erkrankungen gewonnen. Patienten sind nach einer HSZT stark immunsupprimiert und haben aufgrund der oft nötigen Bluttransfusionen ein erhöhtes Risiko für eine Hepatitis-B-Infektion. Eine aktive Immunisierung vor oder bis zu einem Jahr nach der Knochenmarktransplantation ist nicht erfolgreich. Shouval und Kollegen wollten darum 1993 wissen, ob eine protektive Immunität gegen HBV durch Transplantation von Knochenmark Anti-HBs-positiver Spender erreicht werden kann. Patienten, die vor der Transplantation Anti-HBs und Anti-HBc negativ waren, wurde Knochenmark von Spendern transplantiert, die entweder eine akut ausgeheilte Hepatitis B hinter sich hatten oder vor der Knochenmarktransplantation einmalig gegen Hepatitis B geimpft worden waren. Für beide Gruppen konnte bei der Mehrzahl der Patienten nach der Knochenmarktransplantation ein protektiver Antikörpertiter gemessen werden (Ilan et al., 1993), welcher auch noch Jahre nach der Knochenmarktransplantation bestand (Ilan et al., 2000). Eine protektive Immunität gegen HBV konnte auch durch alleinige Infusion von Lymphozyten aus geimpften Spendern erreicht werden (Ilan et al., 2000). In einem Fall konnte bei einem Patienten mit asymptomatischer persistierender HBV-Infektion (HBsAg⁺, HBV-DNA⁺), der an Leukämie erkrankt war, nach einer Knochenmarkspende von seinem Anti-HBc⁺ und Anti-HBs⁺ positiven Bruder eine Serokonversion zu Anti-HBs festgestellt werden, die mit einem Verschwinden der HBV-DNA einherging (Shouval und Ilan, 1995). Dies konnte in weiteren Studien bestätigt werden (Lau et al., 1998; Lau et al., 2002). Eine erfolgreiche adoptive T-Zell-Therapie per Knochenmarktransplantation mit Verlust des HBsAg senkt das Risiko für spätere HBV-verursachte Folgeerkrankungen. Die Dauerhaftigkeit der Serokonversion zu Anti-HBs kann dabei durch antivirale Nukleosid-Analoga gesteigert werden (Hui et al., 2005). Trotz dieser Erfolge sind die Risiken, die mit der Knochenmarktransplantation einhergehen, sehr groß und somit ist diese Form von adoptiver T-Zell-Therapie nur für chronisch Hepatitis-B-Infizierte sinnvoll, bei denen aufgrund einer hämatologischen Grunderkrankung eine Knochenmarktransplantation indiziert ist.

Eine interessante und praktische Alternative stellt deshalb die adoptive T-Zell-Therapie mit gentechnisch modifizierten T-Zellen dar. Statt einer kompletten Zerstörung und anschließenden Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems des Patienten könnten hier gezielt autologe T-Zellen mit einer Anti-HBV-Spezifität versehen werden, sodass auch kein HLA-Matching nötig ist.

Felix Bohne und Kollegen konstruierten einen CAR gegen die HBV-Oberflächenproteine. Der Transfer in T-Zellen lässt diese HLA-unabhängig das *Surface*-Protein auf HBV-infizierten Hepatozyten erkennen, antivirale Zytokine produzieren und führt schließlich zur Elimination von cccDNA (Bohne

et al., 2008). Im HBV-transgenen Mausmodell proliferierten und migrierten murine T-Zellen, die mit dem HBsAg-spezifischen CAR versehen wurden, in die Leber und führten zu einer Kontrolle der HBV-Infektion mit nur passagerem Leberschaden. Damit bewiesen Karin Wisskirchen (geborene Krebs) und Kollegen, dass die adoptive T-Zell-Therapie der chronischen Hepatitis B mit chimären Antigen-Rezeptoren *in vivo* funktionieren kann (Krebs et al., 2013).

Eine andere Möglichkeit ist es, T-Zell-Rezeptoren, isoliert aus Patienten mit ausgeheilter Hepatitis B, per Gentransfer in Lymphozyten chronisch HBV-Infizierter einzubringen und dem Patienten wieder zuzuführen. Gehring und Kollegen isolierten bereits einen Core-spezifischen TZR und zwei HBsAg-spezifische T-Zell-Rezeptoren aus Patienten mit akut ausgeheilter Hepatitis B. Damit versehene T-Zellen, unabhängig ob sie aus Gesunden oder chronisch Infizierten isoliert wurden, wiesen eine polyfunktionale Zytokinantwort auf und eliminierten HBV-Antigen⁺ HCC-Linien *in vitro* (Gehring et al., 2011b).

Die Daten aus allogenen Knochenmarktransplantationen von HBsAg⁺ Patienten mit einer zusätzlichen hämatologischen Grunderkrankungen demonstrieren, dass der adoptive Transfer von Immunzellen durchaus zu einer funktionellen Heilung von chronisch Hepatitis B Infizierten und zu einer Verbesserung relevanter klinischer Endpunkte wie der Risikoreduktion von Folgeerkrankungen führen kann (Hui et al., 2005). Durch den gezielten Transfer von genmodifizierten autologen HBV-spezifischen T-Zellen soll die Therapieidee für CHB-Patienten auch ohne hämatologische Grunderkrankung zugänglich gemacht werden. Erste *in vitro* und *in vivo* Daten mit chimären Antigenrezeptoren (Krebs et al., 2013) oder natürlichen T-Zell-Rezeptoren (Gehring et al., 2011b) konnten zeigen, dass die adoptive T-Zell-Therapie durchaus Potential hat, um in Zukunft eine Therapiemöglichkeit für die chronische Hepatitis B darzustellen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Weltweit sind ca. 275 Mio. Menschen an einer chronischen Hepatitis B erkrankt (WHO, 2017) und nach dem „*Globale Health Estimates Report*“ von 2018 sind im Jahr 2016 knapp eine Million Menschen an den Folgen einer Hepatitis B verstorben (WHO, 2018). Die aktuell zur Verfügung stehenden medikamentösen Therapien sind nicht kurativ, da die cccDNA mit diesen Therapien nicht eliminiert wird und somit immer wieder als Replikationsvorlage für das HBV dient (Dandri et al., 2000; Moraleda et al., 1997).

Die in der akuten Hepatitis B zur Ausheilung führende starke T-Zell-Antwort fehlt in chronisch Hepatitis B-Infizierten und führt zur Persistenz der Infektion (Rehermann, 2013; Schuch et al., 2018). Durch den adoptiven T-Zell-Transfer von HBV-spezifischen T-Zellen erhofft man sich die starke T-Zellen Antwort, wie sie bei akut HBV-Infizierten vorliegt (Thimme et al., 2003; Urbani et al., 2002), zu imitieren und dadurch die vollständige Elimination des Virus zu erreichen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein multispezifisches TZR-Repertoire aus hoch aviden T-Zell-Rezeptoren für die potentielle Anwendung in der adoptiven T-Zell-Therapie der Hepatitis B zu identifizieren und zu charakterisieren.

Aus 100 HBV-spezifischen T-Zell-Linien und Klonen, die von Karin Wisskirchen aus Patienten mit einer akuten oder ausgeheilten HBV-Infektion isoliert worden waren (Wisskirchen und Metzger et al., 2017), sollten die identifizierten T-Zell-Rezeptor-Sequenzen amplifiziert und in einen retroviralen Vektor eingebaut werden. Per retroviraler Transduktion sollten dann diese T-Zell-Rezeptoren in T-Zellen eingebracht werden, um aus ihnen HBV-spezifische Effektorzellen zu machen. Dies erforderte eine gentechnische Optimierung der TZR-Sequenzen, um eine hohe Transduktionseffizienz und TZR-Expression in humanen als auch murinen T-Zellen zu erreichen. Die isolierten und optimierten T-Zell-Rezeptoren sollten dann nach retroviraler Transduktion in humane T-Zellen funktionell charakterisiert werden, um die besten T-Zell-Rezeptoren pro Peptid-Spezifität auszuwählen. Die funktionelle Charakterisierung umfasste die Bestimmung der spezifischen polyfunktionalen Zytokinproduktion, der zellvermittelten Zytotoxizität und die Bestimmung der Fähigkeit das entsprechende HBV-Peptid auf verschiedenen HLA-A2-Subtypen zu erkennen. Diese Auswahl an HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren sollte dann in *in vitro* Infektionsmodellen mit humanen und murinen Zellen ihre spezifische Effektorfunktion im Sinne einer Elimination von HBV-infizierten-Zellen beweisen, um sie dann als geeignete Kandidaten für einen adoptiven T-Zell-Transfer im Mausmodell weiter zu untersuchen.

Kapitel 2

Ergebnisse

Die in den Kapiteln 2.1–2.6.4 dargestellten Daten zur TZR-Gewinnung und Charakterisierung der 11 HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren entstanden in enger Kollaboration mit Karin Wisskirchen und wurden bereits in folgendem Artikel veröffentlicht:

Wisskirchen, K., Metzger, K., ... Protzer, U. (2017). „Isolation and functional characterization of hepatitis B virus-specific T-cell receptors as new tools for experimental and clinical use“. In: *PLOS ONE*, 12(8), e0182936.

Folgende Abbildungen aus Wisskirchen, Metzger et al., 2017 und die Daten auf denen diese basieren entstanden im Rahmen der vorliegenden Arbeit: Fig. 1 B–D, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 6, S2 Fig., S3 Fig. A und C, S4 Fig., S5 Fig.. Hingegen folgende Abbildungen und Daten aus (Wisskirchen, Metzger et al., 2017) entstanden vor beziehungsweise nach dieser Arbeit: Fig. 1 A, Fig. 5, Fig. 7., S1 Fig., S3 Fig. B, S6 Fig. Noch nicht veröffentlicht sind die Ergebnisse der Charakterisierung der TZR C_{AB} und S_{AB}, die wir zum Vergleich von der AG Antonio Bertoletti erhalten hatten. Werden die Daten im folgenden mit (Wisskirchen et al., 2017) zitiert, wurden die Daten außerhalb dieser Arbeit meist durch Karin Wisskirchen erhoben. Erfolgt das Zitat mit (Wisskirchen, Metzger et al., 2017) wurden die Daten im Rahmen dieser Arbeit erhoben.

2.1 Identifizierung HBV-spezifischer T-Zell-Rezeptoren

Um natürliche T-Zell-Rezeptoren für einen späteren adoptiven T-Zell-Transfer mit retroviral transduzierten HBV-spezifischen T-Zellen zu gewinnen, wurden in Vorarbeiten von Karin Wisskirchen HBV-spezifische T-Zell-Klone gewonnen (Wisskirchen et al., 2017).

Zuvor war festzulegen welche Antigenpezifität und HLA-Restriktion die zu isolierenden T-Zellen besitzen sollen, d.h. welche HBV-Peptide auf welchem präsentierenden HLA-Molekül erkannt werden sollen. Man entschied sich dabei für zwei Peptide aus dem S-Protein, dem Peptid S₂₀₋₂₈ (S20) mit der AS-Sequenz „FLLTRILTI“ an der Aminosäureposition S20-S28 und dem Peptid S₁₇₂₋₁₈₀ (S172) mit der AS-Sequenz „WLSLLVPFV“ an der AS-Position S172-S180, sowie dem Peptid Core₁₈₋₂₇ (C18) mit der Sequenz „FLPSDFFPFV“, das sich im Core-Protein an der AS-Position 18-27 befindet. Alle drei Peptide wurden bereits als immundominante HLA-A*02:01-restringierte Peptide in der T-Zell-Antwort gegen HBV beschrieben (Desmond et al., 2008). Da HLA-A*02:01 ein häufiger HLA-Subtyp in der europäischen Bevölkerung ist und viele etablierte Zelllinien HLA-A*02:01 positiv

sind, entschied man sich HLA-A*02:01 restringierte T-Zellen zu isolieren. Zur Gewinnung HBV-spezifischer T-Zell-Klone wurde drei HLA-A*02:01⁺ Patienten Blut entnommen, die entweder an einer akuten Hepatitis B erkrankt waren oder bereits eine akute HBV-Infektion hinter sich hatten (siehe Tabelle 2.1.1). Aus dem Blut wurden mononukleäre Zellen isoliert, mit den HBV-Peptiden stimuliert, HBV-spezifische Zellen sortiert und expandiert (s. Abb. 2.1.1)(Krebs, 2011).

Characteristics	Donor 1	Donor 2	Donor 3
Sex	M	F	M
Age (years)	49	52	61
HBV-DNA(IU/ml)	negative		1,9 × 10 ⁶
HBsAg	negative		positive
HBeAg	negative		positive
Anti-HBs (IU/ml)	>1000		negative
HLA-A	02:01, 23:01	01:01, 02:01	02:01
HLA-B	39:24, 44:03	08:01, 44:02	07:02, 41:02
HLA-C	04:01, 07:01	05:01, 07:01	12:03, 17:03
HLA-DRB1	07:01, 13:03	04:04, 13:01	13:03, 15:01
HLA-DQB1	02:02, 03:01	03:02, 06:03	03:01, 05:02
HLA-DPB1	02:01, 04:01	04:02, 06:01	04:01

Tabelle 2.1.1: Informationen zu den Blutspendern für die Gewinnung der HBV-spezifischen T-Zell-Klone (modifiziert nach Wisskirchen et al., 2017)

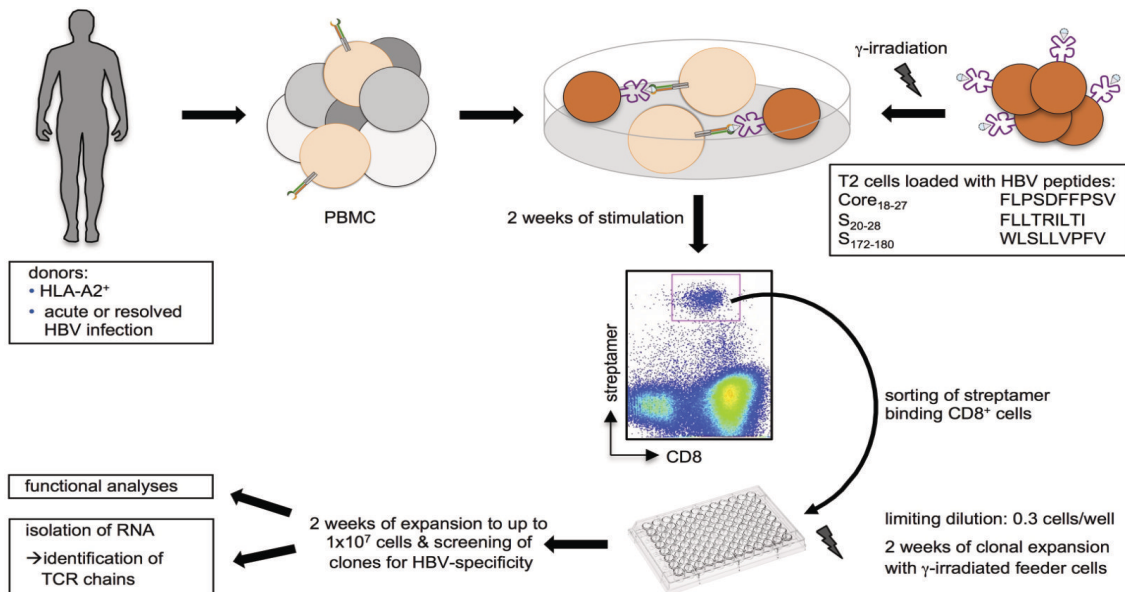


Abb. 2.1.1: Schema des Protokolls zur Gewinnung HBV-spezifischer T-Zell-Klone. Aus dem Blut HLA-A*02:01⁺ Patienten mit AHB oder Z.n. einer AHB, wurden mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs)) über einen Dichtegradienten (Ficoll) isoliert und mit Peptid-beladenen T2 Zellen, die zuvor zur Wachstumshemmung bestrahlt worden waren, stimuliert. Zur Stimulation wurden die HBV-Peptide S20, S172 und C18 verwendet. Nach zwei Wochen wurden die spezifischen T-Zellen mittels Streptamerfärbung am Durchflusszytometer per FACS(= fluorescence-activated cell sorting) isoliert. Nach weiteren zwei Wochen Expansion wurden die T-Zell-Klone im Screeningverfahren auf ihre Spezifität überprüft. Dies erfolgte in der Kokultur mit HBV-Peptid-beladenen T2-Zellen oder HBV-replizierenden Hepatomazelllinien und anschließendem Chromium-Release-Assay bzw. XTT-Test. Ein Teil der funktionellen T-Zell-Linien wurden nach Erreichen einer ausreichender Zellzahl zur RNA-Isolation eingefroren und die restlichen Zellen für weitere funktionelle Analysen verwendet (Wisskirchen et al., 2017).

Für 100 T-Zell-Linien und -Klone konnte eine funktionelle HBV-Spezifität nachgewiesen werden, sodass nun der T-Zell-Rezeptor jedes HBV-spezifischen T-Zell-Klons identifiziert werden sollte. Das Ziel war es die TZR-codierende mRNA nach Umschreibung in cDNA zu amplifizieren, um die DNA-Sequenz anschließend über einen retroviralen Vektor in die Zielzellen einzubringen. Insbesondere die variablen Regionen der T-Zell-Rezeptorketten, die durch somatische Rekombination entstehen, sind von Interesse, da sie die Spezifität des TZR bestimmen (vgl. Kapitel 1.2.1). Da theoretisch die variable Sequenz für die α -TZR-Kette (im folgenden α -Kette) mit ca. 70 verschiedenen V-Segmenten und für die β -TZR-Kette (im folgenden β -Kette) mit 52 verschiedenen V-Segmenten beginnen kann (Murphy et al., 2009), ist die Identifizierung der variablen Regionen unbekannter TZR-Ketten aufwendig. Für die Identifizierung der β -Kette aus der cDNA der 100 HBV-spezifischen T-Zell-Linien wurde eine PCR mit degenerierten Primern verwendet (siehe Kapitel 5.7.3.1). Die Amplifikate wurden per Elektrophorese aufgetrennt und die spezifischen Banden extrahiert und sequenziert. Mit dem Analyse-Tool „IMGT/V-QUEST“ auf der IMGT-Webseite (*the international Immunogenetics information system*) wurden dann in Zusammenarbeit mit Karin Wisskirchen (Krebs, 2011) die variable Region der β -Kette identifiziert und nach IMGT-Nomenklatur klassifiziert (Brochet et al., 2008). Die Identifizierung der TZR-Sequenzen (insbesondere der β -Ketten) von einem Teil der isolierten T-Zell-Linien war bereits von Karin Wisskirchen erfolgt (Krebs, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben der noch nicht untersuchten T-Zell-Linien analysiert und die Sequenzen der noch fehlenden α -Ketten identifiziert. Es stellte sich dabei heraus, dass mehrere der aus einem Spender gewonnenen T-Zell-Linien gleicher Antigen-Spezifität die gleichen variablen β -Ketten mit identischer CDR3-Region aufwiesen, sodass man davon ausgehen kann, dass diese ursprünglich alle von derselben Ursprungszelle abstammen und somit einen T-Zell-Klon darstellen (s. Abb. 2.1.2). Für den Spender 1 wurde z.B. in 19 T-Zell-Linien die identische variable β -Ketten Region V β 17 isoliert, die zusammen mit der α -Kette V α 24-1 den Core-spezifischen TCR 7D bildet. In 11 T-Zell-Linien des Spenders 2 konnte die V β 6-5 als variable Region der β -Kette des S172-spezifischen T-Zell-Rezeptors WL31 identifiziert werden.

Zur Identifizierung der variablen Regionen der α -Kette wurde analog vorgegangen. Für einige T-Zell-Rezeptoren konnte keine α -Kette bestimmt werden, da die Sequenzierungsergebnisse keine reine Nukleotidsequenz ergaben. Dies ist dadurch zu erklären, dass eine T-Zelle im Rahmen der Reifung meist zwei α -Ketten durch somatische Rekombination generiert, wovon jedoch nur eine Kette funktionell ist (Malissen et al., 1988). Mit dem degenerierten Primer werden beide α -Ketten amplifiziert und somit ein unreines PCR-Produkt erzeugt. Von diesen Proben wurde deshalb die Polymerase-Kettenreaktion mit den spezifischen Primern für die einzelnen V-Segmente der α -Kette durchgeführt. Hier wurden nun pro T-Zell-Klon oft für zwei V-Segmente spezifische Banden in den PCR-Produkten gefunden. Die Unterscheidung zwischen funktioneller und nicht funktioneller α -Kette konnte teils durch die Analyse der Sequenzierungsergebnisse mit dem „IMGT/V-QUEST“ Analyse-Tool, durch Nachweis z.B. einer Frame-Shift Mutation, festgestellt werden. Nur für den T-Zell-Klon 4G fanden wir zwei potentiell funktionelle α -Ketten, V α 34 und V α 13.

Aus der cDNA der 100 analysierten T-Zell-Linien konnten 11 verschiedene T-Zell-Rezeptoren identifiziert werden (s. Abb. 2.1.2). Es wurden fünf T-Zell-Rezeptoren mit einer Spezifität für das Core-Peptid C18, vier T-Zell-Rezeptoren mit einer Spezifität gegen das S-Peptid S20 und zwei T-

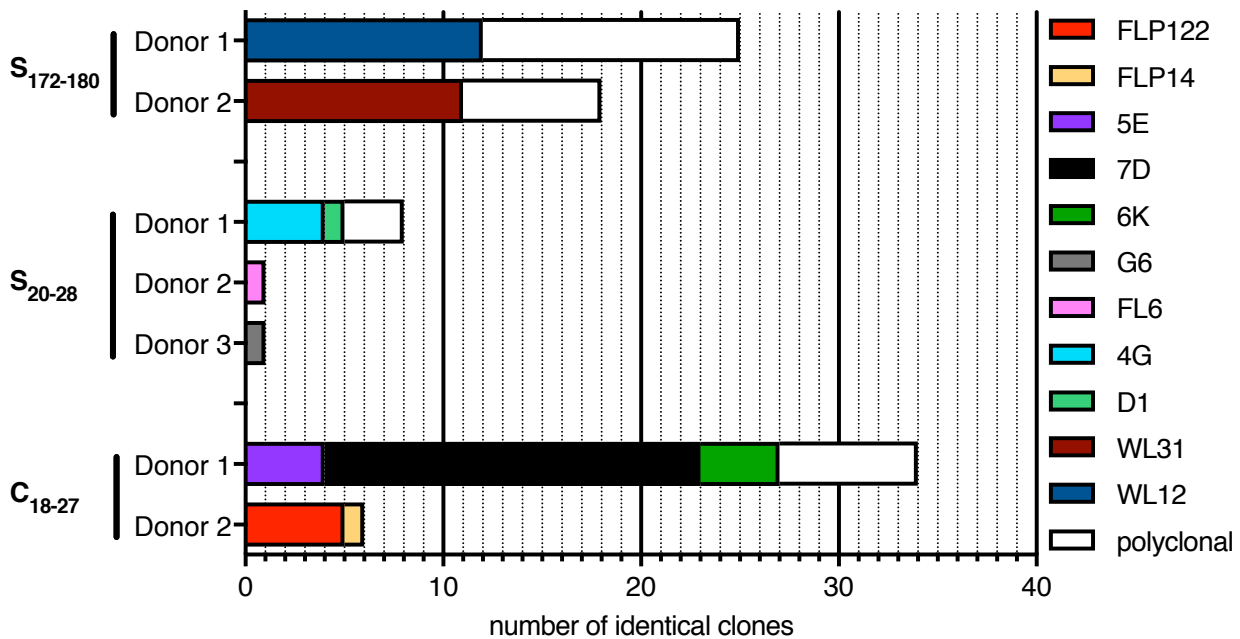


Abb. 2.1.2: Zusammensetzung der T-Zell-Klone pro Spender. Insgesamt wurden 100 *in vitro* expandierte T-Zell-Linien analysiert. Die Grafik zeigt die Anzahl der T-Zell-Klone (x-Achse) pro Patient und Antigen-spezifität (y-Achse), die den gleichen TZR (siehe Farblegende) besitzen (modifiziert nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

TCR	Donor	Hepatitis B status	Specificity	TCR chains	
				V α	V β
G6	3	acute	S20	17	12-3
FL6	2	acute	S20	22	12-3
4G	1	resolved	S20	34	5-1
D1	1	resolved	S20	17	12-3
WL31	2	acute	S172	39	6-5
WL12	1	resolved	S172	12-2	7-6
FLP14	2	acute	C18	12-2	2
FLP122	2	acute	C18	12-2	27
5E	1	resolved	C18	13-1	13
6K	1	resolved	C18	13-1	27
7D	1	resolved	C18	17	24-1

Tabelle 2.1.2: Identifizierte HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren. Die V-Segmente sind nach der IMGT-Nomenklatur (V α =TRAV, V β =TRBV) angegeben. In fett markiert sind V-Segmente, die in T-Zell-Rezeptoren mit gleicher Antigen-spezifität in verschiedenen Spendern vorkommen.

Zell-Rezeptoren mit einer Spezifität gegen das S-Peptid S172 isoliert. Die meisten T-Zell-Rezeptoren wurden dabei aus dem Spender 1 isoliert, wobei aus diesem auch am meisten T-Zell-Klone gewonnen und analysiert worden waren. Genauere Informationen bezüglich der identifizierten TZR-Ketten der einzelnen T-Zell-Rezeptoren siehe Tabelle 2.1.2.

Auffällig ist, dass pro Spender je ein S20-spezifischer T-Zell-Rezeptor die gleichen V-Segmente

(TRBV 12-3) der β -Kette und die zwei T-Zell-Rezeptoren G6 und D1 sogar die gleichen V-Segmente in der α -Kette (TRAV 17) hatten. Selbst die Aminosäuresequenz der CDR3 Region der β -Kette unterschied sich bei den T-Zell-Rezeptoren G6 und D1 nur in 2 von 11 Aminosäuren. Auch die C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren FLP122 und 6K besitzen das gleiche V-Segment der β -Kette. (Die Daten aus diesem Kapitel wurden bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.)

2.2 Klonierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in retrovirale Vektoren

Um die genetische Information der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in die T-Zellen des Patienten einzusetzen, können modifizierte Retroviren verwendet werden. Diese können die gewünschte Sequenz in das Genom der Zielzelle integrieren, sind jedoch nicht replikationsfähig.

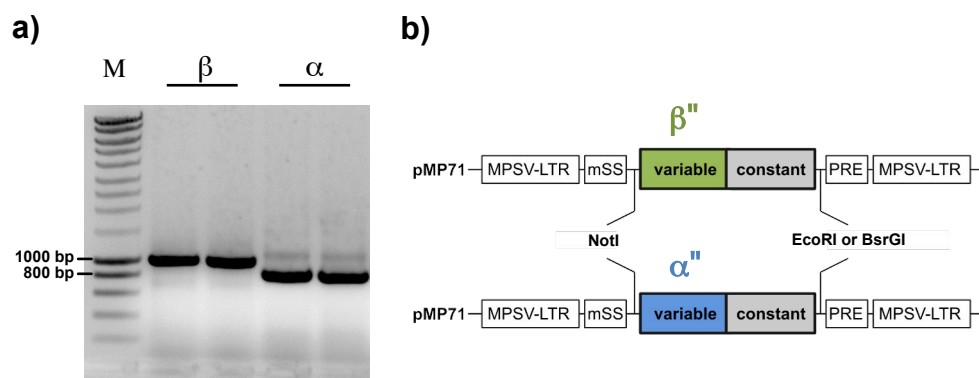


Abb. 2.2.1: Klonierung der einzelnen TZR-Ketten in den retroviralen Vektor pMP71. a) Beispiel einer Gelelektrophorese nach PCR mit spezifischen Primern zur Amplifizierung der α und β -TZR-Ketten. M= Marker b) Schematische Plasmidkarte der einzelnen TZR-Ketten im pMP71. MPSV-LTR, *long terminal repeats of myeloproliferative sarcoma virus*; mSS, *modified mRNA splice site*; PRE, *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (Abb. b) modifiziert nach Engels et al., 2003).

Hierzu wurden zunächst die vollständigen Nukleotidsequenzen der TZR-Ketten ermittelt. Nachdem die V-Segmente der einzelnen T-Zell-Rezeptoren, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, identifiziert worden waren, konnten anhand der entsprechenden vollständigen V-Segment-Sequenzen aus der IMGT-Datenbank „IMG/Gene-DB“ (Giudicelli et al., 2006) Primer entworfen werden, die die Amplifizierung der kompletten codierenden Sequenz erlaubte. Es ergaben sich für die α - und β -Kette PCR-Produkte um die 800 bzw. 900 bp (s. Abb. 2.2.1), die nach Gel-Extraktion in den retroviralen Vektor MP71, der uns von der AG Uckert¹ zur Verfügung gestellt wurde (Engels et al., 2003), kloniert wurden. (Die Daten aus diesem Kapitel wurden bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.)

¹Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Berlin, Deutschland

2.3 Überprüfung der Expression und Spezifität der isolierten TZR-Ketten

Um zu überprüfen, ob die korrekten TZR-Sequenzen isoliert worden waren, wurden die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in Zellen der Jurkat-T-Zell-Linie eingebracht. Diese eignen sich besonders zur Überprüfung der TZR-Expression: sie sind erstens leichter zu kultivieren und zu transduzieren als primäre T-Zellen und zweitens exprimieren sie keinen eigenen T-Zell-Rezeptor. Aufgrund der fehlenden TZR-Expression befindet sich auch kein CD3-Molekül auf der Zelloberfläche, da CD3-Moleküle nur im Komplex mit TZR-Ketten stabil sind. Die Detektion von CD3 an der Zelloberfläche auf Jurkat-Zellen ist folglich ein Hinweis, ob es nach Transduktion zu einer TZR-Expression an der Zelloberfläche kommt (Thomas et al., 2007). Die transduzierten Jurkat-Zellen wurden 2 Tage nach retroviraler Transduktion mit anti-CD3 Antikörpern und dem jeweiligen Streptamer gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. Anhand der CD3-Expression konnte festgestellt werden, welche transduzierten Kettenkombinationen auf der Zelloberfläche exprimiert wurden (s. Abb. 2.3.1 a–c). Durch die Streptamerfärbung wurde die Peptidspezifität der T-Zell-Rezeptoren nachgewiesen. Für alle TZR-Ketten-Kombinationen konnte nachgewiesen werden, dass sie an der Zelloberfläche der Jurkat-Zellen exprimiert werden. Für den T-Zell-Klon 4G zeigte sich nur für die Kettenkombination $V\beta 5-1$ und $V\alpha 34$ eine positive Streptamerbindung und somit der Nachweis, dass diese beiden Ketten den S20-spezifischen TZR 4G bilden und nicht die Kettenkombination $V\beta 5-1$ und $V\alpha 13$. Für alle restlichen T-Zell-Rezeptoren konnte ebenfalls per Streptamerfärbung die korrekte Peptidspezifität der identifizierten TZR-Heterodimere gezeigt werden.

Anschließend wurden mit den in den Jurkat-Zellen korrekt exprimierten TZR-Ketten-Kombinationen humane T-Zellen transduziert. Als Transduktions- und Expressionskontrolle wurde eine Streptamerfärbung der transduzierten Zellen durchgeführt (s. Abb. 2.3.1 a–c). Für alle T-Zell-Rezeptoren (bis auf die Kettenkombination $V\beta 5-1$ und $V\alpha 13$ des T-Zell-Klons 4G) konnte eine Streptamer⁺ Population abgegrenzt werden, jedoch schwankte die Transduktionsrate der T-Zell-Rezeptoren mit 0,4 % bis 7,2 % Streptamer⁺ CD8⁺ T-Zellen stark. Um die Funktionalität der TZR-Kettenkombination grob zu überprüfen wurde eine Kokultur der transduzierten mononukleären Zellen mit Peptid beladenen T2-Zellen durchgeführt (s. Abb. 2.3.1 d). Das Effektor- zu Zielzellverhältnis wurde hierbei nicht an die Transduktionseffizienz (Streptamer⁺ Zellen) angepasst, sodass verschiedene Effektor- zu Zielzellverhältnisse vorlagen (zwischen 1:3 bis 1:40). Pro TZR wurden die T2-Zellen mit dem spezifischen, einem unspezifischen oder keinem Peptid beladen. Nach 72 h wurde Überstand von der Kokultur abgenommen und mit diesem ein IFN- γ -ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt. Alle transduzierten PBMCs, bis auf die mit den T-Zell-Rezeptoren G6 und D1 transduzierten, sezernierten spezifisch um die 2000-4000 pg/ml IFN- γ . Die schwache IFN- γ Antwort der T-Zell-Rezeptoren G6 und D1 korrelierte mit der sehr geringen Transduktionsrate (0,46 bzw. 0,88 %), sodass diese trotzdem als funktionell angesehen wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die identifizierten und in den retroviralen Vektor eingebrachten TZR-Konstrukte sowohl auf Jurkat-Zellen wie auch auf humanen T-Zellen exprimiert wurden und eine spezifische Effektorantwort in den transduzierten T-Zellen auslösen können. (Die Daten aus diesem Kapitel wurden bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.)

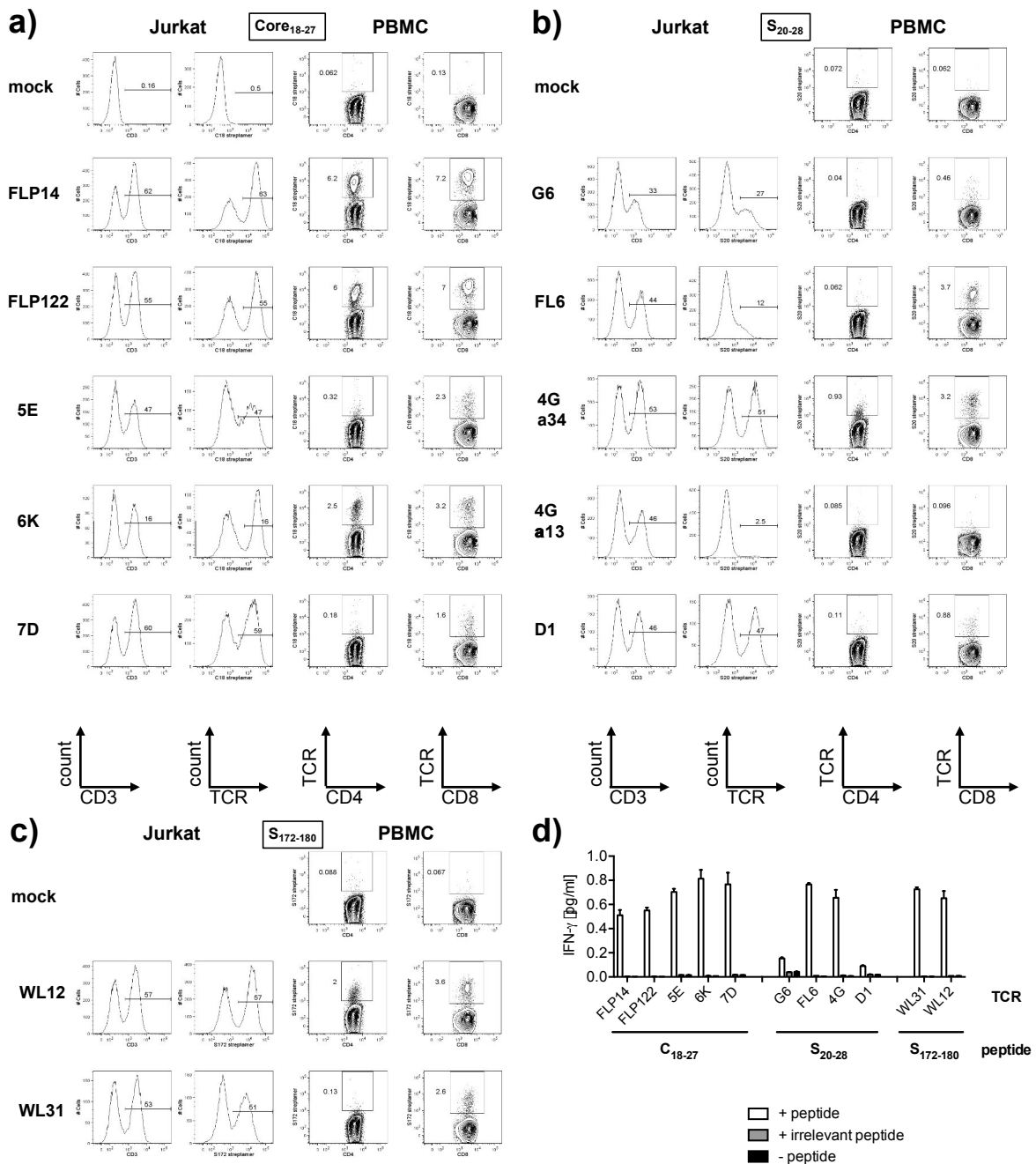


Abb. 2.3.1: Überprüfung der Expression der T-Zell-Rezeptoren und deren Funktionalität. a)–c) Anti-CD3- und Streptamer-Färbung (Achsen mit TCR beschriftete) von Jurkat-Zellen und humanen T-Zellen, transduziert mit der entsprechenden α - und β -TZR-Kette der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren. Der Nachweis von CD3 an der Oberfläche der Jurkat-Zellen, die keinen endogenen TZR exprimieren, weist auf die erfolgreiche Expression des per retroviraler Transduktion eingeführten T-Zell-Rezeptors hin. Die FACS-Analyse erfolgte 2 Tage nach retroviraler Transduktion mit den a) C18-spezifischen, b) S20-spezifischen und c) S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren. T-Zellen wurden vorselektiert in Kombination mit der 4G β -Kette überprüft wurden. Vom Klon 4G wurden zwei α -TZR-Ketten identifiziert, weswegen diese jeweils getrennt in Kombination mit der 4G β -Kette überprüft wurden. c) IFN- γ -ELISA nach 20h-Kokultur der transduzierten T-Zellen mit Peptid beladenen T2-Zellen. Pro TZR wurde eine Kokultur mit T2-Zellen durchgeführt, die mit 1 M des entsprechenden spezifischen HBV-Peptid beladen (= peptide) worden waren, mit einem unspezifischen Peptid (= +irrelevant peptide) oder mit gar keinem Peptid beladen worden waren (= -peptide). Das Effektor- zu Zielzellverhältnis variierte unter den T-Zell-Rezeptoren (von 1:3 bis 1:40) abhängig von der Transduktionseffizienz. (Wisskirchen, Metzger et al., 2017.)

2.4 Optimierung der Expression der isolierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Nach Identifikation der korrekt exprimierten und funktionellen TZR-Ketten wurden vor einer genaueren funktionellen Charakterisierung die T-Zell-Rezeptoren zunächst gentechnisch optimiert. Das Ziel der Optimierung ist, eine bessere und ausgewogene Expression der TZR-Ketten in den Zielzellen zu erreichen sowie das Risiko einer Fehlpaarung der eingebrachten TZR-Ketten mit den endogenen TZR-Ketten zu minimieren.

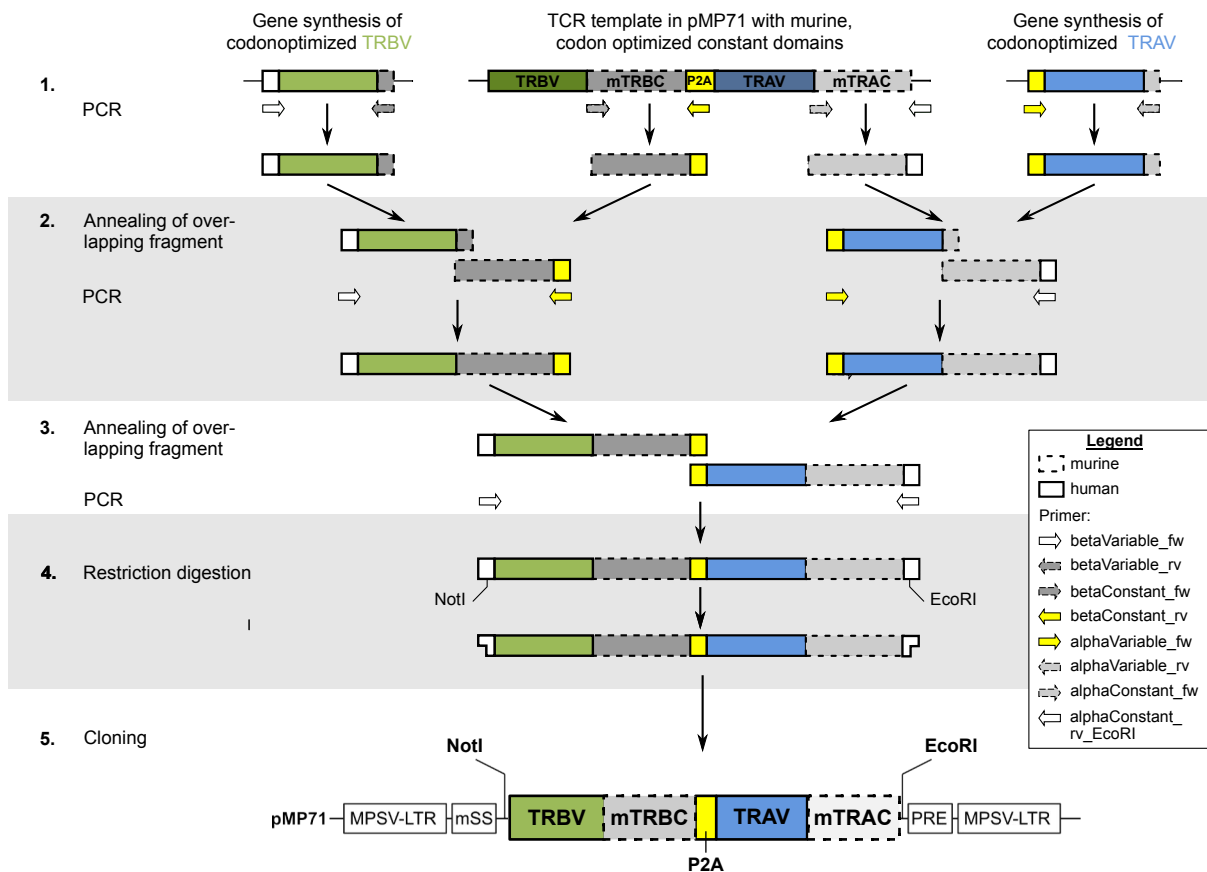


Abb. 2.4.1: Schematische Darstellung der Fusion der optimierten TZR-Ketten. An die variablen Regionen am 5'-Ende wurde für die β -Kette eine zum Zielvektor pMP71 überlappende Sequenz und für die α -Kette eine Teilsequenz des P2A-Elements während der Gensynthese angefügt. Am 3'-Ende der variablen Regionen wurde jeweils eine Teilsequenz der entsprechenden konstanten Region angefügt. 1. In einer ersten PCR wurden die variablen beziehungsweise konstanten Regionen amplifiziert (Pfeile symbolisieren Bindestellen der Primer). 2. Im zweiten Schritt wurden die entsprechenden variablen und konstanten TZR-Regionen im Sinne einer Fusions-PCR zuerst in einem *Annealing*-Schritt über die überlappenden Bereiche miteinander verbunden und anschließend die ganze TZR-Kette amplifiziert. 3. In einer weiteren Fusions-PCR wurden dann die entsprechende α - und β -Kette durch überlappende Abschnitte in der verbindenden P2A-Sequenz miteinander fusioniert und anschließend amplifiziert. 4.–5. Das gesamte Konstrukt konnte dann durch die ebenfalls angefügten Restriktionsschnittstellen EcoRI und NotI in den retroviralen Vektor pMP71 eingebaut werden. MPSV-LTR, *long terminal repeats of myeloproliferative sarcoma virus*; mSS, *modified mRNA splice site*; PRE, *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (schematische Darstellung des Vektorkonstrukts modifiziert nach Engels et al., 2003, schematische Darstellung der Fusions-PCR nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017)

Um eine bessere Expression der TZR-Ketten in humanen T-Zellen zu erreichen, wurden die variablen

Regionen der T-Zell-Rezeptoren für das humane System codonoptimiert. Die konstanten humanen Regionen der T-Zell-Rezeptoren wurden durch murine konstante Regionen mit einer zusätzlichen Cystein-Brücke ersetzt, wodurch das Risiko von Fehlpaarungen reduziert wird (Cohen et al., 2006; Cohen et al., 2007). Gleichzeitig ermöglicht dies eine bessere Expression der T-Zell-Rezeptoren in murinen Lymphozyten und somit die Möglichkeit der späteren Verwendung in einem Mausmodell, zudem lässt sich der Rezeptor in humanen Zellen, mit spezifischen Antikörpern gegen den murinen konstanten Bereich besser anfärben (persönliche Mitteilung von Prof. Wolfgang Uckert).

Aus Kostengründen wurden nur die variablen Regionen der T-Zell-Rezeptoren codonoptimiert. Diese wurden dann durch eine Fusions-PCR mit der entsprechenden bereits codonoptimierten murinen konstanten TZR-Region, die uns von der AG Uckert² zur Verfügung gestellt wurde, verbunden (s. Abb. 2.4.1, 1.–2.). Des Weiteren wurden α - und β -Ketten über ein P2A Element in einer weiteren Fusion verknüpft, um eine ausgewogenere Expression der TZR-Ketten zu gewährleisten (s. Abb. 2.4.1, 3.). Das P2A-Element ist ein 2A-Element vom porcinen Teschovirus. Diese Peptidsequenz führt zu einem ribosomalen Sprung mit gleichzeitigem Abbruch der bereits synthetisierten Aminosäuresequenz, wobei die Synthese der nachfolgenden Aminosäuresequenz nicht beeinträchtigt ist (Donnelly et al., 2001). Dies gewährleistet ein fast gleiches Expressionslevel zweier Proteine, die unter demselben Promotor exprimiert werden (Leisegang et al., 2008). Das optimierte Konstrukt wurde dann in den retrovirale Vektor MP71 kloniert (s. Abb. 2.4.1, 4.–5.). (Die Daten aus diesem Kapitel wurden bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.)

2.5 Expression der optimierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen

Die 11 codonoptimierten T-Zell-Rezeptoren sowie die beiden HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren C_AB und S_AB, die uns von der AG Antonio Bertoletti³ zur Verfügung gestellt worden waren, wurden per Transduktion in mononukleäre Zellen eingebracht. Der TCR C_AB ist ein C18-spezifischer TZR, der S_AB ein S20-spezifischer TZR (Gehring et al., 2011a). Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurde eine Streptamerfärbung durchgeführt. Die in diesem Kapitel dargestellten Daten zu unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurde bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht. Noch nicht veröffentlicht sind die ebenfalls erhobenen Daten für die T-Zell-Rezeptoren C_AB und S_AB.

In den CD8⁺ T-Zellen konnte für alle T-Zell-Rezeptoren eine distinkte Population an Streptamer⁺ Zellen festgestellt werden (s. Abb. 2.5.1). Die Transduktionsraten der optimierten TZR-Ketten in CD8⁺ T-Zellen waren um ein Vielfaches höher (zwischen 5- bis 40-fach) als in der ersten Transduktion der nicht optimierten TZR-Ketten (s. Abb. 2.3.1 in Kapitel 2.3). Zudem waren im Vergleich die Transduktionsraten für unsere 11 T-Zell-Rezeptoren mit einem Durchschnitt von 39,9% Streptamer⁺ CD8⁺ T-Zellen doppelt so hoch, wie die Transduktionsraten der zwei T-Zell-Rezeptoren (C_AB, S_AB) aus der AG von Antonio Bertoletti mit einem Durchschnitt von 20,1%.

In den transduzierten CD4⁺ T-Zellen waren deutliche Unterschiede bezüglich der Streptamerbindung

²Max Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin-Buch, Berlin, Deutschland

³Singapore Institute for Clinical Sciences, Agency for Science Technology and Research (A*STAR), Singapore

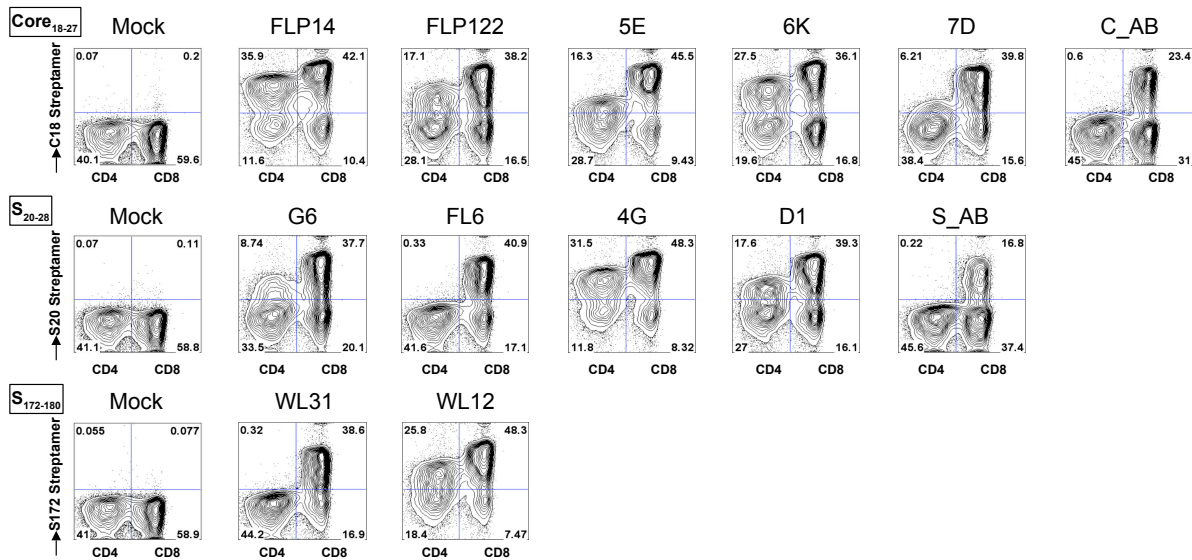


Abb. 2.5.1: Expression der optimierten TZR-Konstrukte in humanen T-Zellen. Streptamer- und anti-CD8-Färbung der mit den optimierten T-Zell-Rezeptoren transduzierten T-Zellen am Tag 10 nach Stimulation und Transduktion. Bei der Auswertung der FACS-Daten wurde zuvor auf $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen vor selektiert, somit entsprechen die $CD8^-$ Zellen den $CD4^+$ T-Zellen (modifiziert und ergänzt um die Daten der TZR C_AB und S_AB nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

zu erkennen. In Abbildung 2.5.1 entsprechen diese den $CD8^-$ Streptamer $^+$ Zellen. So war die Häufigkeit der Streptamer $^+$ Zellen in den $CD4^+$ T-Zellen für drei T-Zell-Rezeptoren ähnlich der in $CD8^+$ (6K, FLP14, 4G) bei 6 T-Zell-Rezeptoren geringer (FLP122, 7D, 5E, D1, G6, WL12) und bei den vier T-Zell-Rezeptoren C_AB, FL6, S_AB und WL31 war keine Streptamerbindung in den $CD4^+$ T-Zellen zu erkennen.

Zur Klärung, ob diese Unterschiede in den $CD4^+$ T-Zellen durch unterschiedlich starke Streptamerbindung oder durch unterschiedliche Expressionsniveaus der T-Zell-Rezeptoren zustande kamen, verwendeten wir in einem zweiten Experiment zusätzlich zu dem spezifischen Streptamer einen Antikörper (anti-muTRBC), der an den für alle T-Zell-Rezeptoren identischen murinen konstanten Bereich der optimierten β -TZR-Kette bindet (s. Abb. 2.5.2). Diese Untersuchung erfolgte nur für die C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren.

Für alle transduzierten $CD8^+$ T-Zellen war zu erkennen, dass die Frequenz an Streptamer $^+$ Zellen der Frequenz an anti-muTRBC $^+$ Zellen in etwa entspricht, auch wenn der prozentuale Anteil der Streptamer $^+$ $CD8^+$ T-Zellen je TZR zwischen 5-10% niedriger war als der Anteil an anti-muTRBC $^+$ $CD8^+$ T-Zellen. In den $CD4^+$ T-Zellen waren deutliche Unterschiede zwischen der Streptamerfärbung und der Färbung mit anti-muTRBC $^+$ festzustellen. So war die Frequenz an Streptamer $^+$ Zellen für die T-Zell-Rezeptoren 7D und 5E sehr gering und für den TZR C_AB war gar keine Streptamerfärbung festzustellen, wohingegen die Frequenzen an anti-muTRBC $^+$ $CD4^+$ T-Zellen den Frequenzen der Streptamer $^+$ bzw. anti-muTRBC $^+$ $CD8^+$ T-Zellen entsprachen.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Streptamerfärbung zur Feststellung der TZR-Expression in $CD8^+$ T-Zellen geeignet ist, jedoch in $CD4^+$ T-Zellen nicht zur Bestimmung der TZR-Expression verwendet werden kann. Es scheint ohne den CD8-Korezeptor zwischen manchen T-Zell-Rezeptoren und dem Streptamer keine ausreichend stabile Bindung zustande zu kommen. Um zu klären, ob

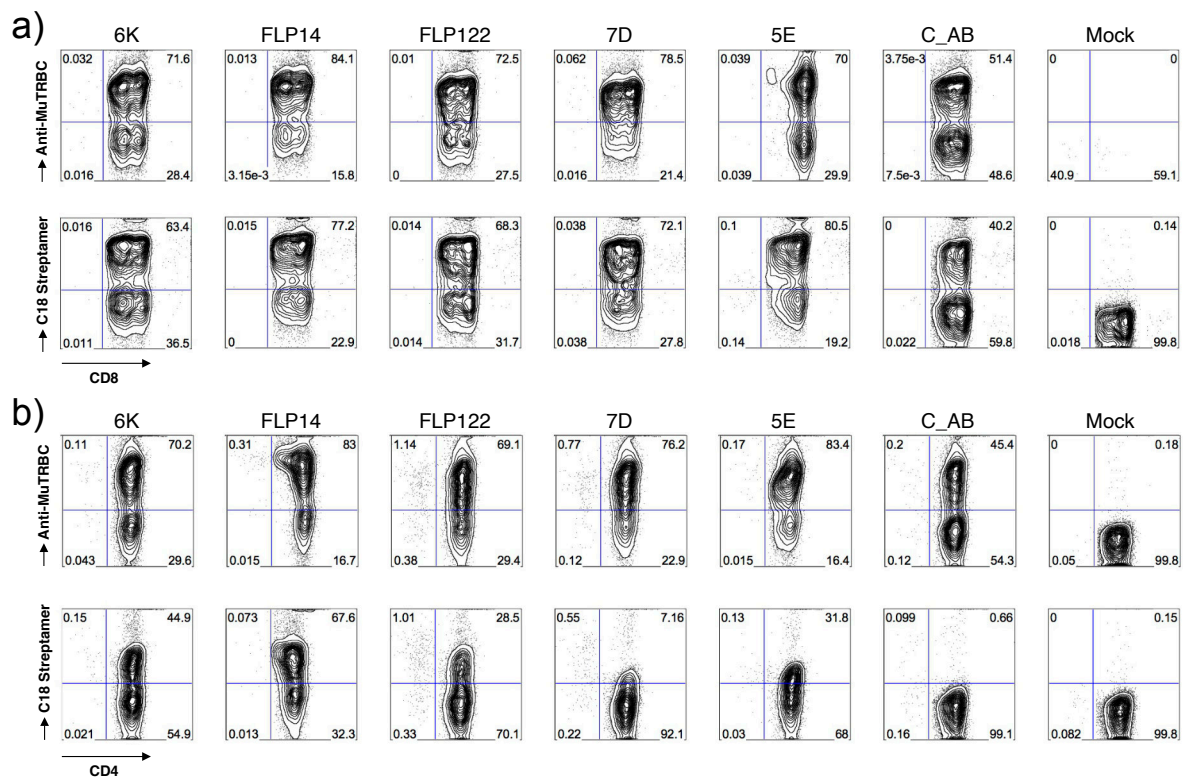


Abb. 2.5.2: Vergleich der TZR-Expression und Streptamerbindung von transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen. Transduzierte C18-spezifische mononukleäre Zellen wurden mittels „magnetic-activated cell sorting“ (MACS) in CD8⁺ bzw. CD4⁺ T Zellen aufgetrennt. Die aufgereinigten C18-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen wurden, jeweils mit dem C18-spezifischen Streptamer oder dem Antikörper gegen die murine konstante Domäne (Anti-muTRBC) sowie Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dot-Plot der a) separierten CD8⁺ bzw. b) CD4⁺ (x-Achse) nach Streptamerfärbung bzw. Antikörperfärbung der murinen konstante der β -Kette (y-Achse) (modifiziert und ergänzt um die Daten der TZR C_AB und S_AB nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

die Unterschiede der Streptamerbindung in Abwesenheit des CD8-Korezeptors auch Auswirkung auf die funktionelle Avidität der transduzierten Zellen haben, erfolgte separat eine funktionelle Analyse transduzierter CD4⁺ T-Zellen bzw. CD8⁺ T-Zellen (siehe nächstes Kapitel). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde zur Überprüfung der Expression der TZR Kettens mittels FACS für die S-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nur noch der anti-muTRBC Antikörper verwendet. Für alle S20- als auch S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren ließ sich eine CD8-unabhängige Expression der TZR-Ketten in humanen CD4⁺ T-Zellen nach Färbung mit dem anti-muTRBC Antikörper nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren erkennt man in Abbildung 2.5.2, dass die Aufreinigung mittels dem CD8⁺ bzw. CD4⁺ T Cell Isolation Kit sehr reine CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell Populationen mit einem zu vernachlässigenden Anteil an Zellen des anderen T-Zell-Typs liefert.

Durch die in dem vorherigen Kapitel beschriebene Optimierung der TZR-Sequenzen und das Einbringen der β - und α -TZR-Ketten eines T-Zell-Rezeptors in denselben retroviralen Vektor konnte die Transduktionsrate in humanen T-Zellen um ein Vielfaches erhöht werden. Zudem wurden alle T-Zell-Rezeptoren CD8 unabhängig auch in CD4⁺ T-Zellen exprimiert, mit allerdings unterschiedlicher Fähigkeit das jeweilige spezifische Streptamer zu binden.

2.6 Funktionelle Charakterisierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen

In Kapitel 2.5 wurde gezeigt, dass alle optimierten T-Zell-Rezeptoren per retroviraler Transduktion in humane T-Zellen eingeführt werden können und eine gute Oberflächenexpression aufweisen. Für alle HBV-Antigene konnte dabei mehr als ein TZR isoliert werden. Für die eventuell spätere medizinische Anwendung und die dafür nötige kostspielige Aufbereitung der TZR-Konstrukte unter den *Good Manufacturing Practice* (GMP) Richtlinien sollte pro Peptid-Spezifität der für die adoptive T-Zell-Therapie am besten geeignete TZR ausgewählt werden. Es erfolgte deswegen eine genauere Untersuchung der T-Zell-Rezeptoren hinsichtlich ihrer funktionellen Avidität wie in den folgenden Kapiteln beschrieben.

In der ersten durchgeführten funktionellen Testung wurden transduzierte CD3⁺ T-Zellen als Effektorzellen verwendet (Daten nicht gezeigt), d.h. CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen wurden zusammen eingesetzt (die verwendeten Effektorzellen stammten aus dem in Abbildung 2.3.1 gezeigten Transduktionsansatz). Für die Einstellung der Effektorzellzahl wurden die Frequenzen von Streptamer⁺ CD3⁺ T-Zellen verwendet. Die Bestimmung der transduzierten CD3⁺ T-Zellen mittels Streptamerbindung war retrospektiv jedoch aufgrund der starken Unterschiede in der Streptamerbindung von TZR⁺ CD4⁺ T-Zellen ungeeignet (siehe Kapitel 2.5), da dadurch nicht alle TZR⁺ CD4⁺ Effektorzellen detektiert wurden. Nichtsdestotrotz konnten wir in diesen Vorversuchen bereits zeigen, dass die Transduktion der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in T-Zellen diese in HBV-spezifische Effektorzellen umwandelte, die spezifisch Zytokine produzierten und Peptid-beladene T2-Zellen sowie HBV-transgene Hepatomazellen abtöteten (Daten nicht gezeigt).

Um die Problematik der unterschiedlichen Streptamerfärbung in den CD4⁺ T-Zellen zu umgehen und unter anderem der Frage nachzugehen, ob die unterschiedliche Streptamerbindung der T-Zell-Rezeptoren in CD4⁺ T-Zellen (s. Kapitel 2.5) mit der funktionellen Avidität korreliert, erfolgte eine zweite ausgiebigere funktionelle Testung der T-Zell-Rezeptoren in CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen getrennt voneinander. Die erhobenen Daten sind in den folgenden Kapiteln dargestellt und wurden mit Ausnahme der Daten bzgl. des TZR C_AB und des TZR S_AB bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht. Zur Einstellung der Effektorzellzahl in der zweiten funktionellen Testung wurden die prozentualen Anteile von CD8⁺ Streptamer⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺ anti-muTRBC⁺ Zellen verwendet, die nach der 2. Transduktion per Durchflusszytometrie bestimmt wurden.

2.6.1 Zytokinproduktion transduzierter HBV-spezifischer T-Zellen

Eine wichtige Eigenschaft einer Effektor-T-Zelle ist die spezifische polyfunktionale Zytokinantwort auf einen adäquaten Reiz. Darunter versteht man die Produktion und Sekretion von mehreren Zytokinen, wobei hier v.a. IFN- γ , TNF- α und IL-2 als wichtige Zytokine im Rahmen der Th1-T-Zell-Antwort zu nennen sind. Zur Überprüfung der Polyfunktionalität erfolgte eine 4 h dauernde Kokultur von TZR⁺ CD8⁺ bzw. TZR⁺ CD4⁺ T-Zellen mit Peptid-beladenen T2-Zellen und eine anschließende intrazelluläre Zytokinfärbung der T-Zellen. Die Zytokinproduktion der T-Zellen wurde in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration untersucht. Hierzu wurden die T-Zellen mit T2-Zellen kokultiviert, die mit absteigenden Peptid-Konzentrationen beladen worden waren.

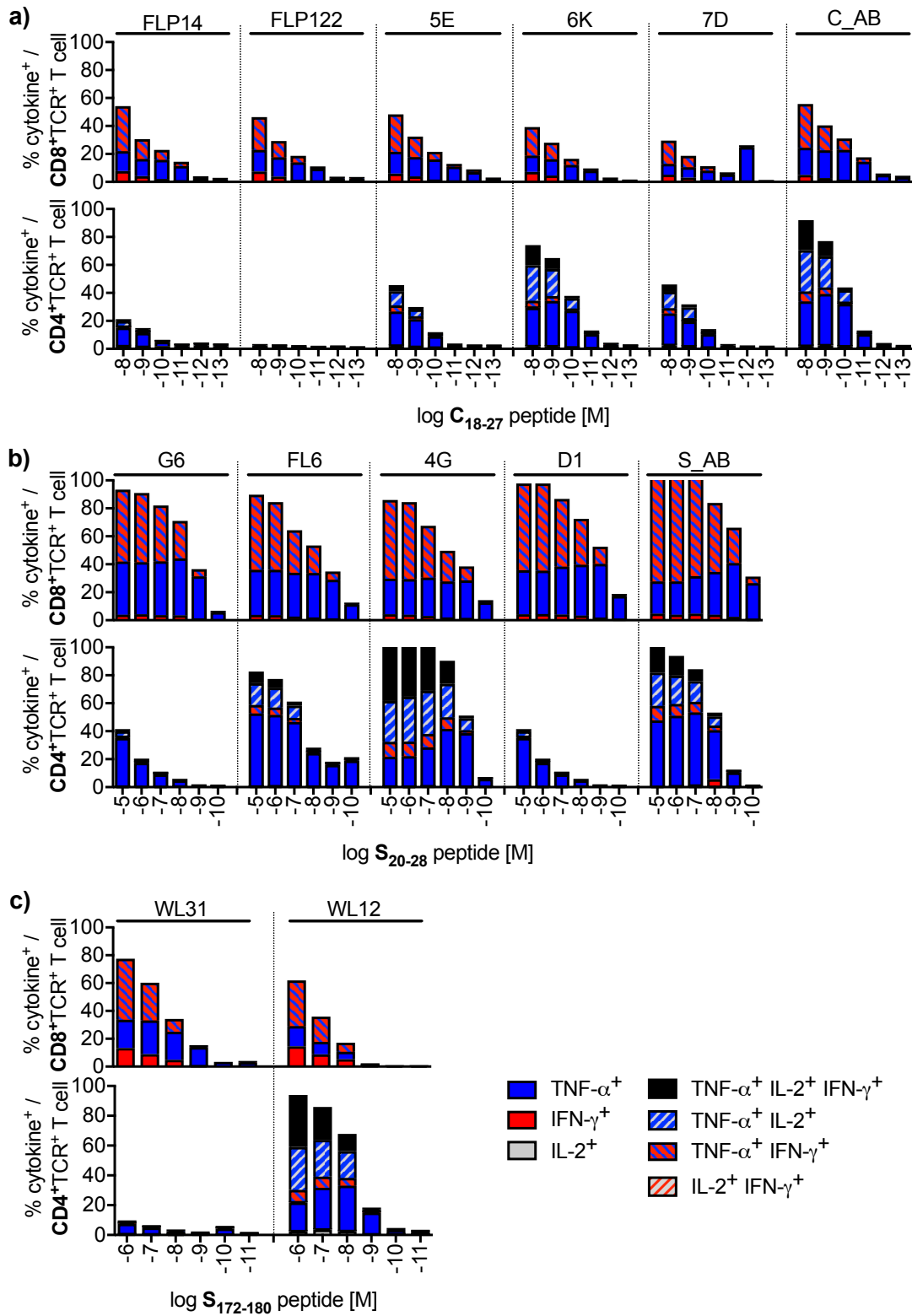


Abb. 2.6.1: Zytokinproduktion von TZR⁺ CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen nach Kokultur mit Peptid-beladenen T2 Zellen. Nach retroviraler Transduktion von T-Zellen erfolgte eine Auftrennung mittels MACS (siehe Kapitel 2.5) in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen. TCR⁺ CD8⁺ T-Zellen wurden mit den entsprechenden Streptameren und die TCR⁺ CD4⁺ T-Zellen mit dem Antikörper anti-muTRBC identifiziert. 1×10^5 T2-Zellen, die mit absteigenden Peptid-Konzentrationen beladen worden waren, wurden für 4 h kokultiviert mit insgesamt 1×10^5 CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, die einen der C18-, S20- oder S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren exprimierten. Zytokin produzierende Zellen wurden mittels intrazellulärer Zytokinfärbung identifiziert und sind als Anteil von den TZR⁺ T-Zellen angegeben. Die Daten wurden für die CD8⁺ T-Zellen als Mittelwerte aus Triplikaten und für die CD4⁺ als Einzelwerte dargestellt (mod. und ergänzt um TZR C_AB und S_AB nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

Die folgenden Daten wurden mit Ausnahme der Daten bzgl. des TZR C_AB und des TZR S_AB bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.

In Abbildung 2.6.1 ist der Anteil der Zytokin-produzierenden Zellen an TZR⁺ CD4⁺ bzw. TZR⁺ CD8⁺ T-Zellen nach Kokultur mit den Peptid beladenen T2-Zellen dargestellt. Alle TZR⁺ CD8⁺ und TZR⁺ CD4⁺ T-Zellen zeigten, abgesehen von den mit den T-Zell-Rezeptoren FLP122 und WL31 transduzierten CD4⁺ T-Zellen, eine mit der Peptidkonzentration abnehmende Zytokinproduktion. Die C18-spezifischen T-Zellen waren im Durchschnitt am sensitivsten, gefolgt von den S20-spezifischen T-Zellen. Die S172-spezifischen T-Zellen zeigten die geringste Sensitivität. Gleichzeitig zeigte sich auch eine konzentrationsabhängige Änderung des Zytokinprofils mit einem kleiner werdenden Anteil an tri- und bifunktionellen T-Zellen hin zu monofunktionellen, vorwiegend TNF- α produzierenden T-Zellen. Die C18-spezifischen transduzierten T-Zellen waren im Durchschnitt am sensitivsten (s. Abb. 2.6.1 a). Etwa 10 % der TZR⁺ CD8⁺ T-Zellen, transduziert mit den T-Zell-Rezeptoren 7D und 5E, produzierten noch bei einer Peptidkonzentration von 1×10^{-12} M TNF- α und waren somit die sensitivsten der C18-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die mit den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren FLP14 und FLP122 transduzierten CD4⁺ T-Zellen wiesen eine deutlich geringere bzw. keine spezifische Zytokinproduktion auf. Für die T-Zell-Rezeptoren 6K und C_AB war im Gegensatz zu den restlichen T-Zell-Rezeptoren der Anteil an Zytokin⁺ CD4⁺ T-Zellen höher als in den CD8⁺ und es war noch eine spezifische Zytokinproduktion bei einer Peptidkonzentration von 1×10^{-11} M mit größer 10 % Zytokin⁺ CD4⁺ T-Zellen zu erkennen.

Die mit den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD8⁺ T-Zellen unterschieden sich in ihrer Zytokinproduktion nur unwesentlich untereinander (s. Abb. 2.6.1 b). Auch bei der niedrigsten Konzentration von 1×10^{-10} M war für alle T-Zell-Rezeptoren eine Zytokinproduktion festzustellen, nur für den TZR G6 dedektierten wir weniger als 10 % TNF- α produzierende T-Zellen. Die mit dem TZR 4G transduzierten CD4⁺ T-Zellen waren die sensitivsten S20-spezifischen Effektorzellen mit auch im Vergleich zu den TZR 4G⁺ CD8⁺ T-Zellen stärkerer polyfunktionaler Zytokinproduktion. So waren bei einer Peptid-Konzentration von 1×10^{-5} M 40 % der CD4⁺ T-Zellen trifunktional, d.h. IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ und IL-2⁺ und bei einer Peptidkonzentration von 1×10^{-9} M produzierten noch über 50 % der T-Zellen Zytokine.

Bei den S172-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (s. Abb. 2.6.1 c) waren die mit dem TZR WL31 transduzierten CD8⁺ T-Zellen mit einer spezifischen Zytokinproduktion bei einer Peptidkonzentration von 1×10^{-9} M sensitiver als die TZR WL12⁺ CD8⁺ T-Zellen. In den CD4⁺ T-Zellen hingegen war für die WL31⁺ CD4⁺ T-Zellen keine Zytokinproduktion festzustellen, wohingegen die mit dem TZR WL12 transduzierten T-Zellen bis zu einer Peptidkonzentration von 1×10^{-9} M Zytokine produzierten und zudem im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen einen größeren Anteil an polyfunktionalen Zellen aufwiesen. Schließlich ist noch anzumerken, dass keine Korrelation zwischen der Zytokinproduktion in den CD8⁺ und den CD4⁺ T-Zellen zu erkennen war.

Zusammenfassend konnte nach Transduktion der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in CD8⁺ T-Zellen nach spezifischer Stimulation eine polyfunktionale Zytokinantwort nachgewiesen werden, ebenso ist für fast alle T-Zell-Rezeptoren eine polyfunktionale Zytokinproduktion nach Transduktion der T-Zell-Rezeptoren in CD4⁺ T-Zellen zu verzeichnen.

2.6.2 Zellvermittelte Zytotoxizität transduzierter HBV-spezifischer T-Zellen

Die Fähigkeit infizierte oder maligne entartete Zielzellen spezifisch zu erkennen und zu eliminieren ist die charakteristische Eigenschaft der zytotoxischen T-Zellen. Dass diese spezifische zellvermittelte Zytotoxizität gegenüber HBV-Peptid-präsentierenden Zellen durch den retroviralen Transfer der isolierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in T-Zellen erreicht werden kann, soll in folgendem Kapitel demonstriert werden. Entscheidend ist dabei nicht nur, ob eine spezifische Lyse der HBV-Peptid präsentierenden Zielzellen durch den T-Zell-Transfer ermöglicht wird, sondern auch, ab welcher Peptid-Konzentration diese auftritt. Man spricht hierbei von der funktionellen Avidität der T-Zelle (siehe Kapitel 1.2.3). Die folgenden Daten wurden mit Ausnahme der Daten bzgl. des TZR C_{AB} und des TZR S_{AB} bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.

Zur Überprüfung der zellvermittelten Zytotoxizität durch transduzierte T-Zellen wurden Chromium-Release-Assays durchgeführt. Dabei werden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom markiert und mit dem entsprechenden Peptid beladen und dann mit den Effektorzellen in einer Kokultur für 4 h zusammengebracht. Aus den getöteten Zielzellen wird das radioaktive Chrom in das Kokulturmedium freigesetzt. Durch Messung der radioaktiven Strahlenintensität des Kokulturmediums ist die Berechnung des prozentualen Anteils der spezifisch lysierten Zielzellen möglich. Um eine Aussage über die Sensitivität bzw. über die funktionelle Avidität der T-Zellen treffen zu können, wurden Kokulturen von den transduzierten T-Zellen mit Peptid-beladenen T2-Zellen angesetzt und die spezifische Lyse bei absteigender Peptid-Konzentration bestimmt. In Abbildung 2.6.2 ist die spezifische Lyse der T2 Zellen durch die transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration aufgetragen. Um die funktionelle Avidität der T-Zell-Rezeptoren besser beschreiben und untereinander vergleichen zu können, wurde als deskriptiver Parameter die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) bzw. die halbmaximale Lyse berechnet (siehe Tabelle 2.6.1). Alle mit den HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen lysierten spezifisch die Zielzellen bis auf die mit dem TZR FLP122 transduzierten CD4⁺ T-Zellen. Die TZR⁺ CD8⁺ T-Zellen waren sensitiver als TZR⁺ CD4⁺ T-Zellen und erreichten auch eine um ca. 20 % höhere Gesamtlyserate als die mit dem gleichen TZR transduzierten CD4⁺ T-Zellen.

Die T-Zellen, die die C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren exprimierten, wiesen die höchste Avidität mit einem Median der EC₅₀-Werte von 0,05 nM in den CD8⁺ und 0,26 nM in den CD4⁺ T-Zellen auf und waren damit um das 10- bis 20-fache sensitiver als die S20- und S172-spezifischen T-Zellen. Unter den C18-spezifischen T-Zellen waren die mit TZR 5E und TZR 7D transduzierten CD8⁺ T-Zellen mit einem EC₅₀-Wert von 0,04 nM am sensitivsten und erkannten Peptidkonzentrationen im pikomolaren Bereich (s. Abb. 2.6.2 a). In den CD4⁺ T-Zellen hingegen waren die TZR 6K⁺ T-Zellen am sensitivsten (EC₅₀ = 0,12 nM), gefolgt von den TZR 5E⁺ T-Zellen (EC₅₀ = 0,23 nM). Für den bereits in den CD8⁺ T-Zellen am wenigsten aviden TZR FLP122 (EC₅₀ = 0,20 nM) konnte in CD4⁺ T-Zellen gar keine Lyse der Zielzellen festgestellt werden. Insgesamt hob sich aber kein C18-spezifischer TZR mit einer deutlich besseren Avidität von den anderen ab.

Die höchste funktionelle Avidität für die S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren konnte erneut für den TZR 4G festgestellt werden (s. Abb. 2.6.2 b). Eingbracht in CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen führte er zur sensitivsten Antwort innerhalb der S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren mit EC₅₀-Werten von 0,34 nM in CD8⁺ bzw. von 0,79 nM in CD4⁺ T-Zellen.

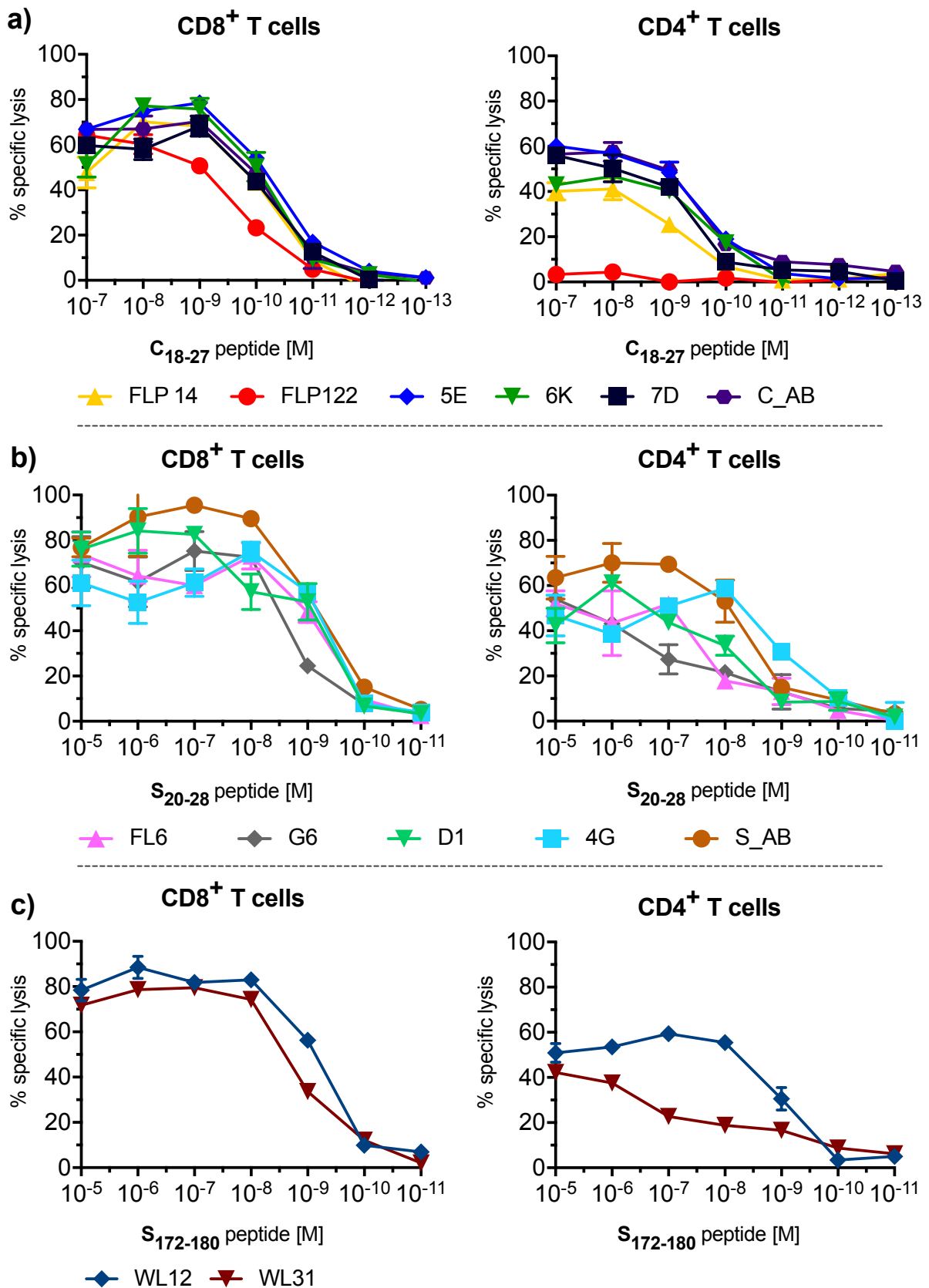


Abb. 2.6.2: Zytotoxizität der mit HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt ist die spezifische Lyse der mit einer sinkenden Peptid-Konzentration beladenen T2 Zielzellen nach Kokultur mit Effektorzellen (Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:1. x-Achse): Konzentration des korrekten Peptids in Molar. a) C18-spezifische T-Zell-Rezeptoren b) S20-spezifische T-Zell-Rezeptoren und c) S172-spezifische T-Zell-Rezeptoren. Jede Farbe steht für einen TZR (siehe jeweils Legenden). Die Daten sind als Mittelwert +/- SEM der Kokultur-Triplikate angegeben (modifiziert und ergänzt um die Daten der TZR C_AB und S_AB nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

TCR	CD8 ⁺ EC ₅₀ (nM)	median (mean)	CD4 ⁺ EC ₅₀ (nM)	median (mean)
FLP 14	0,05	} 0,05 (0,9)	0,68	} 0,26 (0,26)
FLP122	0,20		n.c.	
5E	0,04		0,23	
6K	0,06		0,12	
7D	0,04		0,49	
C_AB	0,05		0,28	
G6	1,69	} 0,68 (0,67)	2924,00	} 4,07 (492,98)
FL6	0,57		25,07	
4G	0,34		0,79	
D1	0,75		4,07	
S_AB	0,68		3,97	
WL31	1,34	} 1,02 (0,68)	7264,00	} 3632,6 (2421,8)
WL12	0,70		1,26	

Tabelle 2.6.1: EC₅₀-Werte der spezifischen Lyse durch HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren nach Transduktion in CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen. Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) beschreibt in diesem Fall die Peptid-Konzentration in nM, bei der die Hälfte der Zielzellen spezifisch lysiert wurde. Bei Bestimmung der spezifischen Lyse von T-Zellen spricht man hier auch von der halbmaximalen Lyse. Mit dem Programm Graphpad Prism wurden mittels nicht linearer Regression Kurven zu den Rohdaten und daraus die EC₅₀-Werte berechnet (Kurven nicht dargestellt). Vereinfacht entspricht dies folgender Formel:

$$EC_{50} = \frac{(\text{maximaler Anteil an lysierten Zielzellen}) - (\text{Anteil an spontanen unspezifisch lysierten Zielzellen})}{2}$$

Ansonsten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren bis auf den TZR G6, der in den CD4⁺ T-Zellen die schwächste Antwort mit einem EC₅₀-Wert von 2924 nM aufwies.

Bei den S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren zeigten sich nach Transduktion in CD8⁺ T-Zellen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich ihrer funktionellen Avidität (s. Abb. 2.6.2 c). In den transduzierten CD4⁺ T-Zellen war sowohl bei der Betrachtung der Kurvenverläufe, als auch der EC₅₀-Werte der TZR WL12 der avidere TZR im Vergleich zu WL31. So war die EC₅₀ des T-Zell-Rezeptoren WL12 in CD4⁺ mit 1,26 nM um das knapp 6000-fache niedriger als die EC₅₀ des T-Zell-Rezeptoren WL31 mit 7264 nM, welches mit dem raschen Abfallen der spezifischen Lyse des TZR WL31 in Abbildung 2.6.1 c übereinstimmt.

Zusammenfassend eliminierten T-Zellen, die mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduziert worden waren, spezifisch Zielzellen, die mit HBV-Peptiden im nanomolaren Bereich beladen worden waren. Dabei wurden nicht nur CD8⁺ T-Zellen in hoch avide HBV-spezifische zytotoxische Effektorzellen umgewandelt, sondern auch CD4⁺ T-Zellen wiesen eine zytotoxische Effektorantwort auf, wenn auch geringer als in den CD8⁺ T-Zellen.

2.6.3 Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden

In den letzten Kapiteln konnte gezeigt werden, dass der Transfer der isolierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in T-Zellen sowohl zu einer polyfunktionalen als auch zytotoxischen T-Zell-Antwort führt. Die Zielzellen waren dabei immer TAP-defiziente T2-Zellen, welche mit synthetisierten HBV-Peptiden beladen worden waren und eine hohe HLA-A*02:01 Expression aufwiesen. Um zu überprüfen, ob die verwendeten HBV-Peptide in HBV-infizierten Zellen mittels endogener

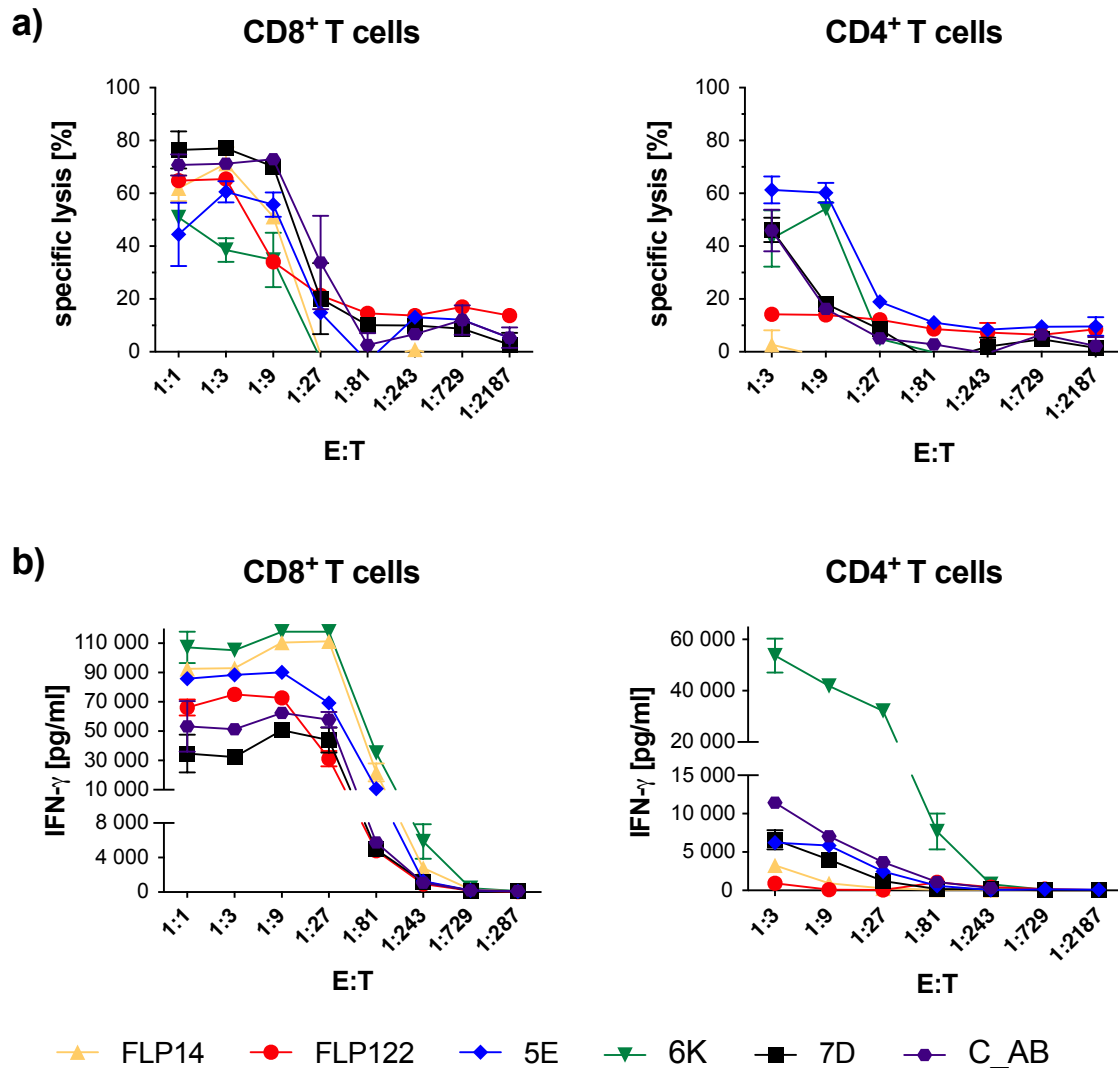


Abb. 2.6.3: Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch transduzierte C18-spezifische CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen. Die C18-spezifischen transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen wurden mit abnehmenden Effektor- zu Zielzellverhältnissen mit HBV⁺ HepG2.2.15 bzw. HBV⁻ HepG2 (Daten nicht gezeigt) für 72 h inkubiert. Zuvor waren die Hepatomazelllinien für einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen ausdifferenziert worden. a) Anschließend wurde die spezifische Lyse der Hepatomazellen indirekt über einen XTT-Assay bestimmt und b) aus den Kokulturüberständen ein IFN- γ -ELISA durchgeführt. Die x-Achse gibt das Effektor-(TZR⁺ CD8⁺ bzw. TZR⁺ CD4⁺ T-Zellen) zu Zielzellverhältnis an. Farbkodierung der T-Zell-Rezeptoren siehe Legende. Es sind die Mittelwerte mit +/- SEM der Kokultur-Triplicate angegeben (modifiziert und ergänzt um die Daten des TZR C_AB nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

Prozessierung auf dem HLA-A2-Komplex präsentiert werden und durch HBV-spezifische T-Zellen erkannt werden, wurde eine Kokultur der transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen mit der Hepatomazelllinie HepG2.2.15 durchgeführt. Aufgrund der Integration des HBV-Genoms produziert die HepG2.2.15 Zelllinie infektiöses HBV, des Weiteren ist sie HLA-A*02:01⁺ (Sells et al., 1987). Neben der endogenen Prozessierung der HBV-Proteine und Beladung des MHC I, spiegelt dieses Modell im Vergleich zu den T2-Zellen die geringere MHC-I- bzw. Peptid-MHC-I-Konzentration an der Zelloberfläche von Leberzellen besser wieder. Die Hepatomazelllinie HepG2, in der kein HBV repliziert wird, wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach 72 h wurde die Kokultur beendet und die Viabilität der Hepatomazellen mit Hilfe des XTT-Tests bestimmt, aus der dann indirekt der Prozentsatz an spezifisch lysierten Hepatomazellen berechnet wurde. Die folgenden Daten zur HepG2/HepG2.2.15 Kokultur wurden mit Ausnahme der Daten bzgl. des TZR C_AB und des TZR S_AB bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.

Es wurde für alle C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren eine spezifische Lyse von HBV⁺ HepG2.2.15 Zellen und eine deutliche IFN- γ -Sekretion nach Transduktion der Rezeptoren in CD8⁺ T-Zellen festgestellt (s. Abb. 2.6.3). Im Vergleich mit den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren (s. Abb. 2.6.4) waren die C18-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sensitiver. Die C18-spezifischen CD8⁺ T-Zellen produzierten zwischen 1000–6000 pg/ml bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:243, während die S20-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nur bis zu einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:81 eine vergleichbar hohe IFN- γ -Produktion sezernierten. Die mit den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren 5E, 7D, FLP122 sowie C_AB transduzierten CD8⁺ T-Zellen lysierten bis zu einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:27 und maximal zwischen 60–80 % Zielzellen (s. Abb. 2.6.3 a). Die mit dem TZR 6K transduzierten CD8⁺ T-Zellen führten zur schwächsten zytotoxischen Antwort in den C18-spezifischen T-Zellen (s. Abb. 2.6.3 a), allerdings produzierten sie am meisten IFN- γ (s. Abb. 2.6.3 b). Für die T-Zell-Rezeptoren FLP122 und FLP14 transduziert in CD4⁺ T-Zellen konnte keine spezifische Lyse oder Zytokinproduktion nach Kokultur mit den HepG2.2.15 Hepatomazellen erreicht werden. T-Zellen, die mit den T-Zell-Rezeptoren 6K und 5E transduziert wurden, lysierten bis zu einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:9 60 % der Zielzellen und wiesen somit die beste zytotoxische Antwort unter den C18-spezifischen CD4⁺ T-Zellen auf (s. Abb. 2.6.3 a). Am meisten IFN- γ produzierten ebenfalls die mit dem TZR 6K transduzierten CD4⁺ T-Zellen, die bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:81 über 7500 pg/ml IFN- γ produzierten. Sie produzierten damit mehr als das fünffache an IFN- γ als die anderen C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren. In der Kokultur mit den HepG2-Zellen als Negativkontrolle konnte sowohl für die CD8⁺ als auch die CD4⁺ T-Zellen keine spezifische Lyse und auch keine vermehrte IFN- γ -Sekretion im Überstand detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Bei den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren war im XTT-Assay eine dosisunabhängige Hintergrundlyse sowohl in der Kokultur mit den HepG2.2.15 (s. Abb. 2.6.4 a) als auch mit den HepG2 (Daten nicht gezeigt) zu verzeichnen. Da keine unspezifische IFN- γ -Produktion vorlag, ist der Hintergrund nicht durch eine T-Zell-Aktivierung sondern am ehesten im Rahmen eines technischen Fehlers oder einer anderweitigen Beeinträchtigung der Viabilität der Zielzellen zu erklären (s. Abb. 2.6.4 b). Die mit den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD8⁺ T-Zellen erreichten eine spezifische Lyse von ca. 80–90 % der HBV⁺ Hepatomazellen. Bei einem Effektor:Zielzell-Verhältnis

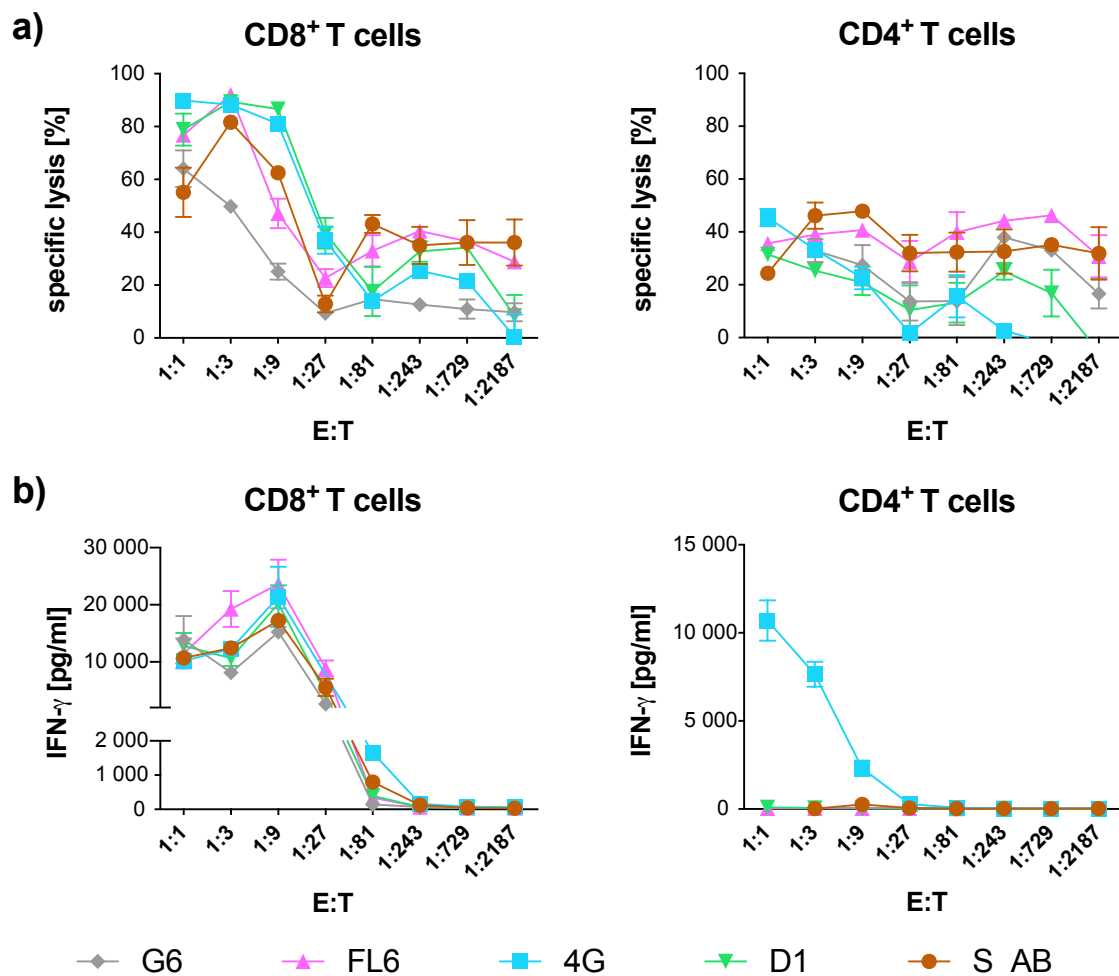


Abb. 2.6.4: Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch transduzierte S20-spezifische CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen. Transduzierte CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen wurden in unterschiedlichen Effektor- zu Zielzellverhältnissen mit HBV⁺ HepG2.2.15 bzw. HBV⁻ HepG2 für 72 h inkubiert. a) Nach 72 h wurde die spezifische Lyse der Hepatomazellen indirekt über einen XTT-Assay bestimmt und b) aus den Kokulturüberständen ein IFN- γ -ELISA durchgeführt. Farbkodierung der T-Zell-Rezeptoren siehe Legende. Es sind die Mittelwerte mit +/- SEM der Kokultur-Triplikate angegeben (modifiziert und ergänzt um die Daten des TZR S_AB nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

von 1:9 wiesen nur noch die CD8⁺ T-Zellen, die mit den T-Zell-Rezeptoren 4G und D1 transduziert worden waren, eine spezifische Lyse über 80 % der Zielzellen auf und waren somit die sensitivsten S20-spezifischen T-Zellen (s. Abb. 2.6.4 a). Bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:81 sezernierten die mit dem TZR 4G transduzierten CD8⁺ T-Zellen über 1500 pg/ml, während die mit den restlichen S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten T-Zellen unter 1000 pg/ml IFN- γ sezernierten (s. Abb. 2.6.4 b). Für die S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in CD4⁺ T-Zellen war keine spezifische Lyse der HepG2.2.15 zu erkennen, möglicherweise aufgrund einer zu hohen Hintergrundlyse. Betrachtet man die IFN- γ -ELISA Ergebnisse wurden zumindest die mit dem TZR 4G transduzierten CD4⁺ T-Zellen bis zu einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:9 aktiviert und produzierten maximal bis zu 10000 pg/ml IFN- γ (s. Abb. 2.6.4 b).

In der Kokultur der HepG2.2.15 mit den transduzierten S172-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnte keine spezifische Lyse festgestellt werden (s. Abb. 2.6.5 a). Im IFN- γ -ELISA zeigte sich eine

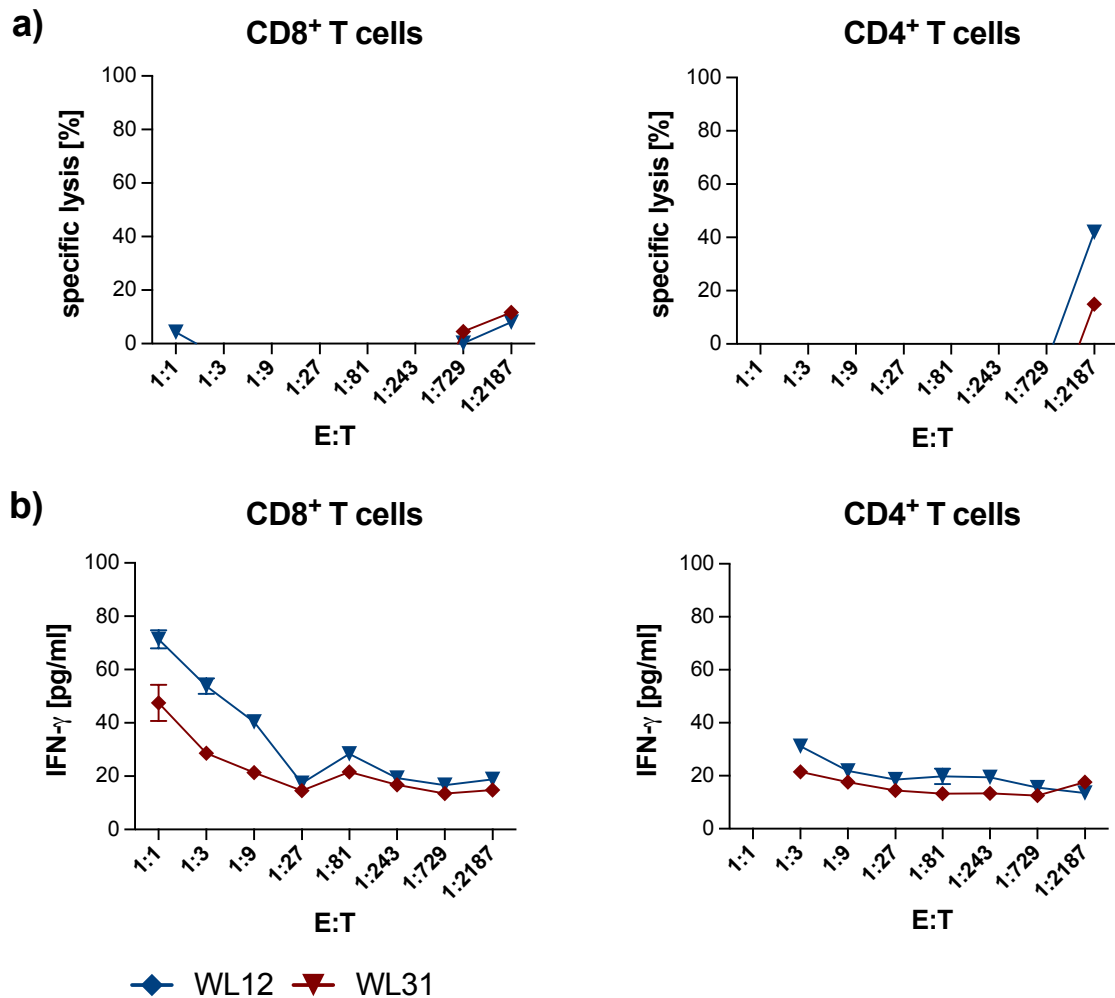


Abb. 2.6.5: Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch transduzierte S172-spezifische CD8⁺ bzw. CD4⁺-Zellen T-Zellen. Transduzierte CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen wurden in unterschiedlichen Effektor- zu Zielzellverhältnissen mit HBV⁺ HepG2.2.15 bzw. HBV⁻ HepG2 (Daten nicht gezeigt) für 72 h inkubiert. a) Nach 72 h wurde die spezifische Lyse der Hepatomazellen indirekt über einen XTT-Assay bestimmt und b) aus den Kokulturüberständen eines IFN- γ -ELISA durchgeführt. Farbkodierung der T-Zell-Rezeptoren siehe Legende. Es sind die Mittelwerte mit +/- SEM der Kokultur-Triplicate angegeben (modifiziert nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

geringe Erhöhung von IFN- γ bis zu einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:9 (s. Abb. 2.6.5 b). Diese war im Vergleich zu den IFN- γ -Konzentrationen, die in den Kokulturen mit den C18 bzw. S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren gemessen wurde, minimal, sodass eine geringfügige Aktivierung der S172-spezifischen T-Zellen nicht auszuschließen ist, aber nicht für eine adäquate Effektorantwort mit spezifischer Lyse der Zielzellen reichte.

Zur Klärung, ob nur in der HepG2.2.15-Kokultur das S172-Peptid nicht erkannt wurde oder ob es generell in humanen Hepatozyten nicht zu einer ausreichenden Präsentation des S172-Peptids kommt, kokultivierten wir T-Zellen mit der humanen Hepatomalinie HepaRG und überprüften anschließend die Viabilität der HepaRG-Zellen mittels XTT und bestimmten die IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA (s. Abb. 2.6.6). Da HepaRG nicht HLA-A*02:01⁺ sind, wurde durch Christina Dargels aus unserem Labor eine HLA-A*02:01⁺ HepaRG-Zelllinie per retroviraler Transduktion geschaffen. Die folgenden Daten wurden noch nicht veröffentlicht. Als Effektorzellen wurden humane CD3⁺ T-Zellen benutzt, die mit den drei T-Zell-Rezeptoren 5E, 4G und WL12 transduziert

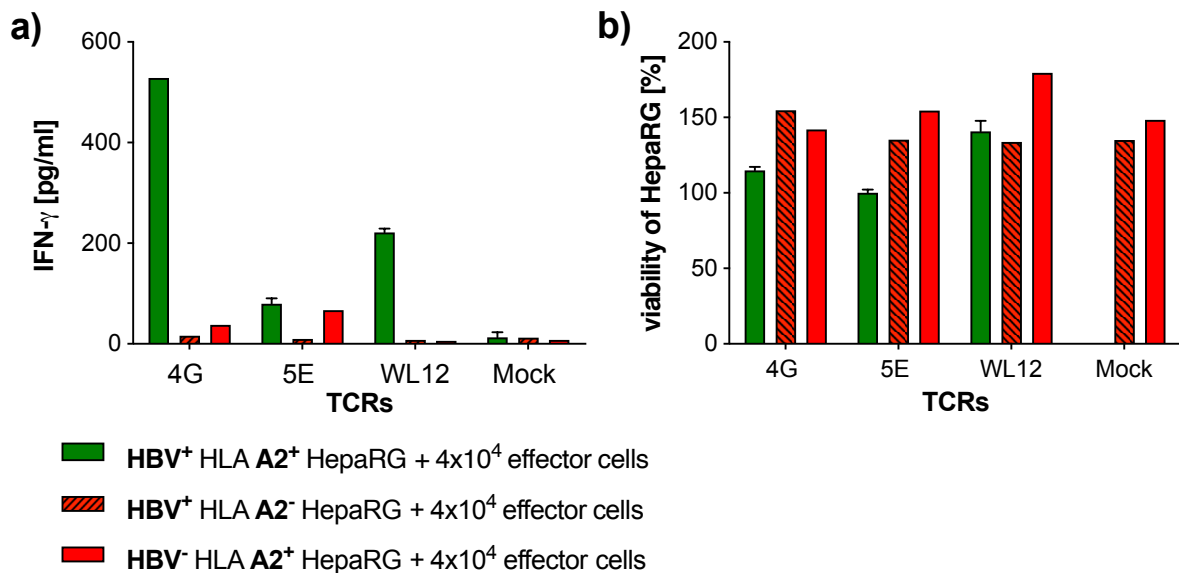


Abb. 2.6.6: Erkennung von HBV-infizierten Zellen durch HBV-spezifische TZR-transduzierte T-Zellen. HepaRG-Zellen wurden nach Ausdifferenzierung mit HBV infiziert. Nach weiteren 20 Tagen wurden HBV-infizierte HLA-A*02:01⁺ HepaRG-Zellen mit CD3⁺ T-Zellen, welche mit den drei T-Zell-Rezeptoren 5E, 4G und WL12 zuvor transduziert worden waren, für 72 h in einer Kokultur angesetzt. Pro TZR wurden 4×10^4 TZR⁺ CD3⁺ Effektorzellen mit HLA-A*02:01⁺ HBV infizierten (HBV⁺) HepaRG-Zellen kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten HBV⁺ HLA-A*02:01⁻ bzw. HBV⁻ HLA-A*02:01⁺ HepaRG-Zellen. Nach 24 h wurde Überstand für einen IFN- γ -ELISA abgenommen (a) und nach 72 h wurde die Viabilität der XTT-Assay durchgeführt (b). Es sind die Mittelwerte +/- SEM der Kokultur-Triplikate angegeben mit Ausnahme für den TZR 4G bei dem pro Kokultur nur ein Unikat angesetzt worden war.

worden waren. Die IFN- γ -Konzentration war nach 24 h Kokultur für den S20-spezifischen TZR 4G und den S172-spezifischen TZR WL12 im Vergleich zu den Negativkontrollen erhöht, für den C18-spezifischen TZR 5E zeigte sich kein eindeutiger Unterschied zur Negativkontrolle (s. Abb. 2.6.6 a). In einem XTT-Assay nach 72 h ist allerdings keine Reduktion in der Viabilität der mit HBV infizierten Zielzellen nach Kokultur mit den Effektorzellen zu erkennen (s. Abb. 2.6.6 b). Dies ist wahrscheinlich durch die geringe Anzahl an HBV-infizierten HepaRG zu erklären. In Anbetracht der geringen Infektionsrate ist die Sekretion von IFN- γ für die TZR 4G und WL12 am ehesten im Rahmen einer spezifischen T-Zell-Aktivierung zu sehen und weist somit daraufhin, dass auch das S172-Peptid per endogener Prozessierung auf dem HLA-A*02:01 Molekül präsentiert wird, allerdings nur in HepaRG-Zellen und nicht in HepG2.2.15. In einer erneuten Wiederholung der Kokultur mit HBV-infizierten HepaRG konnte Karin Wisskirchen die Erkennung des S172-Peptid und damit die endogene Prozessierung in HepaRG erneute bestätigen und auch eine Aktivierung von T-Zellen, die mit dem TZR 5E transduziert waren, nach Kokultur mit HBV⁺ HepaRG nachweisen (Wisskirchen et al., 2017).

2.6.4 Vergleich der MHC-Restriktion der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Bei der Verwendung natürlicher T-Zell-Rezeptoren in der adoptiven T-Zell-Therapie ist ein limitierender Faktor die MHC-Restriktion. In unserem Fall wurden die T-Zell-Rezeptoren aus HLA-A*02:01⁺ Kaukasiern gewonnen, da dies in der europäischen Bevölkerung einer der häufigsten HLA-Moleküle ist und somit unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren für viele europäische Patienten zur Verfügung stehen würden. In anderen Regionen mit höherer HBV-Prävalenz, wie

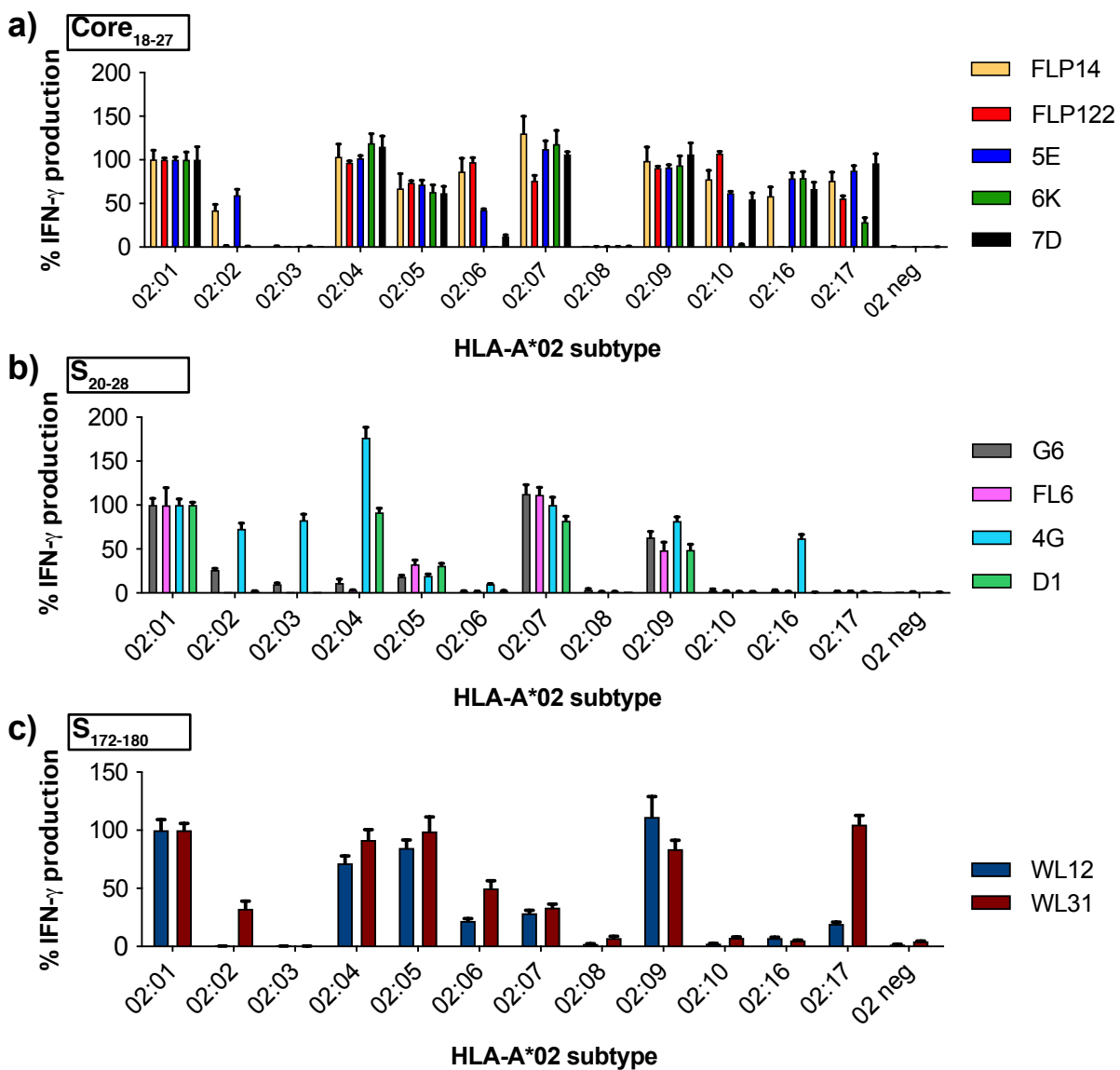


Abb. 2.6.7: Erkennung von unterschiedlichen HLA-A*02-Subtypen durch die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren. Dazu wurden für die a) C18-spezifischen b) S20-spezifischen und c) S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren Kokulturen mit den 12 lymphoblastoiden Zelllinien, die unterschiedliche HLA-A*02-Subtypen exprimieren, angesetzt. Die lymphoblastoiden Zellen wurden mit 1 μ M des jeweiligen spezifischen HBV-Peptids beladen und mit 2×10^4 transduzierten CD8⁺ T-Zellen bei einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 1:1 inkubiert. Nach 4-stündiger Kokultur wurde aus dem Überstand die IFN- γ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Da alle HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren aus HLA-A*02:01⁺ Spendern isoliert worden waren, wurde zur besseren Vergleichsmöglichkeit, pro TZR die IFN- γ -Sekretion der jeweiligen HLA-A2-Subtypen ins prozentuale Verhältnis zur IFN- γ -Sekretion der HLA-A*02:01⁺ LCL gesetzt (siehe y-Achse). Auf der x-Achse sind die HLA-A2-Subtypen angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten dargestellt (modifiziert nach Wisskirchen, Metzger et al., 2017).

z.B. Asien oder Afrika ist HLA-A*02:01 allerdings weniger häufig, stattdessen sind z.B. in Asien die HLA-A*02-Subtypen A*02:03, A*02:06 und A*02:07 häufiger vertreten. Es wäre daher von Vorteil, wenn ein TZR das spezifische HBV-Peptid auf möglichst vielen unterschiedlichen HLA-A2-Subtypen erkennt, um potentiell bei vielen Menschen verwendet werden zu können.

Es standen uns zwölf lymphoblastoide Zelllinien (LCL) mit unterschiedlichen HLA-A2-Subtypen zur Verfügung, welche mit den HBV-Peptiden beladen wurden und anschließend mit den HBV-spezifischen transduzierten CD8⁺ T-Zellen für 72 h inkubiert wurden. Aus dem Überstand der Kokultur wurde anschließend die IFN- γ -Konzentration mittels ELISA bestimmt und in Relation zu der IFN- γ -Konzentration der entsprechenden Kokultur mit der HLA-A*02:01⁺ LCL gesetzt. Die folgenden Daten bezüglich der LCL-Kokultur wurden bereits in Wisskirchen, Metzger et al., 2017 veröffentlicht.

Auf den HLA-A*02-Subtypen A*02:01, A*02:04, A*02:05, A*02:07 und A*02:09 präsentiert, wurde das C18-Peptid von allen transduzierten C18-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt (s. Abb. 2.6.7 a). Von den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren deckten die T-Zell-Rezeptoren 5E und FLP14 mit der Erkennung des C18-Peptids auf 10 von 12 HLA-Subtypen am meisten HLA-A2-Subtypen ab. Des Weiteren wurde das C18-Peptid auf 8/12 HLA-A2-Subtypen durch die T-Zell-Rezeptoren FLP122 und 7D und auf 7/12 durch den TZR 6K erkannt. Für die S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren war die durchschnittliche Erkennungsrate der HLA-A*02-Subtypen mit im Mittel 5 HLA-Subtypen pro TZR geringer als bei den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren mit im Mittel 8 HLA-Subtypen pro TZR. Von allen vier S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurde das S20-Peptid nur auf den HLA-A*02-Subtypen A*02:01, A*02:05, A*02:07 und A*02:09 erkannt (s. Abb. 2.6.7 b). Der TZR 4G erkannte das S20-Peptid auf 8/12 der HLA-A2-Subtypen und war damit nicht nur funktionell, sondern auch in der HLA-A2-Subtypen-Erkennung, der beste S20-spezifische TZR. Zugleich war die TZR 4G auch der einzige HBV-spezifische TZR der ein HBV-Peptid auf der A*02:03⁺ lymphoblastoiden Zelllinie erkannte. Die mit den T-Zell-Rezeptoren G6 und D1 transduzierten T-Zellen erkannten das S20-Peptid auf 5/12 HLA-A2-Subtypen und der TZR FL6 auf 4/12 HLA-A2-Subtypen. Das S172-Peptid wurde von dem TZR WL31 auf 8/12 HLA-A2-Subtypen und vom TZR WL12 auf 7/12 HLA-A2-Subtypen erkannt, dabei wurden sieben HLA-A2-Subtypen A*02:01, A*02:04, A*02:05, A*02:06, A*02:07, A*02:09 und A*02:17 von beiden erkannt (s. Abb. 2.6.7 c). Der TZR WL31 erkannte zusätzlich noch A*02:02⁺ Zellen.

Zusammengefasst wurden bis auf den HLA-Subtyp A*02:08 alle getesteten HLA-A2-Subtypen durch mindestens einen unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannt und riefen eine spezifische IFN- γ -Sekretion hervor (s. Abb. 2.6.8 c).

Um besser einschätzen zu können, wieviele Menschen unter Beachtung der HLA-Restriktion weltweit gesehen für eine T-Zell-Therapie mit unseren HBV-spezifischen T-Zell potentiell geeignet wären, wurde die Häufigkeit und das Vorkommen der von unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannten HLA-A2-Subtypen in verschiedenen Populationen bestimmt (s. Abb. 2.6.8 a-c). Es wurde hierzu mittels des „*population coverage*“ Analysetools (Bui et al., 2006) von der Website www.iedb.org (IEDB, 2020) für verschiedene Populationen berechnet, welcher prozentuale Anteil der entsprechenden Population potentiell mindestens einen HLA-A2-Subtyp trägt, der von mindestens einem unserer T-Zell-Rezeptoren erkannt wird (siehe Kapitel 5.9). Dieser Wert wird als „*population*

coverage“ bezeichnet. Die folgenden Daten, wenn nicht anders angegeben, sind zuvor noch nicht veröffentlicht worden.

In Abbildung 2.6.8 a ist dabei für verschiedene Weltregionen dargestellt, wie hoch der prozentuale Anteil an der Population in der entsprechenden Weltregion ist, der mindestens HLA-A2-Subtyp besitzt, der von einem unserer T-Zell-Rezeptoren erkannt wird. In Abbildung 2.6.8 b ist die Genotypenfrequenz der einzelnen HLA-A2-Subtypen in den Weltregionen dargestellt. Weltweit gesehen weisen nach der Analyse somit 44% der Weltbevölkerung einen HLA-A2-Subtyp auf, der durch mindestens einen unserer T-Zell-Rezeptoren erkannt wird (s. Abb. 2.6.8 a).

Die C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren FLP14 und 5E decken mit der Erkennung von 8 HLA-Subtypen bereits 43,6% der Weltbevölkerung ab (s. Abb. 2.6.8 a und c). Von den S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren ist der TZR WL31 durch die zusätzliche Erkennung des HLA-A*02:02 -Subtyps mit 43,5% der Beste. Bei den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren deckt der Rezeptor 4G durch die zusätzliche Erkennung der HLA-Subtypen A*02:03 und A*02:16 im Vergleich zu den anderen S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren 42,7% der Weltbevölkerung ab (s. Abb. 2.6.8 a und c).

Wenn man die Weltregionen vergleicht, ist in Europa und Nordamerika der prozentuale Bevölkerungsanteil, der geeignet für eine adoptive T-Zell-Therapie mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wäre, mit im Durchschnitt 48,5% bzw. 44% am höchsten. Dabei gibt es auch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen T-Zell-Rezeptoren in diesen Regionen. In Ozeanien und Südafrika tragen hingegen im Durchschnitt nur 15% der Bevölkerung einen HLA-A2-Subtypen, der durch unsere T-Zell-Rezeptoren erkannt wurde (s. Abb. 2.6.8 a). Für Afrika schneiden die T-Zell-Rezeptoren am besten ab, die A*02:02 erkennen, d.h. die T-Zell-Rezeptoren FLP14, 5E, G6, 4G und WL31 (s. Abb. 2.6.8 a und b). In Nordost- und Südostasien sind die HLA-A*02:03, A*02:06 und A*02:07 im Vergleich zu anderen Weltregionen vermehrt vorhanden. Der Rezeptor 4G kann durch Erkennung des HLA-A*02:03 in den Weltregionen Nordost- und Südostasien den größten Bevölkerungsanteil abdecken. An zweiter Stelle stehen die C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren FLP14, FLP122 und 5E und die S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren, die im Vergleich zu den anderen HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren den A*02:06 Subtyp erkennen (s. Abb. 2.6.8 a und b). Auch in Ostasien (Mongolei, Japan und Südkorea) ist die Erkennung der HLA-Subtypen A*02:06 von Bedeutung. Durch dessen Erkennung könnten die T-Zell-Rezeptoren FLP14, FLP122, 5E sowie WL12 und WL31 in ca. 10% mehr Menschen theoretisch eingesetzt werden. Der HLA-Subtyp HLA-A*02:03 scheint hier weniger relevant zu sein (s. Abb. 2.6.8 a und b).

Zusammenfassend wären nach diesen Berechnungen über 40% der Weltbevölkerung mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren behandelbar, würde eine Infektion mit einem erkannten HBV-Genotyp vorliegen. Selbst in Weltregionen in denen HLA-A*02:01 nicht so häufig wie in Europa und Nordamerika vorhanden ist, kann durch die zusätzliche Erkennung der getesteten HLA-A*02-Subtypen ein beträchtlicher Teil der Populationen theoretisch mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren behandelt werden.

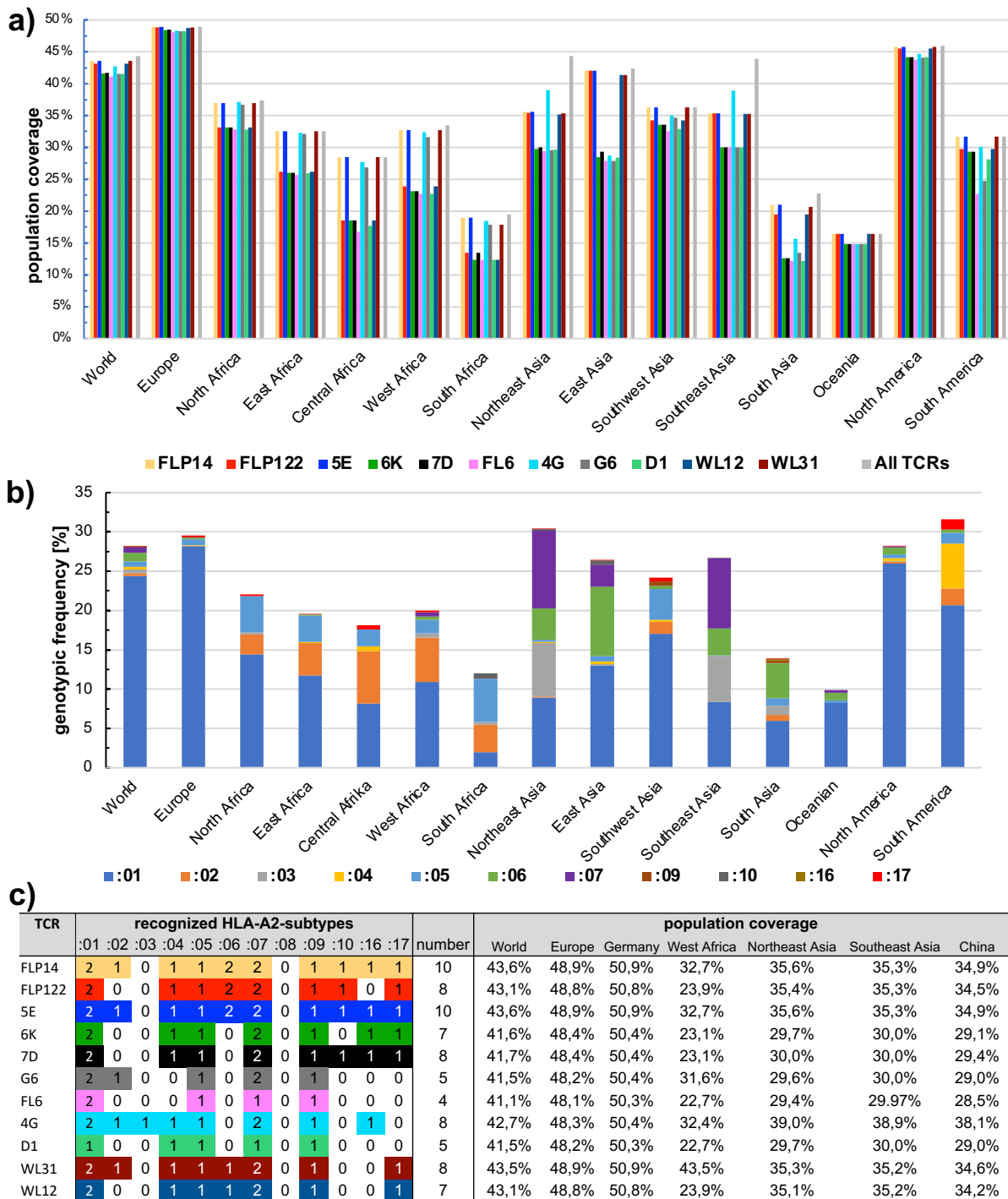


Abb. 2.6.8: Häufigkeit und Vorkommen der von unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannten HLA-A2-Subtypen in der Weltbevölkerung. Mit dem Analysetool „population coverage“ der Website www.iedb.org (Bui et al., 2006) wurde für verschiedene Populationen berechnet, welcher prozentuale Anteil der Bevölkerung mindestens einen HLA-A2-Subtyp trägt, der von mindestens einem unserer T-Zell-Rezeptoren erkannt wird und somit potentiell für eine T-Zell-Therapie infrage kommen könnte, sollte eine chronische Hepatitis B Infektion mit einem erkannten Genotyp vorliegen. a) Darstellung des prozentualen Anteils der Bevölkerung innerhalb von Weltregionen, die mindestens einen HLA-A2-Subtyp besitzen, der durch den jeweiligen HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt wird. b) Darstellung der Genotypenfrequenz (%) der einzelnen HLA-A2-Subtypen in den jeweiligen Weltregionen (Daten aus Analysetool „population coverage“ der Website www.iedb.org). c) Tabellarische Darstellung der HLA-A2-Subtypen, die von einem TZR erkannt werden und der prozentuale Anteil pro Bevölkerungspopulation, der mindestens einen der aufgeführten HLA-A2-Subtypen trägt. 1 = TZR erkennt entsprechendes HBV-Peptid der zwei Genotypen A/D auf HLA-Subtyp, 2 = TZR erkennt zusätzlich die entsprechende Peptid-Varianten (C18: FLPSPDFPSI, S20: FLLTKILTI, S172: WLSLLVQFV) auf dem HLA-Subtyp (Daten aus Wisskirchen et al., 2017 übernommen), 0 = HLA-Subtyp wird nicht erkannt.

2.6.4.1 Kalkulation der Anzahl von potentiell mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren therapierbaren chronisch HBV-Infizierten

Um eine genauere Vorstellung hinsichtlich der Anzahl von Patienten mit einer chronischen Hepatitis B (CHB) zu erhalten, die mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren behandelt werden könnten, wurde ergänzend eine Modellrechnung durchgeführt. In dieser wurde die Häufigkeit der zur Erkennung notwendigen HLA-Subtypen sowie die HBV-Genotypen-Verteilung unter chronisch HBV-Infizierten pro Land mit einbezogen. Die folgenden Daten sind noch nicht veröffentlicht worden.

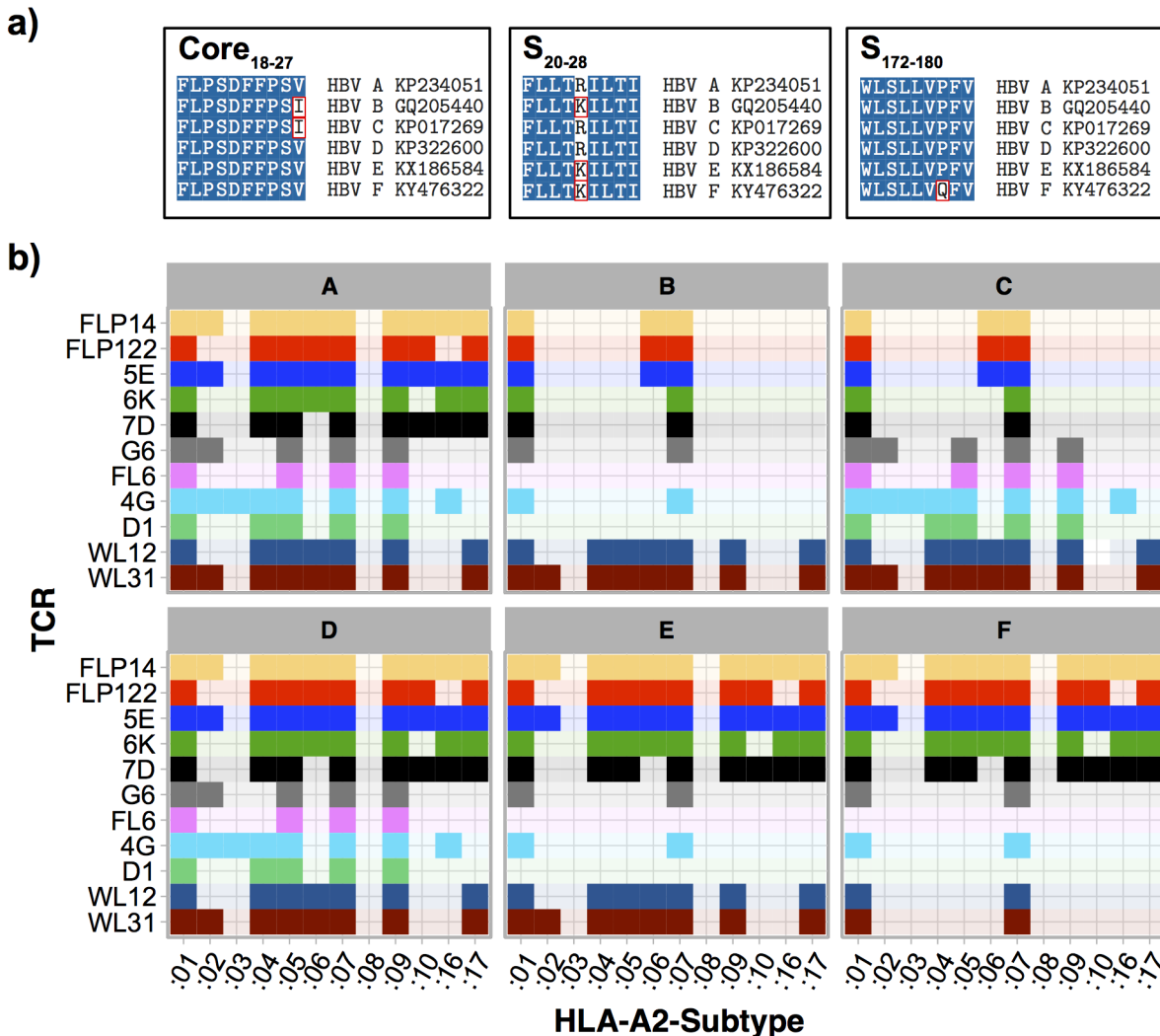


Abb. 2.6.9: Erkennung von HBV-Genotypen auf HLA-A2-Subtypen. Es liegen genotypische Variationen in der Peptidsequenz der HBV-Peptide C18, S20 und S172 vor (Desmond et al., 2008). In a) ist ein Alignment der als Referenz verwendeten Peptidsequenzen der HBV-Genotypen A-F für die Peptide C18, S20 und S172 mit Angabe der Genbank Accession Number aufgeführt. Die AS, die sich vom Genotyp A/D unterscheiden, sind rot markiert. Basierend auf den experimentellen Ergebnissen aus Kapitel 2.6.4 und den von Karin Wisskirchen ergänzten Untersuchungen hinsichtlich der Erkennung der Peptid-Varianten (C18: FLPSDFFPST, S20: FLLTKILTI, S172: WLSLLVQFV) (Wisskirchen et al., 2017) ist in b) pro Genotyp (hellgraue Kästchen) aufgeführt, auf welchen HLA-Subtypen die TZR-Rezeptoren die HBV-Peptid-Varianten erkennen (farbig markierte Quadrate).

Die Miteinbeziehung der HBV-Genotypen ist notwendig, da für die verwendeten Epitope (C18, S20 und S172) genotypische Variationen und Polymorphismen in der Peptidsequenz vorliegen und damit die Erkennung des Peptids eingeschränkt sein kann (Desmond et al., 2008). Zudem gibt es deutliche

Unterschiede in der geographischen Verteilung der HBV-Genotypen (Velkov et al., 2018). Es wurden die Genotypen A-F mit einbezogen, die weltweit gesehen ca. 97% aller HBV-Infektionen ausmachen (Velkov et al., 2018). Die in Abb. 2.6.9 a) abgebildeten Peptidsequenzen der Genotypen A–F für die Peptide C18, S20 und S172 wurden als Referenz verwendet, seltenere Polymorphismen wurden nicht beachtet. Basierend auf den Referenzsequenzen wurde dann pro Genotyp festgestellt, welche HLA-Subtypen durch mindestens einen TZR erkannt werden (s. Abb. 2.6.9 b).

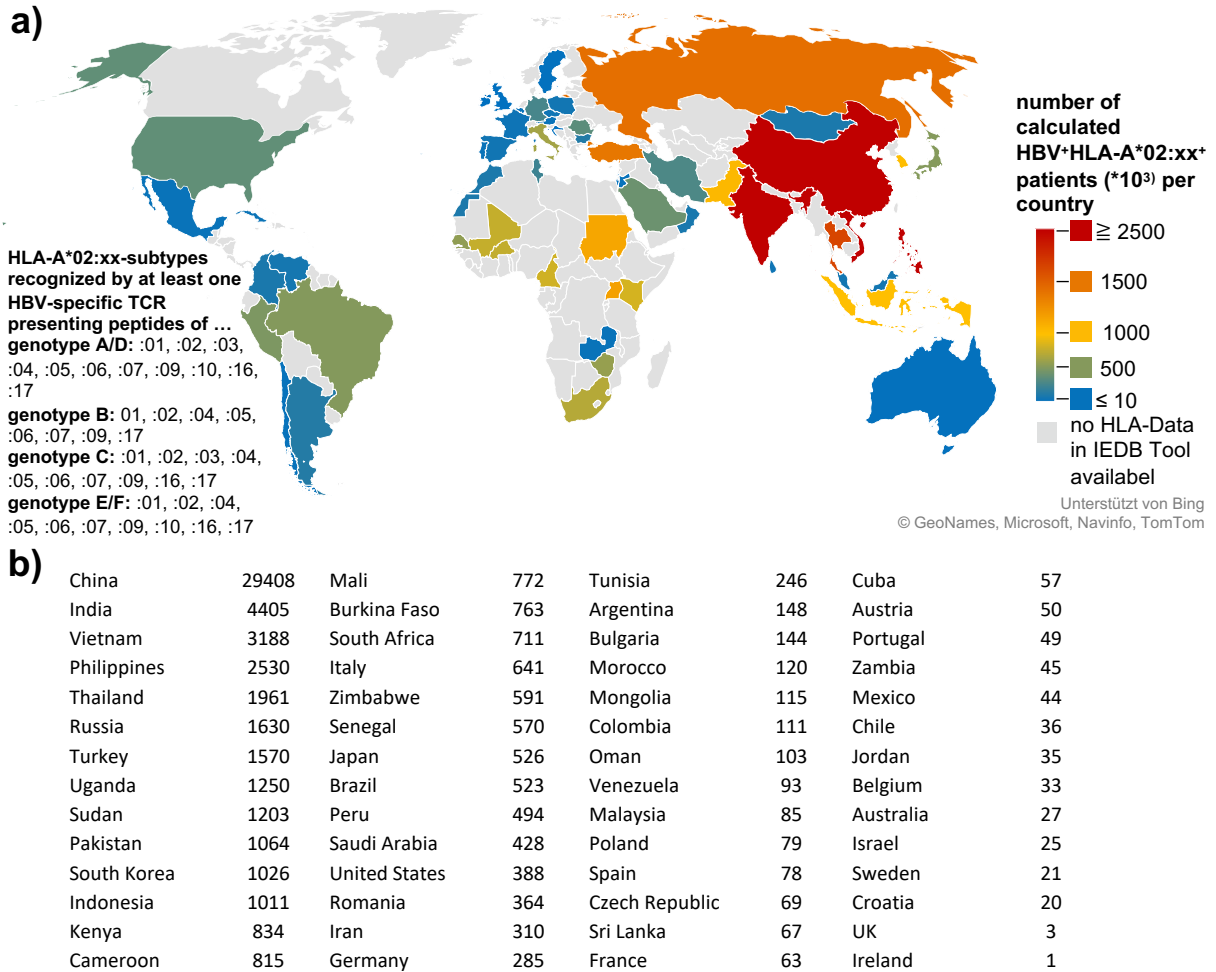


Abb. 2.6.10: Anzahl von CHB-Patienten, die für eine adoptive T-Zell-Therapie mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren potentiell in Frage kommen. Mit dem Tool „population coverage“ der Website www.iedb.org (Bui et al., 2006) wurde für die farbige dargestellten Länder berechnet, welcher Prozentsatz der Bevölkerung mindestens einen HLA-A2-Subtyp trägt, auf dem mindestens eines der verwendeten HBV-Peptid (C18, S20 oder S172) der Genotypen A–F nach experimentellen Daten erkannt wird (s. Abb. 2.6.7 und bzgl. der Erkennung der Peptidvarianten s. Wisskirchen et al., 2017). Es wurde nach folgender Formel die Anzahl an CHB Patienten pro Land berechnet ($n^{CHB \text{ for } ACT}$), die potentiell für eine adoptive T-Zell-Therapie mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in Betracht kommen würden.

$$n^{CHB \text{ for } ACT} = (n^{CHB(A)} + n^{CHB(D)}) * p^{A/D} + n^{CHB(B)} * p^B + n^{CHB(C)} * p^C + (n^{CHB(E)} + n^{CHB(F)}) * p^{E/F}$$

$n^{CHB(x)}$ = Anzahl Infizierter mit HBV-Genotyp x ($x = A, B, C, D, E$ oder F), p^x = prozentualer Anteil der Bevölkerung des Landes, die einen HLA-Subtypen tragen, der, wenn er das entsprechende HBV-Peptid der HBV-Genotypen ($x =$ Genotypen A/D, B, C oder E/F) präsentiert durch mindestens einen HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt werden würde. Die Daten bezüglich der Anzahl von CHB-Patienten des entsprechenden HBV-Genotyps pro Land wurde aus Velkov et al., 2018 übernommen. a) Die berechnete Anzahl an CHB-Patienten pro Land, die mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren behandelt werden könnte, wurde graphisch auf einer Weltkarte dargestellt. In b) ist tabellarisch pro Land die berechnete Patientenanzahl ($*10^3$) angegeben.

Zur Berechnung wurde die Anzahl der mit den Genotypen A–F infizierten Patienten pro Land (Daten aus Velkov et al., 2018) mit dem im „*population coverage*“ Analysetool berechneten prozentualen Anteil der Bevölkerung, die mindestens einen HLA-Subtyp tragen, auf den das entsprechende HBV-Peptid des Genotypen A–F von mindestens einem unserer T-Zell-Rezeptoren erkannt wird, multipliziert (siehe Kapitel 5.9 zur genaueren Vorgehensweise). Die anhand dieser Modellrechnung kalkulierte Anzahl an Patienten pro Land, die mit einem der HBV-Genotyp A–F infiziert sind und seinen HLA-Subtypen tragen, der von mindestens einem unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannt wird, wurde dann auf einer Weltkarte graphisch dargestellt (s. Abb. 2.6.10 a) und die berechnete Patientenanzahl pro Land tabellarisch aufgeführt (s. Abb. 2.6.10 b). Die meisten chronisch HBV-Infizierten, die für eine adoptive T-Zell-Therapie nach dieser Kalkulation in Betracht kommen könnten, sind mit 29 Millionen in China vorzufinden, gefolgt von Indien mit ca. 4,4 Millionen chronisch HBV-Infizierten die einen HLA-A*02-Subtyp tragen, der durch mindestens einen unserer Rezeptoren erkannt wird (s. Abb. 2.6.10 b). In absteigender Reihenfolge sind in den Ländern Vietnam, Philippinen, Russland, Türkei, Thailand, Uganda, Sudan, Pakistan und Südkorea schätzungsweise zwischen 3,2 Millionen (Vietnam) und 1 Million (Südkorea) CHB-Patienten potentiell nach dieser Berechnung geeignet für eine adoptive T-Zell-Therapie mit unseren T-Zell-Rezeptoren. Deutschland steht mit 285 000 HBV⁺ Patienten an 28. Stelle.

Es ist eine vereinfachte Modellrechnung und die Zahlen sind daher unter Vorbehalt zu betrachten. Es wird aber deutlich, dass trotz HLA-Restriktion unserer T-Zell-Rezeptoren mehrere Millionen CHB-Patienten mit diesen behandelte werden könnten, sollte sich die adoptive T-Zell-Therapie für die Hepatitis B im klinischen Alltag etablieren.

2.7 Expressionsanalyse und Testung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auf Funktionalität in murinen T-Zellen

Nach der *in vitro* Testung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen Zellen ist ein weiterer Schritt die *in vivo* Testung des adoptiven T-Zell-Transfers in einem HBV-Mausmodell.

Dafür musste ein neuer Mausstamm gezüchtet werden, in dem sich das HBV repliziert und in dem das humane HLA-A*02:01 exprimiert wird. Hierzu wurde die Mauslinie HBV1.3 (Guidotti et al., 1995), welche das HBV-Genom als Transgen besitzt, mit der Mauslinie HHD2 (Pascolo et al., 1997) gekreuzt, die ein modifiziertes humanes HLA-A2.01 Molekül als Transgen exprimiert, „HHD“ genannt. Bei der HHD2-Mauslinie liegt ebenfalls ein Doppel-Knockout des dominanten murinen H-2D^b-Moleküls und des murinen β -Mikroglobulins vor. Die Kreuzung der neuen Mauslinie HBV-A2 wurde bereits von Karin Wisskirchen in ihrer Dissertation beschrieben und während meiner Laborzeit weiter geführt (Krebs, 2011).

Vor den aufwendigen *in vivo* Versuchen sollte festgestellt werden, ob die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auch die entsprechenden HBV-Peptide auf dem modifizierten HLA-A*02:01-Molekül „HHD“ erkennen. (Die folgenden Daten sind noch nicht veröffentlicht worden)

2.7.1 Expression der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in murinen T-Zellen

Beim T-Zell-Transfer in das HBVtg/HHDtg Mausmodell müssen transduzierte murine T-Zellen, die zuvor aus Milzen anderer Mäuse isoliert wurden, als Effektorzellen verwendet werden. Deshalb sollte zunächst getestet werden, ob und wie gut die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in murinen T-Zellen exprimiert werden und ob sie diese in HBV-spezifische Effektorzellen umwandeln.

Das verwendete Transduktionsprotokoll unterschied sich zum Teil vom Transduktionsprotokoll für humane T-Zellen. Statt der Verpackungszelllinie 293-T wurde die Plat-E-Zelllinie (Morita et al., 2000) verwendet, die unter dem Promoter EF1 α eine stabile Expression der Verpackungsproteine *gag-pol* und *env* und eine effiziente Retrovirusproduktion erlaubt. Der damit produzierte Retrovirus wurde zur Transduktion der murinen T-Zell-Linie B3Z und zur Transduktion von murinen T-Zellen, die wir zuvor aus Milzen isoliert hatten, verwendet.

In Abbildung 2.7.1 a ist die Frequenz der Streptamer⁺ CD8⁺ B3Z Zellen dargestellt. Diese war bei den T-Zell-Rezeptoren 6K, FLP14, 4G und WL12 mit über 60 % hoch, für die T-Zell-Rezeptoren FLP122, 5E, D1, G6 und WL31 lag sie zwischen 20-60 % und für die T-Zell-Rezeptoren 7D, C_AB, FL6, S_AB war nur eine geringe bzw. gar keine Streptamerbindung zu erkennen. Dabei fiel auf, dass die Fähigkeit der einzelnen T-Zell-Rezeptoren Streptamer zu binden sich in humanen CD4⁺ T-Zellen und murinen T-Zellen sehr ähnelte (siehe Kapitel 2.5).

Nachdem die T-Zell-Rezeptoren sich gut in der murinen T-Zell-Linie B3Z exprimieren ließen, wurde die Expression des C18-spezifischen TZR FLP14 in primären murinen T-Zellen überprüft. Die Abbildung 2.7.1 b stellt den prozentualen Anteil an Streptamer⁺ primären murinen T-Zellen nach der ersten und zweiten Transduktion mit dem TZR FLP14 dar. Dabei waren nach der ersten Transduktion 38 % der CD4⁺ T-Zellen Streptamer⁺ und 26 % der CD8⁺ T-Zellen Streptamer⁺. Nach der 2. Transduktion verdoppelte sich die Transduktionsrate in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Es konnte somit gezeigt werden, dass unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in der murinen T-

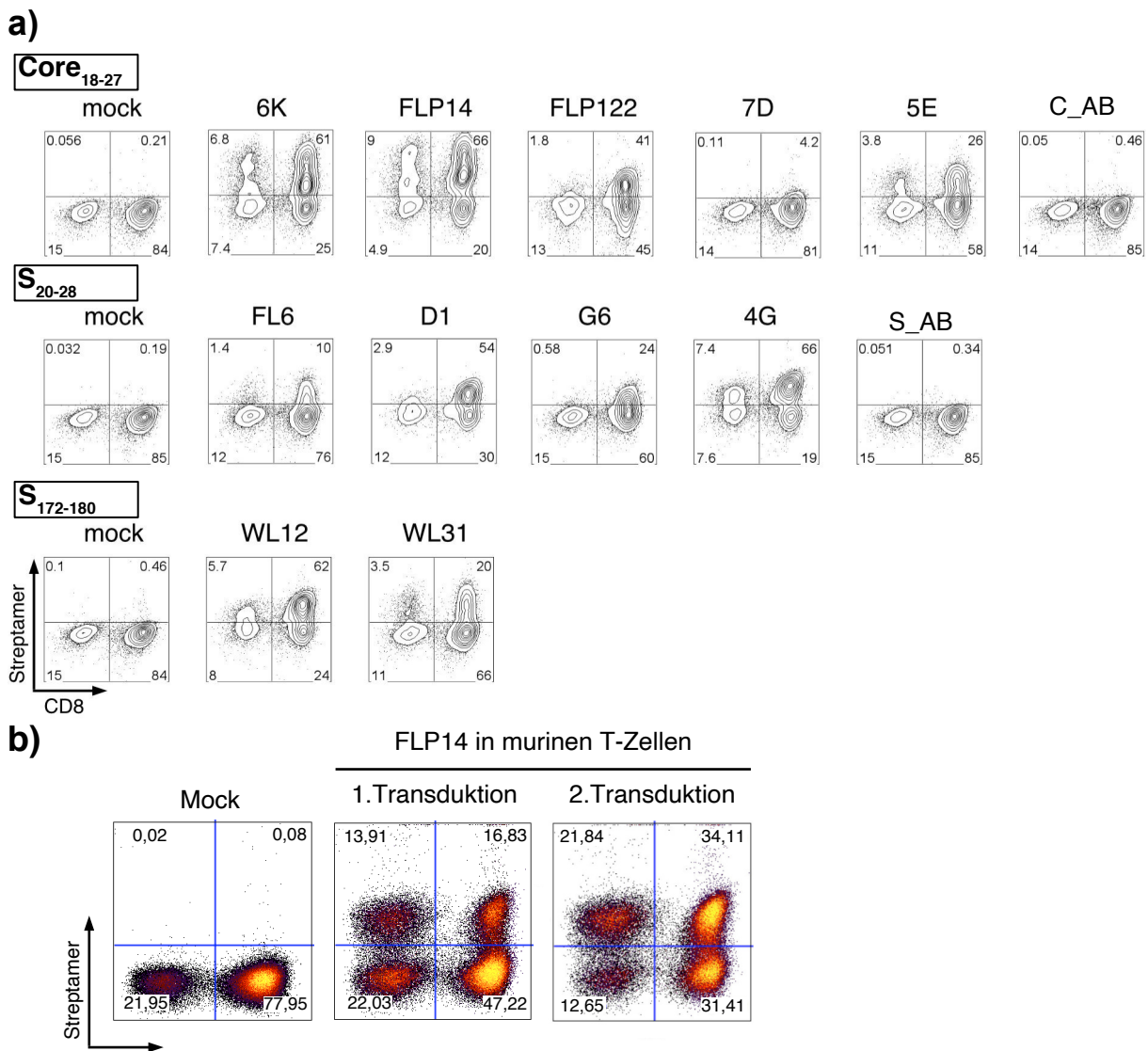


Abb. 2.7.1: Expression der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in der murinen T-Zell-Linie B3Z und in primären murinen T-Zellen. Zur Transduktion muriner T-Zellen wurden Zellen der Verpackungszelllinie Plat-E Zellen mit den optimierten T-Zell-Rezeptoren im MP71-Vektor transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurde der gewonnene Retrovirus zur Transduktion von a) Zellen der murinen T-Zelllinie B3Z bzw. b) primären murinen T-Zellen, die zuvor aus Milzen von CD45.1⁺ Mäusen isoliert worden waren, verwendet. Die Transduktionrate wurde mittels Durchflusszytometrie nach Streptamer- und Antikörperfärbung gegen CD8 bestimmt.

Zell-Linie B3Z exprimiert werden, jedoch Unterschiede in der Bindung der spezifischen Streptamere aufwiesen. Zudem konnte auch eine erfolgreiche Expression des C18-spezifischen TZR FLP14 in primär murinen T-Zellen erreicht werden.

2.7.2 Erkennung des modifizierten MHC der HBV-A2 Mäuse durch die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Nachdem erfolgreich gezeigt wurde, dass die T-Zell-Rezeptoren auch in murinen T-Zellen exprimiert werden, sollte nun abgeklärt werden, ob die T-Zell-Rezeptoren auch die Peptide spezifisch erkennen, wenn sie über das modifizierte HLA-A*02:01-Molekül „HHD“ (Pascolo et al., 1997), welches im HBV-A2 Mausmodell exprimiert wird, präsentiert werden (s. Abb. 2.7.2 a).

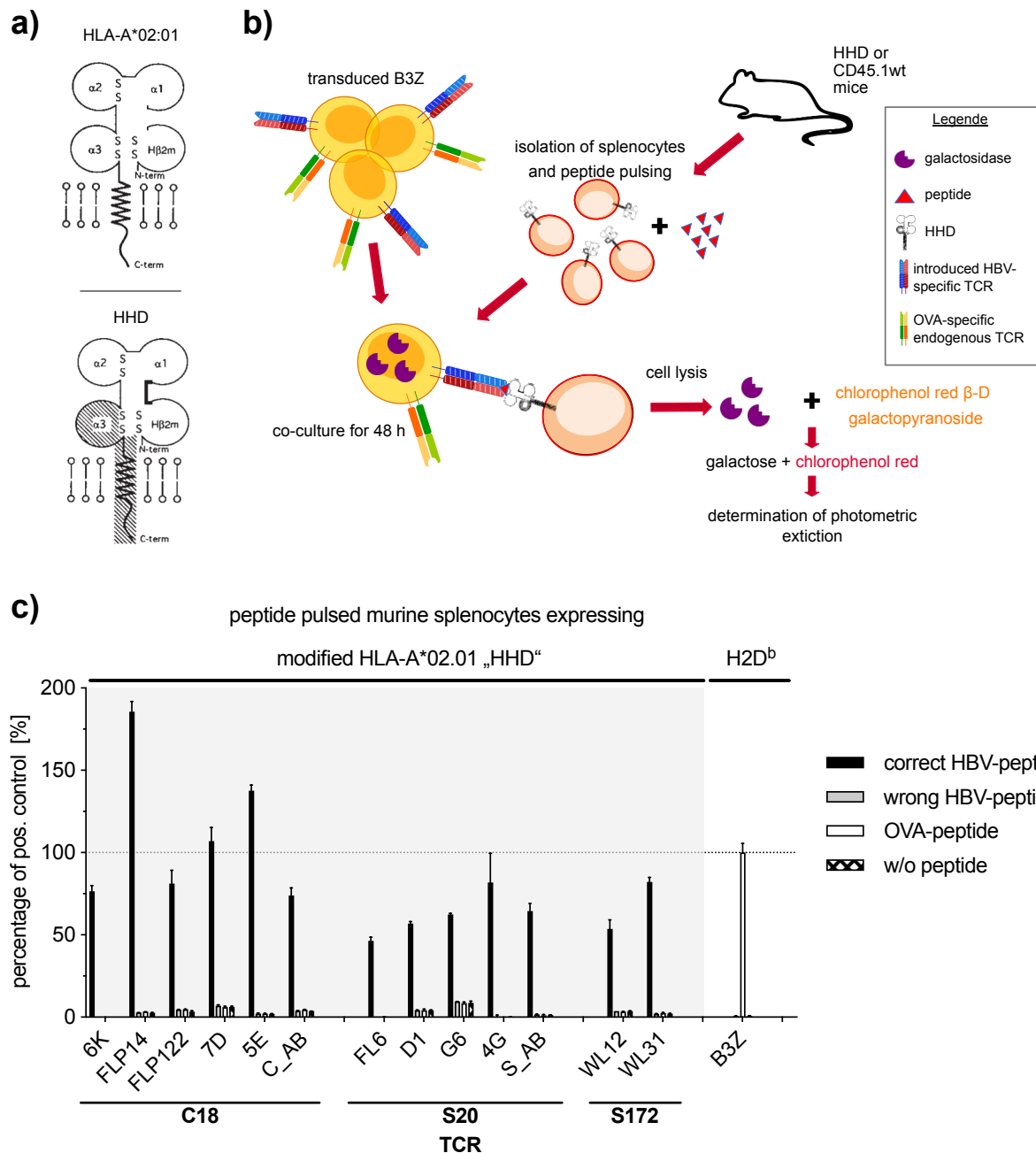


Abb. 2.7.2: Funktionalität der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in der murinen T-Zell-Linie B3Z
a) Schematische Darstellung eines HLA-A*02:01 Moleküls bestehend aus einer langen Polypeptidkette, welche in drei Domänen ($\alpha 1 - \alpha 3$) unterteilt wird, und dem nichtkovalent gebundenen β_2 Mikroglobulin. Das modifizierte HHD-Molekül basiert auf dem HLA-A2*02:01 Molekül, wobei jedoch die murine H-2D^b $\alpha 3$ Domäne, sowie die murine Transmembran- und Zytoplasmadomäne (schraffierte Abschnitte) eingefügt wurde und die modifizierte α -Kette am Aminoterminus über eine 15-AS lange Verbindung (dicke Linie) mit dem humanen β_2 Mikroglobulin verbunden wurde (Abbildung a modifiziert nach Pascolo et al., 1997). b) Splenozyten wurden aus HHDtg Mäusen oder CD45.1wt Mäusen, welche das murine MHC H2D^b exprimieren, isoliert und mit dem HBV-Peptid, dem OVA-Peptid oder keinem Peptid beladen. Zusammen mit 1×10^5 transduzierten HBV-spezifischen B3Z-T-Zellen wurde eine 48-stündige Kokultur angesetzt (Effektor- zu Zielzellverhältnis 1:1). Bei Aktivierung von B3Z-Zellen kommt es unter dem humanen NFAT-Promoter zu einer Expression von Galaktosidase (Karttunen et al., 1992). Deren Aktivität wurde aus dem Lysat der Zellen indirekt mittels der photometrisch messbaren Substratumsetzung bestimmt und spiegelt die T-Zellaktivierung wieder. c) Die photometrisch bestimmte Extinktion für jede Kokultur wurde ins Verhältnis zur gemessenen Extinktion nach spezifischer Stimulation des endogenen OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptors der B3Z-Zellen gesetzt (siehe Kokultur der B3Z-Zellen mit den OVA-Peptid beladenen H2D^b+ Splenozyten). Daten sind als Mittelwerte +/- SEM aus Triplikaten dargestellt.

Zur Überprüfung, ob die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auch HBV-Peptide auf dem HHD-Molekül erkennen, wurden Splenozyten aus HHDtg oder CD45wt Mäusen gewonnen, mit Peptid beladen und mit den transduzierten B3Z-Zellen in einer Kokultur für 48 h inkubiert (s. Abb. 2.7.2 b). Letztere besitzen außer dem transduzierten HBV-spezifischen TZR einen endogenen OVA-spezifischen H2D^b-restringierten TZR und enthalten ein Reportergen bestehend aus dem β -Galaktosidase-Gen, dessen Transkription durch das NF-AT-Element (*nuclear factor of activated T cells element*) des humanen Interleukin2-Enhancer reguliert wird (Karttunen et al., 1992). Bei Aktivierung der B3Z-Zellen kommt es daher zu Expression von β -Galaktosidase, deren Konzentration anschließend indirekt über die photometrisch messbare Substratumsetzung im Zellysate bestimmt werden kann. Die Erkennung der mit OVA-Peptid beladenen H2D^{b+} Splenozyten durch diesen OVA-spezifischen TZR diente daher als Positivkontrolle für eine spezifische T-Zell-Aktivierung. Da die Streptamerfärbung von den transduzierten B3Z-Zellen nicht für alle T-Zell-Rezeptoren erfolgreich und eine Antikörper-Färbung gegen den murinen konstanten Bereich wegen der endogenen T-Zell-Rezeptoren nicht sinnvoll war, konnten die Effektorzellen nicht auf die gleiche Anzahl an TZR⁺ Zellen gebracht werden. Pro TZR wurden je 1×10^5 B3Z-Zellen in einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:1 mit Peptid beladenen oder unbeladenen murinen Splenozyten kokultiviert.

Nach 48-stündiger Kokultur wurde ein β -Galaktosidase-Assay zum Nachweis einer spezifischen Aktivierung der B3Z-Zellen durchgeführt (siehe Kapitel 5.5.3), die indirekt über die vermehrte Galaktosidase Expression wieder gespiegelt wurde (s. Abb. 2.7.2).

Für alle T-Zell-Rezeptoren war eine spezifische Aktivierung zu erkennen (s. Abb. 2.7.2). Die Antworten der B3Z-Zellen, die mit den T-Zell-Rezeptoren FLP14 und 5E transduziert worden waren, wiesen dabei sogar eine stärkere Aktivierung auf als die Positivkontrolle mit dem OVA-Peptid. Folglich wurden alle T-Zell-Rezeptoren trotz der teils schwachen oder nicht vorhandenen Streptamerbindung in den B3Z-Zellen exprimiert und führten zu einer spezifischen Effektorantwort. Zudem erkannten alle HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren ihr entsprechendes HBV-Peptid auf dem modifizierten HLA-A*02:01-Molekül „HHD“ der murinen Splenozyten.

Hepatozyten unterscheiden sich jedoch unter anderem von den Splenozyten durch eine geringere MHC-I-Expression. Um zu überprüfen, ob die Expression des „HHD“ in den Hepatozyten ausreichend ist für eine spezifische Erkennung durch die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurde deshalb eine Kokultur mit transduzierten B3Z-Zellen und murinen Hepatozyten aus einer HHDtg und einer H2D^{b+} HLA-A*02:01⁻ Maus (CD45.1⁺ Mauslinie) durchgeführt.

In Abbildung 2.7.3 ist dabei die T-Zell-Aktivierung relativ zur Aktivierung der B3Z-Zellen nach Kokultur mit dem OVA-Peptid beladenen H2D^{b+} Hepatozyten dargestellt. Zu erkennen ist eine spezifische Aktivierung der transduzierten HBV-spezifischen B3Z-Zellen nach Kokultur mit den HBV-Peptid beladenen HHD⁺ murinen Hepatozyten. Die mit dem S20-spezifischen TZR 4G transduzierten B3Z-Zellen erreichten 50 % der T-Zell-Aktivierung im Vergleich zur Positivkontrolle, wohingegen die C18-spezifischen TZR 6K⁺ B3Z-Zellen nur 30 % erreichten. Die Hintergrundaktivierung lag bei unbeladenen bzw. HHD⁻ Zielzellen bei 10 % bzw. 20 %. Zusammenfassend ist zu schlussfolgern, dass zumindest *in vitro* die MHC-I-Präsentation in murinen Hepatozyten bei externer Beladung ausreichend ist um T-Zellen zu aktivieren.

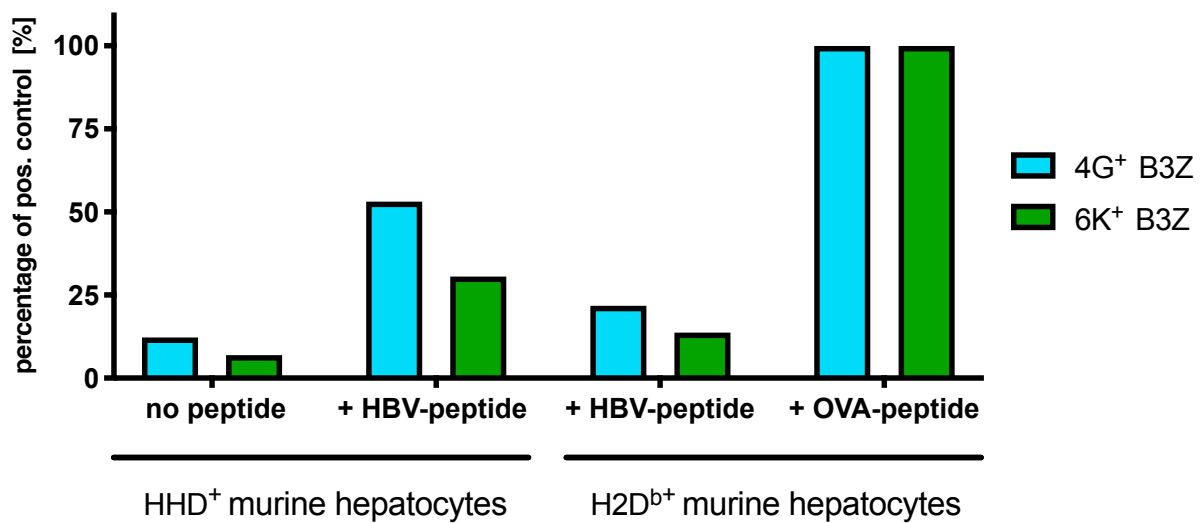


Abb. 2.7.3: Erkennung von primär murinen Hepatozyten durch transduzierte HBV-spezifische murine T-Zellen. Die Hepatozyten wurden mittels Kollagenase-Perfusion der Leber und anschließender Aufreinigung über einen Cell Separator und über Gradientenzentrifugation isoliert und für 3 Tage kultiviert. Je TZR wurden Kokulturen mit unbeladenen bzw. dem jeweiligen HBV-Peptid beladenen HHD⁺ Hepatozyten und mit dem OVA-Peptid bzw. dem jeweiligen HBV-Peptid beladenen H2D^{b+} HLA-A*02:01⁻ Hepatozyten angesetzt. Nach 24 h wurde ein β -Galaktosidase-Assay aus den Überständen durchgeführt und daraus indirekt die T-Zell-Aktivierung bestimmt. Die photometrisch bestimmte Extinktion für jede Kokultur wurde ins Verhältnis zur gemessenen Extinktion nach spezifischer Stimulation des endogenen OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptors der B3Z-Zellen gesetzt. Bei den Messwerten handelt es sich um Unikate.

Kapitel 3

Diskussion

Mit 1,4 Millionen Menschen verstarben im Jahr 2016 weltweit mehr Menschen an den Folgen von viralen Hepatitiden als an Tuberkulose, HIV oder Malaria. Die chronische Hepatitis B wird deshalb von der WHO als Gefahr für die weltweite öffentliche Gesundheit gesehen und deren Bekämpfung ist von zunehmendem gesundheitspolitischem Interesse (Graber-Stiehl, 2018). Mit den aktuell zur Verfügung stehenden medikamentösen Therapien ist eine Heilung der chronischen Hepatitis B normalerweise nicht möglich, da diese nicht zu einer vollständigen Elimination der cccDNA führen, die dem HBV als Replikationsvorlage dient. Die in der akuten Hepatitis B starke T-Zell-Antwort, die wesentlich an der Immunkontrolle des HBV und Ausheilung der akuten Hepatitis B beteiligt ist, fehlt bei chronisch Hepatitis B Infizierten und führt zu einer Persistenz der Infektion (Rehermann, 2013). Mit der Möglichkeit der gentechnischen Modifizierung kam die Idee, hoch avide HBV-spezifische T-Zellen zu generieren, indem T-Zellen mit hoch affinen Antigenrezeptoren ausgestattet werden. Diese sollen per T-Zell-Transfer die geschwächte T-Zell-Antwort in chronisch Hepatitis B Infizierten stärken und dadurch eine Heilung der chronischen Hepatitis B ermöglichen. Als Antigenrezeptoren können dabei chimäre Antigen-Rezeptoren oder natürliche T-Zell-Rezeptoren verwendet werden. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob HBV-spezifische natürliche T-Zell-Rezeptoren, die aus Patienten mit akuter Hepatitis B oder Z.n. ausgeheilter akuter Hepatitis B isoliert worden waren, sich eignen, um per retroviraler Transduktion T-Zellen zu hoch aviden HBV-spezifischen Effektorzellen zu machen. Es wurden 11 HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren nach Isolierung und gentechnischer Optimierung funktionell charakterisiert und mit zwei bereits charakterisierten T-Zell-Rezeptoren (Gehring et al., 2011b) hinsichtlich ihrer funktionellen Fähigkeiten verglichen.

3.1 Identifizierung von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Zur Isolation der HLA-A*02:01 restringierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurden die zwei Peptide S_{S20-28} (S20) und S_{S172-180} (S172) aus dem S-Protein (Nayersina et al., 1993), sowie das Core₁₈₋₂₇ (C18) Peptid aus dem Core-Protein des HBV verwendet (Bertoletti et al., 1993). Das C18-Peptid ist dabei ein häufig vorkommendes Epitop zytotoxischer T-Zellen bei HLA-A*02:01⁺ Patienten mit einer akuten HBV-Infektion (Penna et al., 1991). Mit bis zu 1,3 % aller zirkulierenden CD8⁺-Zellen machen C18-spezifische T-Zellen einen Großteil der HBV-spezifischen T-Zell-Antwort in akut HBV-Infizierten aus (Maini et al., 1999). Bei allen drei HBV-Peptiden handelt es sich um

stark konservierte Epitope, die eine starke Immunogenität und eine degenerative HLA-Bindung aufweisen (Bertoni et al., 1997). Letzteres bedeutet, dass sie auch an andere HLA-Moleküle bzw. HLA-A2-Subtypen binden und dort immunogen sind. Wir entschieden uns für diese 3 etablierten immunogenen HBV-Peptide, um mehrere HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren zu isolieren, da eine polyklonale und insbesondere multispezifische T-Zell-Antwort entscheidend für die Immunkontrolle von HBV ist (Rehermann et al., 1995a; Maini et al., 2000).

In chronischen viralen Erkrankungen, wie z.B. HCV und HIV, führt die T-Zell-vermittelte Immunantwort durch einen Selektionsdruck auf virale Proteine zu Mutation in T-Zell-Epitopen (Gaudieri et al., 2006; Kløverpris et al., 2016). Dies stellt auch eine Problematik bei der Antigen-spezifischen Immuntherapie von Viruserkrankungen dar, wenn rein monospezifische T-Zellen verwendet werden, da der Virus durch Mutation im Bereich des Zielepitops der Therapie entkommen kann (Koenig et al., 1995). Auch das Hepatitis B Virus versucht auf unterschiedliche Weise der T-Zell-vermittelten Immunantwort zu entfliehen (Lumley et al., 2018). Wie häufig und v.a. wie ausschlaggebend allerdings Mutationen in T-Zell-Epitopen bei der chronischen Hepatitis B sind wird kontrovers diskutiert (Hoogeveen et al., 2019; Zhang et al., 2018; Rehermann et al., 1995b). Erstmals isolierten Bertoletti und Kollegen Virusvarianten aus zwei chronisch Hepatitis B Infizierten, die durch einen Austausch der Aminosäuren an der Position 27 und 21 des C18-Peptids eine geringere Peptid-MHC-Bindung bzw. schlechtere TCR-Peptid-MHC Bindung im Vergleich zum Prototyp des C18-Peptid (vom Genotyp D) aufwiesen. Da in diesen zwei Patienten nur eine selektive T-Zell-Antwort gegen das Prototyp C18-Peptid vorlag, vermuteten die Autoren, dass die Virusvarianten der C18-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort entkamen und somit möglicherweise zur Persistenz der Infektion in diesen zwei Patienten beigetragen hatten (Bertoletti et al., 1994). Rehermann und Kollegen untersuchten die Immunantwort und die Sequenzvariation von HLA-A*02:01 restringierten T-Zell-Epitopen in chronisch HBV-Infizierten und kamen hingegen zu dem Schluss, dass Sequenzvariationen von T-Zell-Epitopen eher selten in CHB vorzufinden sind und in den meisten Fällen keine Erklärung für die Persistenz der HBV-Infektion sind (Rehermann et al., 1995b). In jüngerer Zeit konnte in viralen Sequenzstudien gezeigt werden, dass gewisse Sequenzvarianten von viralen Epitopen in Isolaten von Patienten mit dem relevanten HLA-Klasse-I-Allel signifikant häufiger waren (Desmond et al., 2012). In weiteren Studien konnten sowohl für verschiedene Virustypen sowie unterschiedliche HLA-Allele Sequenzpolymorphismen in T-Zell-Epitopen beschrieben werden und es gelang auch in funktionellen Tests der Nachweis, dass gewisse Sequenzpolymorphismen in T-Zell-Epitopen zu einer schwächeren T-Zell-Antwort führen (Kefalakes et al., 2015; Zhang et al., 2018). Insbesondere Sequenzvariationen von Epitopen im Core-Protein des HBV sind in der Literatur beschrieben (Kefalakes et al., 2015; Zhang et al., 2018).

Für das HLA-A*02:01 restringierte Core₁₈₋₂₇ Peptid (C18) sind bei den Genotypen A/D Sequenz-Polymorphismen an der Position 21 (Serin zu Alanin oder Threonin), 24 (Phenylalanin zu Tyrosin) und 27 (Valin zu Isoleucin oder Alanin) beschrieben, die statistisch bei HLA-A*02:01⁺ CHB-Patienten vermehrt vorkommen (Kefalakes et al., 2015). Mit dem gleichzeitigen Transfer multispezifischer polyklonaler statt monospezifischer monoklonaler T-Zellen würde sich möglicherweise das Risiko einer Virus-Escape-Mutation verringern lassen. Unser multispezifisches und polyklonales T-Zell-Rezeptor-Repertoire könnte zur Klärung dieser Fragestellung geeignet sein. Des Weiteren

wäre interessant, ob unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren, die in der Literatur beschriebenen Polymorphismen in den HLA-A*02:01 restringierten T-Zell-Epitopen C18, S20 und S172 erkennen könnten und somit auch bei Patienten eingesetzt werden könnten, bei denen diese Virusvarianten vorliegen bzw. durch Selektionsdruck entstanden sind.

Noch relevanter für die spätere Anwendung in der adoptiven T-Zell-Therapie sind möglicherweise die Sequenzvariationen der Epitope zwischen den einzelnen HBV-Genotypen (AS-Veränderungen im vgl. zu Genotyp A/D in folgendem Abschnitt fett markiert). Nach Desmond et al., 2008 sind die Sequenzen des C18-Peptids („FLPSDFFPSV“) für Genotypen A, D, E und F identisch, die Genotypen B und C weisen eine genotypische Variation mit der Peptidsequenz „FLPSDFFPSI“ auf. Für das S20-Peptid haben die Genotypen A, C und D eine identische Sequenz („FLLTRILTI“), für die restlichen HBV-Genotypen B, E, F ist die genotypische Sequenzvariation „FLLTKILTI“ beschrieben (Desmond et al., 2008). Die Sequenz des S172-Peptids mit „WLSLLVPFV“ ist in den Genotypen A-E gleich und nur für den Genotyp F liegt eine Variation mit der Sequenz „WLSLLVQFV“ vor (Desmond et al., 2008).

Zur Isolation und zur funktionellen Charakterisierung unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurden in dieser Arbeit die Peptidsequenzen der Genotypen A/D, welche vorwiegend in Europa, Nordamerika, Indien und Afrika vorkommen, verwendet (Velkov et al., 2018). Ob unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren die oben beschriebenen genotypischen Sequenzvariationen erkennen wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, sondern konnte in späteren ergänzenden Versuchen gezeigt werden (Wisskirchen et al., 2017). Alle C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannten die Peptidvariante „FLPSDFFPSI“, wenn ihnen diese auf HLA-A*02:01⁺ Zielzellen präsentiert wurden. Von den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannten nur die T-Zell-Rezeptoren 4G und G6 die S20-Peptidvariante „FLLTKILTI“ auf dem HLA-A*02:01-Komplex, während die anderen S20-spezifischen T-Zellen diese Peptidvariante auf dem HLA-A*02:01-Komplex nicht erkannten. Die Peptidvariante des S172-Peptids „WLSLLVQFV“ wurde wiederum von beiden S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auf HLA-A*02:01 erkannt (Wisskirchen et al., 2017).

Die von uns isolierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkennen somit bekannte immundominante HBV-Peptide, gegen die auch in der natürlichen Immunantwort eine starke T-Zell-Antwort besteht (Hoogeveen et al., 2019). Mit dem isolierten polyklonalen und multispezifischen TZR-Repertoire können wir daher die multispezifische T-Zell-Antwort der akuten Hepatitis B zum Teil nachempfinden. Dabei erkennt mindestens ein TZR pro Peptid-Spezifität auch die häufigsten Peptidvarianten der Genotypen A–F, was die klinische Anwendung in einem größeren Patientenspektrum ermöglicht.

Aus den 100 T-Zell-Klonen, die wir mittels limitierender Verdünnung kultiviert hatten, konnten wir letztendlich 11 verschiedene HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren isolieren. Dabei konnten wir für Spender 1 und 2 jeweils für alle drei Epitope spezifische T-Zell-Rezeptoren isolieren. Aus dem peripheren Blut des 3. Spenders gelang nur die Isolation eines S20-spezifischen T-Zell-Rezeptors. Auffallend ist, dass ein Großteil der mittels limitierender Verdünnung gewonnenen T-Zell-Klone pro Peptidspezifität und Spender den gleichen T-Zell-Rezeptor exprimierten und somit desselben monoklonalen Ursprungs waren. Ob diese deutliche klonale Expansion bereits *in vivo* vorlag oder erst durch die *in vitro* Stimulation herbeigeführt wurde, lässt sich anhand dieses Versuchsaufbaus nicht sagen. In der Literatur wird jedoch beschrieben, dass es nach Ausheilung einer akuten Hepatitis

B zu einer monoklonalen und polyklonalen Expansion insbesondere der CD8⁺ T-Zellen kommt (Yang et al., 2014) und auch nach Impfung mit rekombinatem HBsAg eine monoklonale Expansion von CD8⁺ T-Zellen entdeckt wurde (Höhn et al., 2002).

Bekannt ist, dass sich im Rahmen der antiviralen Immunantwort das TZR-Repertoire verändert bzw. ausrichtet. Dies wird in der englischen Fachliteratur auch gerne als „*skewed or imundominant TCR-Repertoire*“ oder „*TCR bias*“ beschrieben (Turner et al., 2006). Yang und seine Kollegen stellten beispielsweise eine erhöhte relative Expression von 9 TRBV-Familien (BV5.1, BV11, BV12, BV13.1, BV13.2, BV15, BV18, BV20 und BV24) in Patienten mit einer akuten Hepatitis B fest (Yang et al., 2014). Auch 5 unserer T-Zell-Rezeptoren besitzen eine variable Region, die zu diesen vermehrt auftretenden TRBV-Familien gehört. Insbesondere für die TRBV-Familie BV12, die auch bei Yang und seinen Kollegen die häufigste TRBV-Familie war (Yang et al., 2014), isolierten wir je einen S20-spezifischen TZR pro Spender. Diese Bevorzugung von gewissen variablen Regionen scheint dabei nicht nur auf die TRBV-Familien zuzutreffen, sondern auch auf die variablen Regionen der α -Kette (=TRAV) (Höhn et al., 2002). Bei unseren T-Zell-Rezeptoren kam dreimal die TRAV-Familie AV 17 und AV 12-2 vor, sowie zweimal die AV 13-1.

Dabei sind nicht nur gewisse TRBV- und TRAV-Familien in Patienten mit akut ausgeheilter Hepatitis B vermehrt vorzufinden, sondern auch in den sonst hochvariablen CDR3-Regionen interindividuell konservierte Sequenzen vorzufinden (Yang et al., 2014). Auch die CDR3-Regionen der β -TZR-Kette von TZR D1 aus Spender 1 und TZR G6 aus Spender 3 unterschied sich nur in zwei Aminosäuren bei sonst identischen TZR-Ketten (TRAV 17 und TRBV 12-3). Möglicherweise könnte es sich hier um einen „*public TCR*“, wie es schon für andere virale Erkrankungen beschrieben wurde, handeln (Lehner et al., 1995; Lim et al., 2000; Venturi et al., 2008). Darunter versteht man, dass in allen Individuen mit gleichen MHC-Molekülen, der TZR von T-Zellen einer gewissen Antigen-spezifität aus identischen TZR-Sequenzen besteht.

Zusammenfassend gehen auch unsere Daten mit der Hypothese einher, dass gewisse TRBV- bzw. TRAV-Familien bevorzugt bei der Bildung von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren verwendet werden, wenn auch sicher weitere Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung nötig sind. Um eine Aussage treffen zu können, ob diese bevorzugten T-Zell-Rezeptoren-Sequenzen auch mit einer starken antiviralen Immunantwort bzw. mit Ausheilung der Hepatitis B assoziiert sind, sind weitere Studien mit mehr Proben nötig.

3.2 Optimierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Die gentechnische Optimierung von T-Zell-Rezeptoren dient zur Verbesserung der Transduktionsrate, der TZR-Expression sowie zur Risikosenkung von Fehlpaarungen des transgenen T-Zell-Rezeptors mit dem endogenen Rezeptor.

Eine Möglichkeit um transgene TZR-Sequenzen in T-Zellen einzufügen ist, diese in retrovirale Vektoren einzubringen. Durch Optimierung dieser Vektoren wird eine hohe Transduktionseffizienz mit hoher Expression des Transgens in den Zielzellen bei gleichzeitig hohem Sicherheitsprofil (d.h. geringer Insertionsmutagenese) angestrebt. Wir entschieden uns für den retroviralen Vektor MP71,

der uns von der AG Uckert¹ zur Verfügung gestellt wurde. Die Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Uckert konnte zeigen, dass im Vergleich zu einem Standardvektor basierend auf dem *Moloney murine leukemia virus* der MP71 bereits bei niedriger MOI (*Multiplicity of infection*) zu einer deutlich höheren Expression des Transgens in murinen und in humanen T-Zellen führte (Engels et al., 2003). Der MP71-Vektor war deshalb besonders geeignet für unser Vorhaben T-Zell-Rezeptoren sowohl im *in vivo* Mausmodell als auch in humanen T-Zellen zu testen. Auch die ersten Langzeitdaten mit über 500 Patientenjahren zur Sicherheit und Effizienz von γ -retroviralen Vektoren in der adoptiven T-Zell-Therapie zeigen keine wesentlichen Nebenwirkungen (Scholler et al., 2012).

Ein Nachteil von γ -retroviralen Vektoren wie dem MP71 ist, dass für eine stabile Integration des Transgens in das Genom die T-Zellen mittels CD3- und CD28-Stimulation zur Proliferation angeregt werden müssen. Im Rahmen dessen kommt es zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen, was Auswirkung auf die T-Zell-Funktion haben kann (Thomas et al., 2010). Mit lentiviralen Vektoren können hingegen auch undifferenzierte T-Zellen transduziert werden, da sie auch eine Integration des Transgens in das Genom von sich nicht teilenden Zellen ermöglichen (Suerth et al., 2012). Eine andere Möglichkeit besteht darin, T-Zellen per mRNA-Elektroporation mit einem spezifischen TZR gegen das Ziel-Antigen auszustatten. Mögliche Vorteile gegenüber der Verwendung von viralen Vektoren sind ein schnellerer Herstellungsprozess, geringere Produktionskosten, weniger regulatorische Auflagen und ein potentiell besseres Sicherheitsprofil, da es nur zu einer kurzzeitigen TZR-Expression kommt und das Transgen nicht ins Wirtsgenom integriert wird und somit kein Risiko einer Onkogenese besteht (Koh et al., 2013). Durch die nur kurzzeitige Expression des Antigenrezeptors in den T-Zellen ist die Effektorantwort allerdings nicht so langanhaltend wie bei retroviral transduzierten T-Zellen und es sind darum meist mehrere Infusionen von TCR-mRNA elektroporierten T-Zellen notwendig. So gelang den Kollegen Koh et al., 2013 in einem Maus-Tumor-Xenograft-Modell durch dreimalige Infusionen von 3×10^6 T-Zellen, die mit mRNA eines S20-spezifischen TZR zuvor elektroporiert worden waren, ein verminderter Tumorprogress von S20-Antigen exprimierenden HepG2-Hepatoma Zellen, aber keine komplette Tumorelimination. Hingegen konnte bei Verwendung von 3×10^6 CD8⁺ T-Zellen und 3×10^5 CD4⁺ T-Zellen, die per retroviraler Transduktion mit dem S20-spezifischen T-Zell-Rezeptor ausgestattet worden waren, eine vollständige Tumorelimination erreicht werden. Auch bei der Viruskontrolle in einem chimären HBV-Mausmodell mit humanen HLA-A*02:01⁺ Hepatozyten scheint die einmalige Infusionen von T-Zellen, die per retroviraler Transduktion mit HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren ausgestattet worden waren (Wisskirchen et al., 2019), der mehrmaligen Infusion von T-Zellen, die per mRNA Elektroporation mit passager exprimierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren ausgestattet worden waren (Kah et al., 2017), überlegen. Denn Wisskirchen et al., 2019 konnten durch den einmaligen adoptiven T-Zell-Transfer von 2×10^6 T-Zellen, von denen zuvor je 1×10^6 Zellen per retroviraler Transduktion mit dem C18-spezifischen TZR 6K bzw. dem S20-spezifische TZR 4G ausgestattet worden waren, eine deutliche Reduktion der Virus-DNA (> 4 log) und des HBsAg im Serum der Mäuse erreichen. Wohingegen die dreimalige Infusion von $0,5 \times 10^6$ T-Zellen, die per mRNA-Elektroporation mit einem HBV-spezifischen TZR ausgestattet worden waren, nur zu einer durchschnittlichen Senkung des HBV-DNA um 1 log führte und die HBsAg-Level nicht beeinflusste (Kah et al., 2017).

¹Max Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin-Buch, Berlin, Germany

Eine bessere Expression des Transgens wird u. a. durch in den MP71-Vektor eingebaute *cis*-Elemente wie dem WPRE erreicht (Zufferey et al., 1999). Zudem führt die Codonoptimierung der TZR-Sequenzen zu einer Steigerung der TZR-Expression (Scholten et al., 2006; Reuß et al., 2014). Durch die Verwendung des P2A-Elements können mehrere Gene in einem Vektor eingebaut und unter dem gleichen Promoter im Sinne einer polycistronischen Expression ausgewogen exprimiert werden (Szymczak et al., 2004). Leisegang und Kollegen verglichen die Verbindungselemente interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und P2A hinsichtlich der Auswirkung auf die TZR-Expression und die T-Zell-Funktion. Das P2A-Element führte im Vergleich zum IRES zu einer besseren TZR-Expression und auch besseren funktionellen Avidität (Leisegang et al., 2008). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die Expression auch von der Reihenfolge der TZR-Ketten in der Transgenkassette abhängt. Die Reihenfolge β -TZR-Kette – P2A – α -TZR-Kette führt zu einer höheren Expression im Vergleich zur Reihenfolge α -TZR-Kette – P2A – β -TZR-Kette (Leisegang et al., 2008). Auch unsere Daten unterstützen diese Hypothese. Unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren sind in der Reihenfolge β -TZR-Kette – P2A – α -TZR-Kette in den Vektor MP71 kloniert worden und erreichten eine im Durchschnitt doppelt so hohe Transduktionsrate, wie die T-Zell-Rezeptoren S_AB und C_AB von der AG Bertolotti, welche in der Reihenfolge α -TZR-Kette – P2A – β -TZR-Kette in den retroviralen Vektor eingebaut worden waren. In den meisten Fällen scheint die Einhaltung der Reihenfolge β -TZR-Kette – P2A – α -TZR-Kette bei Einbau der Transgenkassette in den retroviralen Vektor zu einer besseren Expression der T-Zell-Rezeptoren zu führen (Banu et al., 2015). Es gibt aber auch Ausnahmen. So erreichte der TZR C_AB als einziger der 10 T-Zell-Rezeptoren, die von Banu et al., 2015 getestet wurden, eine bessere Expression in der Konfirmation α -TZR-Kette – P2A – β -TZR-Kette. Die Ursache, warum die Reihenfolge β -TZR-Kette – P2A – α -TZR-Kette in den meisten Fällen zu einer besseren Expression führt, ist nicht geklärt. Banu et al. postulierten, dass die α -Kette durch sofortige Dimerbildung mit der kurz zuvor translatierten β -Kette der sonst drohenden ER-assoziierten Degradierung entgeht (Banu et al., 2015). Leisegang und Kollegen vermuteten, dass es durch den verbleibenden Peptidrest des P2A Elements an der α -Kette zu einer Destabilisierung der α -Kette kommt (Leisegang et al., 2008).

Zu welchem Anteil die einzelnen Optimierungsschritte, wie Codonoptimierung und das Einfügen des P2A-Element, zu einer besseren Expression der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren beigetragen haben, kann nicht gesagt werden. Die Transduktionsraten der optimierten TZR-Ketten in CD8⁺ T-Zellen waren um ein vielfaches höher (zwischen 5- bis 40-fach) als in der ersten Transduktion der nicht optimierten TZR-Ketten. Allerdings wurde hier auch ein anderes Transduktionsprotokoll verwendet, sodass die Steigerung der Transduktionseffizienz sowohl auf die Optimierung der T-Zell-Rezeptoren als auch auf das verbesserte Transduktionsprotokoll zurückzuführen ist. In einem später durchgeführten Vergleich der Transduktionseffizienz von optimierten und nicht optimierten TZR-Konstrukten bei gleichem Transduktionsprotokoll konnte gezeigt werden, dass die gentechnische Optimierung ca. zu einer Verdopplung der Transduktionsraten führte (persönliche Mitteilung von Karin Wißkirchen).

Mit dem verwendeten Transduktionsprotokoll sowie der gentechnischen Optimierung der TZR-Ketten konnten wir für unsere T-Zell-Rezeptoren eine hohe Transduktionseffizienz und TZR-Expression in den Zielzellen erreichen, um eine effiziente Generierung von HBV-spezifischen T-Zellen zur weiteren

Testung der T-Zell-Rezeptoren *in vivo* und *in vitro* zu gewährleisten.

Mit der Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors in einer zytotoxischen T-Zelle besteht das Risiko, dass sich die TZR-Ketten des endogenen T-Zell-Rezeptors mit den Ketten des transgenen T-Zell-Rezeptors falsch paaren. Dadurch könnten alloreaktive bzw. autoreaktive HLA-I und -II restringierte T-Zellen entstehen, die bei Autoreaktivität auch zur Zerstörung von körpereigenen Zellen führen können (Loenen et al., 2010). *In vivo* könnte es durch diese falsch gepaarten T-Zell-Rezeptoren zur letalen Graft-versus-Host-Reaktion kommen, wie Bendle u. a. im Mausmodell zeigen konnten (Bendle et al., 2010). Deswegen wurden Methoden entwickelt, die das Paaren der gentechnisch eingebrachten TZR-Ketten begünstigen und den TZR-Komplex stabilisieren wie u. a. die Murinisierung der konstanten Domäne oder das Einbringen von Disulfidbrücken (Cohen et al., 2006; Cohen et al., 2007). Auch wir verwendeten in unseren optimierten TZR-Konstrukten eine murine konstante Region und eine zusätzliche Disulfidbrücke, die uns ebenfalls von der AG Uckert zur Verfügung gestellt wurde. Das Einfügen von Disulfidbrücken führte in den oben genannten Studien zu einer Reduktion der Neoreaktivität durch fehlgepaarte T-Zell-Rezeptoren und verbesserte die Funktion der T-Zell-Rezeptoren.

Die Verwendung von neueren gentechnischen Verfahren wie z.B. die TALEN (Qasim et al., 2017) oder CRISPR/CAS9-Methode (Roth et al., 2018) ermöglichen dabei sowohl einen gezielten Knockout des endogenen T-Zell-Rezeptors als auch eine gezieltere Integration modifizierter Antigenrezeptoren oder weiterer Transgene (Bailey und Maus, 2019). Dies ermöglicht weitere Perspektiven wie z.B. auch die Verwendung von allogenen modifizierten T-Zellen in der adoptiven T-Zell-Therapie (Qasim et al., 2017).

Inwieweit die Fehlpaarung von TZR-Ketten und die potentielle Bildung ein klinisch relevantes Problem sein wird, wird sich wahrscheinlich erst bei einer breiteren klinischen Anwendung der adoptiven T-Zell-Therapie zeigen. In den bis jetzt durchgeführten klinischen Studien gibt es noch keinen Anhalt für Graft-versus-Host-Reaktionen aufgrund von Fehlpaarungen der transgenen und endogenen T-Zell-Rezeptor-Ketten (Rosenberg, 2010).

3.3 Expression der optimierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen

Nach Optimierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurde für alle T-Zell-Rezeptoren nach Transduktion in CD8⁺ T-Zellen eine hohe Transduktionsrate bzw. TZR-Expression erreicht. Bei den transduzierten CD4⁺-Zellen fiel dagegen auf, dass für manche T-Zell-Rezeptoren im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen nur eine kleine oder gar keine Population an Streptamer⁺ CD4⁺ T-Zellen festzustellen war (s. Abb. 2.5.1 in Kapitel 2.5). Diese unterschiedlichen Frequenzen an Streptamer⁺ CD4⁺ T-Zellen könnten entweder durch eine teils geringere TZR-Expression in CD4⁺ T-Zellen oder eine unterschiedliche Fähigkeit der T-Zell-Rezeptoren CD8-unabhängig Streptamere zu binden erklärt werden. Um dies zu untersuchen, führten wir getrennt für die mit den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen, je eine Färbung mit dem C18-Streptamer und eine Färbung mit einem Antikörper (anti- μ TRBC⁺) gegen den eingefügten murinen konstanten Teil der β -TZR-Kette durch.

Für alle C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren stellten wir fest, dass die Frequenz von anti-muTRBC⁺ CD8⁺ T-Zellen der Frequenz an Streptamer⁺ CD8⁺ T-Zellen in etwa entspricht. Die Frequenz von anti-muTRBC⁺ CD8⁺ T-Zellen war im Durchschnitt um 5-10% höher als die Frequenz an Streptamer⁺ CD8⁺ T-Zellen. Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass der Antikörper anti-muTRBC an alle murinen β -TZR-Ketten bindet, unabhängig davon, ob sie korrekt gepaart mit einer α -TZR-Kette an der Zelloberfläche vorliegen oder nicht. Das Streptamer bindet hingegen nur an den korrekt gepaarten transgenen TZR. Antikörperfärbungen sind daher meist sensitiver in der Detektion transduzierter T-Zellen mit geringer TZR-Expression als Multimerfärbungen (Banu et al., 2015; Gehring et al., 2011b).

In den transduzierten CD4⁺ T-Zellen lag im Gegensatz zu den CD8⁺ T-Zellen für manche T-Zell-Rezeptoren eine deutliche Diskrepanz zwischen der Streptamerfärbung und der Antikörperfärbung mit anti-muTRBC (Antikörper gegen die konstante Region der murinen TZR- β -Kette) vor. Die Frequenzen von anti-muTRBC⁺ CD4⁺ T-Zellen hingegen entsprachen den Frequenzen von anti-muTRBC⁺ CD8⁺ T-Zellen. Daraus schlussfolgerten wir, dass alle HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in etwa gleich gut in CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden, jedoch manche T-Zell-Rezeptoren ohne den stabilisierenden CD8-Korezeptor den Peptid-MHC-Streptamer-Komplex nur schlecht oder gar nicht binden.

Der CD8-Korezeptor bindet an MHC I und erhöht die Antigen sensitivität von T-Zellen (Dembić et al., 1987; Dockree et al., 2017). Der CD8-Rezeptor trägt dabei über unterschiedliche Mechanismen zu einer Erhöhung der Antigen-Sensitivität bei. Erstens wird durch den CD8-Korezeptor der T-Zell-Rezeptor/pMHC Komplex stabilisiert (Wooldridge et al., 2005). Zweitens werden durch den CD8-Rezeptor intrazellulär Signalmoleküle in die Nähe des TZR/CD3 Komplexes gebracht (Artyomov et al., 2010). Drittens wird der T-Zell-Rezeptor/pMHC Komplex durch den CD8-Rezeptor in entsprechenden Microdomänen in der Zellmembran verankert, die privilegiert sind für eine frühe Signaltransduktion (Arcaro et al., 2001). Hinsichtlich der CD8-abhängigen bzw. -unabhängigen Streptamerbindung scheint davon vor allem die extrazellulär stattfindende stabilisierende Wirkung des CD8-Korezeptors auf den TZR:pMHC-Komplex relevant zu sein. Interessanterweise bindet der CD8-Korezeptor selbst an das MHC nur relativ schwach, führt aber zu einer relevanten Stabilisierung des TZR:pMHC-Komplexes. Rechnerisch führt der CD8-Korezeptor zu einer um den Faktor 2,3-fach längeren durchschnittlichen Verweildauer des T-Zell-Rezeptors am pMHC-Molekül (Laugel et al., 2007). Hierdurch erhöht der CD8-Korezeptor die Antigen-Sensitivität der T-Zelle, bei gleichzeitiger Erhaltung der Peptidspezifität, die durch den T-Zell-Rezeptor gegeben ist (Cole et al., 2012). Nach den Daten von Laugel et al., 2007 scheint die Relevanz der stabilisierenden CD8-Korezeptor Bindung für die Tetramerbindung abhängig von der Affinität des TZR zum pMHC zu sein. Lag die T-Zell-Rezeptor-Affinität für den Peptid-MHC-Komplex hoch (mit einer $K_D < 10 \mu\text{M}$), dann war eine CD8 unabhängige Tetramerbindung möglich. Lag die Affinität des T-Zell-Rezeptors zum Peptid-MHC-Komplex mit einer K_D zwischen 10–30 μM , dann war die Tetramerbindung relevant eingeschränkt, war die Affinität noch niedriger ($K_D > 30 \mu\text{M}$), dann war eine CD8-unabhängige Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid-MHC-Komplex gar nicht mehr möglich (Laugel et al., 2007). Auf unsere T-Zell-Rezeptoren übertragen (in der Annahme, dass die Bindungseigenschaften von Streptameren ähnlich wie die von Tetrameren sind) würde das bedeuten, dass es sich bei den T-Zell-Rezeptoren,

die CD8-unabhängig eine hohe Streptamerbindung aufweisen, um T-Zell-Rezeptoren handelt, die eine hohe Affinität zum Peptid-MHC-Komplex aufweisen. Bei den T-Zell-Rezeptoren, die keine oder nur eine geringe Streptamerbindung aufweisen, müsste eine niedrige Affinität zum pMHC bestehen. Um zu überprüfen, ob diese hypothetische Aussagen zur Affinität der T-Zell-Rezeptoren zutrifft, müsste die Bindungsstärke der einzelnen T-Zell-Rezeptoren an das pMHC mit z.B. der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methode überprüft werden.

In der Literatur wurde auch eine Korrelation zwischen der Stärke der CD8-unabhängigen Multimerbindung und der funktionellen Avidität beschrieben (Choi et al., 2003; Laugel et al., 2007). Dass eine hohe CD8-unabhängige Multimerbindung auch mit einer hohen funktionellen Avidität einhergehen kann, trifft zum Beispiel für unseren S20-spezifischen T-Zell-Rezeptor 4G zu. Dieser weist von den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren die höchste Streptamerbindung und die höchste funktionelle Avidität auf. Auch bei den S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren scheint ein Zusammenhang zwischen der CD8-unabhängigen Streptamerbindung und der funktionellen Avidität zu bestehen. Der T-Zell-Rezeptor WL12 zeigte eine CD8-unabhängige Streptamerbindung und eine hohe funktionelle Avidität. Der T-Zell-Rezeptor WL31 wies wiederum keine CD8-unabhängige Streptamerbindung und eine schlechte funktionelle Avidität auf. Doch für mehrere unserer T-Zell-Rezeptoren lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Streptamerbindung und der funktionellen Avidität darstellen. So waren z.B. für die T-Zell-Rezeptoren 7D, FL6 sowie C_AB oder S_AB in transduzierten CD4⁺ T-Zellen eine Streptamerbindung nur schwach bis gar nicht vorhanden, aber die transduzierten CD4⁺ T-Zellen zeigten eine spezifische Zytokinproduktion und spezifische Lyse von Antigen-positiven Zielzellen. Auch Callender und Kollegen isolierten einen HCV-spezifischen T-Zell-Rezeptor, der eine CD8-unabhängige Effektorantwort aufwies ohne Tetramer zu binden (Callender et al., 2006). Dies kann evtl. dadurch erklärt werden, dass die extrazelluläre Bindung von CD8 auf die T-Zell-Aktivierung bzw. funktionelle Avidität der T-Zellen eine nicht so starke Auswirkung zu haben scheint wie auf die Multimerbindung (Laugel et al., 2007). Laugel und Kollegen stellten nämlich eine quantitative Diskrepanz zwischen dem Bindungseffekt des CD8-Korezeptors auf die Multimerbindung und dem Effekt auf die T-Zell-Aktivierung fest. So war die CD8-unabhängige Multimerbindung bereits ab einer T-Zell-Rezeptor zu pMHC Affinität von $> 10 \mu\text{M}$ eingeschränkt, eine relevante CD8-unabhängige funktionelle Einschränkung allerdings erst ab einer sehr viel niedrigeren T-Zell-Rezeptor zu pMHC Affinität von $> 200 \mu\text{M}$ (Laugel et al., 2007). Allerdings gibt es auch T-Zell-Rezeptoren, die eine gute CD8-unabhängige Streptamerbindung aber eine sehr schwache funktionelle Avidität in den CD4⁺ T-Zellen aufweisen. Beispiele sind die T-Zell-Rezeptoren FLP14 und FLP122, die in transduzierten CD4⁺ T-Zellen von den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren die höchste bzw. dritthöchste Streptamerbindung aufweisen, aber von der funktionellen Avidität an vorletzter und letzter Stelle stehen. Auch Laugel und Kollegen beschreiben in ihrer Publikation, dass zwei T-Zell-Rezeptor-Liganden, die eine hohe Affinität für den T-Zell-Rezeptor aufwiesen und auch mit einer hohen Multimerbindung einhergingen, nicht die stärksten funktionellen Agonisten waren (Laugel et al., 2007). Berechnet man für unsere T-Zell-Rezeptoren nun den Korrelationskoeffizient zwischen der Streptamerbindung in CD4⁺ T-Zellen und den EC50-Werten aus dem Chrom-Release mit den CD4⁺-T-Zellen so beträgt der r-Wert $-0,37$ und spricht allenfalls für eine schwache Korrelation. Zusammenfassend können wir daher eine starke Korrelation zwischen der

CD8-unabhängigen Streptamerbindung und der funktionellen Avidität nicht ableiten. Nach unseren Ergebnissen ist eine Vorhersage über die funktionelle Avidität eines T-Zell-Rezeptors nur basierend auf der Bindungsstärke des T-Zell-Rezeptors zum Streptamer-Komplex daher nicht möglich.

Unsere Daten sowie andere Publikationen in denen T-Zell-Rezeptoren beschrieben werden, die mit einer guten Multimerbindung einhergehen aber keine funktionelle Effektorantwort nach Peptid-Stimulation aufweisen (Bentzen et al., 2016; Sibener et al., 2018; Hombrink et al., 2013), unterstützen die These, dass die Bindungsaffinität des T-Zell-Rezeptors zum pMHC (gemessen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methode) (Krogsgaard et al., 2003) bzw. die Multimerbindung (Callender et al., 2006; Sibener et al., 2018) allein nicht als Prädiktor für eine T-Zell-Aktivierung ausreicht, sondern andere Parameter noch in Betracht gezogen werden müssen (Krogsgaard et al., 2003). Nach neueren Erkenntnissen scheint vielmehr das Vorliegen von kraftabhängigen Wechselwirkungen zwischen TZR und pMHC-Komplex im Sinne von sogenannten Fangbindungen sowie die Ausgrenzung der Phosphatase CD45 von Membran-Kontakten ausschlaggebend für die T-Zell-Aktivierung zu sein (Sibener et al., 2018).

Letztendlich konnten wir durch die Optimierung der T-Zell-Rezeptoren hohe Expressionsraten sowohl in CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen erreichen und somit die Voraussetzung für hoch avide T-Zellen, nämlich einer ausreichenden Expression des Antigenrezeptors, erfüllen. Die für manche T-Zell-Rezeptoren zudem festgestellte CD8-unabhängige Streptamerbindung erlaubt jedoch keine sicheren Rückschlüsse auf die Avidität der T-Zell-Rezeptoren in T-Zellen.

3.4 Funktionelle Charakterisierung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen

Für die adoptive T-Zell-Therapie werden hoch avide T-Zellen benötigt, die vorzugsweise bereits bei geringer Antigendichte spezifische antivirale Zytokine sezernieren und infizierte Zellen abtöten. Wir überprüften daher die Fähigkeit der genmodifizierten HBV-spezifischen T-Zellen zur spezifischen Zytokinproduktion und Zytotoxizität in Kokultur mit Peptid beladenen T2-Zellen und ob die HBV-spezifischen T-Zellen auch endogen prozessierte HBV-Peptide auf HBV-replizierende Hepatomazellen erkennen.

3.4.1 Zytokinproduktion transduzierter HBV-spezifischer T-Zellen

Die Produktion von antiviralen Zytokinen ist ein wichtiger Teil der T-Zell-Effektorantwort in der akuten Hepatitis B (Thimme et al., 2003). Sie trägt wesentlich zur Kontrolle der viralen Genexpression und Virusreplikation bei, ohne dabei einen wesentlichen Leberschaden mit Transaminasenerhöhung im HBV-transgenen Mausmodell zu verursachen (Guidotti et al., 1996). Der retrovirale Transfer unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren befähigt CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen den entsprechenden HBV-spezifischen TZR zu exprimieren und führt zu einer spezifischen polyfunktionalen Zytokinproduktion bei Kontakt mit dem entsprechenden Antigen.

Die C18-spezifischen CD8⁺ T-Zellen waren am sensitivsten und produzierten teils ab einer Antigenkonzentration von 1×10^{-12} M TNF- α . Die S20- bzw. S172-spezifischen CD8⁺ T-Zellen produzierten ab einer Peptidkonzentration von 1×10^{-10} M bzw. 1×10^{-9} M spezifisch TNF- α . Eine höhere Sen-

sitivität von C18-spezifischen im Vergleich zu S20-spezifischen T-Zellen stellten auch Webster und Kollegen fest, mit einer spezifischen IFN- γ -Produktion bei bereits 10-fach geringerer Peptidkonzentration (Webster et al., 2004).

In den mit den HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD4⁺ T-Zellen konnte für die T-Zell-Rezeptoren FLP122, FLP14 und WL31 eine nur geringe bis gar keine spezifische Zytokinproduktion festgestellt werden. Für die restlichen T-Zell-Rezeptoren liegt in den transduzierten CD4⁺ T-Zellen eine Zytokinantwort im Sinne einer Th1-Antwort mit Sekretion von IFN- γ , TNF- α und IL-2 vor. Dabei unterscheidet sich das Zytokinprofil der transduzierten CD4⁺ von den CD8⁺ T-Zellen insbesondere durch eine vermehrte IL-2 Produktion, wie dies auch in der Literatur beschrieben ist (Han et al., 2012). Es konnte somit durch Transduktion von CD4⁺ T-Zellen mit HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren eine T_{H1}-Antwort hervorgebracht werden, wie sie im Verlaufe einer akuten Hepatitis B (Penna et al., 1997) wie auch einer chronischen Hepatitis B beschrieben wurde (Wang et al., 2020).

Das vorwiegend produzierte Zytokin in unseren HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen war TNF- α . Auch bei Wang und Kollegen war in HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus chronisch HBV-Infizierten TNF- α , das dominante Zytokin und scheint mit einem erhöhten Leberschaden assoziiert zu sein (Wang et al., 2020). Eine höhere Rate an IFN- γ produzierenden HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in chronisch Hepatitis B Infizierten ist hingegen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine Viruselimination im Sinne eines HBs-Ag Verlusts assoziiert (Wang et al., 2020). Auch unsere HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen produzierten IFN- γ . Insbesondere für die C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren 6K und C18, die S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren 4G und S20 sowie den S172-spezifischen T-Zell-Rezeptor WL12 waren große Anteile der CD4⁺ T-Zell-Population trifunktional und sezernierten somit auch IFN- γ .

Unsere mit HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierten CD8⁺ T-Zellen produzierten vorwiegend IFN- γ und TNF- α . Ein ähnliches Zytokinprofil wurde auch schon von Gehring et al. nach Transduktion von T-Zellen mit einem Core-spezifischen TZR beschrieben (Gehring et al., 2011b). Der hohe Anteil an IFN- γ und TNF- α produzierenden T-Zellen ist positiv zu werten. Beide Zytokine sind Teil der nicht zytopathischen T-Zell-Antwort gegen HBV und die Blockade dieser Zytokine mittels Antikörper führte zur Persistenz von HBV-DNA und viraler mRNA (Guidotti et al., 1996; Phillips et al., 2010). IFN- γ wirkt dabei auf verschiedenste Weise antiviral (Xia und Protzer, 2017). IFN- γ beeinträchtigt posttranskriptionell die Formierung replikation-kompetenter HBV-Kapside (Wieland et al., 2005; Pasquetto et al., 2002; Xu et al., 2010). Zudem kommt es auch zu einer Hemmung der Transkription von HBV mRNA durch Interferone (Gao et al., 2009; Liu et al., 2013). Des Weiteren induziert IFN- γ die Expression des Enzyms Indoleamine-2,3-Dioxygenase, die an der Metabolisierung von Tryptophan beteiligt ist. Dies führt durch vermehrtem Abbau von Tryptophan zu einer Hemmung der Translation von HBV-Proteinen (Mao et al., 2011). TNF- α führt ebenfalls zu einer Destabilisierung der intrazellulären viralen Kapside und somit zu einer posttranskriptionellen Hemmung der HBV Replikation (Biermer et al., 2003).

IFN- γ und TNF- α führen allerdings nicht nur zu einer transkriptionellen bzw. posttranskriptionellen Hemmung der HBV-Replikation, sondern auch zur Elimination der cccDNA. Denn IFN- γ und TNF- α induzieren eine durch APOBEC3A und APOBEC3B vermittelte Desaminierung der cccDNA,

welche dadurch zur Destabilisierung und zum Abbau der cccDNA führen (Xia et al., 2016). Dabei haben TNF- α und IFN- γ eine additive Wirkung und führen in der Kombination zu einer stärkeren und anhaltenden A3A- und A3B-Expression (Xia et al., 2016). TNF- α und IFN- γ tragen also über diese nicht-zytotoxische Effektorantwort zur Immunkontrolle und zur Elimination des HBV über oben genannte molekulare Angriffspunkte bei, doch ist auch zu beachten, dass die sezernierten Zytokine auch durch ihre pro-inflammatorische Wirkung zur Leberzellschädigung beizutragen scheinen (Wang et al., 2020; Ohta et al., 2000). Des Weiteren führt IFN- γ in infizierten Zellen auch zu einer Hochregulation der MHC-I-Moleküle, die HBV-Epitope präsentieren, und somit auch zu einer stärkeren T-Zell-Aktivierung (Khakpoor et al., 2018).

Durch den retroviralen Transfer der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen erwerben diese modifizierten T-Zellen die Fähigkeit zur spezifischen polyfunktionalen Zytokinproduktion und können somit über die nicht zytotoxische Effektorantwort zur Kontrolle bzw. Elimination des HBV beitragen.

3.4.2 Zellvermittelte Zytotoxizität der transduzierten HBV-spezifischen T-Zellen

Die zellvermittelte Zytotoxizität ist, neben der Produktion antiviraler Zytokine, ein wichtiger Bestandteil der T-Zell-Antwort gegen HBV. Insbesondere für die vollständige Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten in der Ausheilungsphase scheint sie ausschlaggebend zu sein (Thimme et al., 2003). Hierfür wären hoch avide T-Zell-Rezeptoren nötig, die auch bei geringer Peptid-MHC-Dichte eine stabile Bindung an den Peptid-MHC-Komplex zustande bringen (Derby et al., 2001; Kitazono et al., 2011) und eine gezielte Tötung der noch infizierten Hepatozyten ermöglichen.

In den durchgeführten Chromium-Release-Assays konnten wir für alle T-Zell-Rezeptoren nach Transduktion in CD8⁺ T-Zellen EC50-Werte kleiner 1×10^{-9} M feststellen. Bossi und Kollegen konnten zeigen, dass T2 Zellen, die mit Peptiden im nanomolaren Bereich beladen worden waren, nur noch eine niedrige Anzahl von 4–80 Peptiden pro Zelle über MHC-I-Moleküle präsentierten (Bossi et al., 2013). T2-Zellen, die mit Peptidkonzentrationen im nanomolaren Bereich beladen werden, scheinen somit eine ähnliche Epitopdichte wie immunogene Peptide von Tumor-Antigenen in Tumorzellen (Bossi et al., 2013) oder immunogene Peptide von HBV-Antigenen in HBV-infizierten Hepatomazellen (Khakpoor et al., 2018) zu besitzen. Mit EC50-Werten im nano- bis picomolaren Bereich entsprechen unsere HBV-spezifischen T-Zellen daher hoch aviden T-Zellen und sind von ihrem Tötungsvermögen vergleichbar mit anderen antiviralen (Derby et al., 2001; Nauerth et al., 2013) oder HBV-spezifischen T-Zellen (Sobao et al., 2001). Die C18-spezifischen CD8⁺ T-Zellen waren insgesamt am sensitivsten (mit EC50-Werten um 1×10^{-12} M), gefolgt von den S20-spezifischen und den S172-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Innerhalb der Peptidspezifität gab es dabei keine deutlichen Unterschiede zwischen den T-Zell-Rezeptoren.

Die Transduktion der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in CD4⁺ T-Zellen wandelte diese in MHC-I-restringierte zytotoxische T-Zellen um. Nur für die mit den T-Zell-Rezeptoren WL31 und FLP122 transduzierten CD4⁺ T-Zellen konnte keine spezifische Lyse im Sinne einer Effektorantwort festgestellt werden, konkordant zu der ebenfalls fehlenden Zytokinproduktion. Abgesehen von Letzteren konnte somit für alle anderen T-Zell-Rezeptoren eine CD8-unabhängige Effektorantwort nachgewiesen werden. Diese CD8-Unabhängigkeit scheint ebenfalls charakteristisch für hoch avide

T-Zellen zu sein (Snyder et al., 2003; Choi et al., 2003; Laugel et al., 2007).

Zudem ist es interessant, dass die Peptidkonzentration, die benötigt wurde um die halbmaximale Lyse zu erreichen, im Durchschnitt um das 10-fache niedriger war als die Peptidkonzentration, die benötigt wurde um in der Hälfte aller Zytokin⁺ Zellen eine Zytokinproduktion hervorzurufen. Dass bei geringen Antigenkonzentrationen vorwiegend die zytotoxische Effektorfunktion vorliegt und die Aktivierungsschwelle für die spezifische Zytokinproduktion zwischen dem zehnfachen bis hundertfachen höher ist, beschrieben auch Betts und Kollegen (Betts et al., 2004).

Zusammenfassend wandeln die von uns isolierten T-Zell-Rezeptoren T-Zellen in hoch avide HBV-spezifische zytotoxische Effektorzellen um, die auch bei Peptidkonzentrationen im nano- bis picomolaren Bereich noch spezifisch Zielzellen abtöteten.

3.4.3 Erkennung von endogen prozessierten HBV-Peptiden durch die transduzierten HBV-spezifischen T-Zellen

In Hepatomazellen und primären Hepatozyten ist die Dichte an Rezeptoren, die an der Antipräsentation beteiligt sind, im Vergleich zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie dendritische Zellen, B-Zellen oder Monozyten geringer und daher die T-Zell-Aktivierung weniger effizient (Gehring et al., 2007). Daher führten wir auch eine Kokultur mit unseren HBV-spezifischen-T-Zellen und der HBV-replizierenden Hepatomazelllinie HepG2.2.15 durch.

Der Transfer der S20- und C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in T-Zellen befähigte diese HBV-replizierende Hepatomazellen spezifisch abzutöten und IFN- γ zu produzieren (s. Abb. 2.6.3 und Abb. 2.6.4). Im Gegensatz zu den im Chromium-Release-Assay verwendeten TAP-defizienten T2-Zellen, die nur von exogen mit synthetisiertem Peptid beladen werden können (Hosken und Bevan, 1990), werden in den Hepatomazellen HepG2.2.15 virale Proteine vom integrierten HBV-Genom exprimiert, mittels dem Immunoproteasom endogen prozessiert und dann über den Antigenpeptid-Transporter TAP (*transporter associated with antigen processing*) ins endoplasmatische Retikulum transportiert, wo die Peptide dann an die MHC-I-Komplexe binden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Peptide C18 und S20 auch durch endogene Prozessierung generiert werden und auf dem HLA-A*02:01-Molekül in ausreichender Dichte präsentiert werden, um von T-Zellen erkannt zu werden. Auch Khakpoor und Kollegen zeigten, dass das C18- und das S20-Peptid sowohl in infizierten Hepatozyten (primäre humane Hepatozyten und HepG2-HNTCP-A3) als auch in Hepatomazellen mit integriertem HBV-Genom (HepG2.2.15) in ausreichender Dichte per HLA-A*02:01-Molekül präsentiert wird um zu einer T-Zell-Aktivierung zu führen. Allerdings stellten sie fest, dass die Dichte des S20-Peptid/HLA-A*02:01-Komplex im Vergleich zum C18-Peptid/HLA-A*02:01-Komplex in den HepG2.2.15 Zellen höher war als in den mit HBV infizierten HepG2-HNTCP und somit auch zu einer stärkeren T-Zell-Aktivierung führte (Khakpoor et al., 2018). In unserem Fall waren die C18-spezifischen T-Zellen sensitiver in der Erkennung von HepG2.2.15 als die S20-spezifischen T-Zellen. Dies könnte daran liegen, dass unsere Core-spezifischen T-Zellen deutlich avider sind als unsere S20-spezifischen T-Zellen (siehe hierzu auch Kapitel 2.6.1 und 2.6.2).

Hingegen konnte für die S172-spezifischen T-Zellen keine ausreichende Lyse oder IFN- γ -Produktion in der Kokultur mit HepG2.2.15 nachgewiesen werden (s. Abb.2.6.5). Um der Frage nachzugehen, warum das S172-Peptid möglicherweise generell nicht per endogener Prozessierung auf HLA-A*02:01

präsentiert wird, setzten wir für je einen T-Zell-Rezeptor pro Peptid-Spezifität eine Kokultur mit HBV-infizierten HepaRG als Zielzellen an. Dabei konnten wir in der Kokultur mit HBV-infizierten HepaRG-Zellen und TZR WL12⁺ T-Zellen eine schwache aber spezifische IFN- γ -Sekretion nachweisen. In weiteren Versuchen, die nach dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass transduzierte S172-spezifische T-Zellen nicht nur HBV-infizierte HepaRG-Zellen spezifisch lysierten und spezifisch IFN- γ produzierten, sondern dass dadurch auch eine Verringerung der cccDNA in den Zielzellen und des HBsAg im Überstand erreicht werden konnte (Wisskirchen et al., 2017). Ebenso konnte auch eine spezifische IFN- γ -Sekretion von S172-spezifischen T-Zellen nach Kokultur mit HLA-A*02:01⁺ HeLa-Zellen festgestellt werden (Wisskirchen et al., 2017). HepaRG-Zellen sind dabei eine von humanen Hepatozyten abgeleitete Zelllinie, die, wenn sie differenziert wurde, vom Phänotyp als auch vom Zellmetabolismus primären humanen Hepatozyten sehr ähnlich ist (Gripon et al., 2002). Möglicherweise ähnelt sie darum auch bezüglich der Peptid-Prozessierung humanen Hepatozyten eher als die HepG2.2.15-Hepatoma-Zelllinie. Auch in einer lymphoblastoiden Zelllinie, die mit rekombinierten Vakzinia-Viren, die das HBsAg enthielt, infiziert worden war, fand eine korrekte endogene Prozessierung des S172-Peptids und folglich eine spezifische Lyse der Zielzellen durch S172-spezifische T-Zell-Klone statt (Nayersina et al., 1993). Das S172-Peptid wird also in anderen Zellen prozessiert und per HLA-A*02:01-Molekül ausreichend präsentiert. Dass die S172-spezifischen T-Zellen unsere Form der HepG2.2.15 Hepatomazellen nicht spezifisch lysierten, könnte an mehreren Faktoren liegen:

1. Das S172-Peptid wird in den HepG2.2.15 nicht oder nur in sehr geringen Mengen prozessiert, da z.B. nicht die richtige Kombination an Proteasomuntereinheiten für die korrekte und effiziente Peptid-Prozessierung in den HepG2.2.15 Zellen vorliegt. Möglicherweise könnte eine Zugabe von IFN- γ eine erfolgreiche Peptid-Prozessierung ermöglichen (Sijts et al., 2000).
2. Eine geringere Bindungsaffinität des Peptids zum HLA-A*02:01-Molekül wäre theoretisch ein möglicher weiterer Grund. Das S172-Peptid weist jedoch eine hohe Bindungskapazität auf, vergleichbar mit der Bindungskapazität des C18-Peptids, sodass dies als Ursache unwahrscheinlich ist (Bertoni et al., 1997; Nayersina et al., 1993; Lee et al., 1997).
3. Ein weiterer Faktor zusätzlich zu den zwei oben genannten Gründen könnte auch eine geringe MHC-I-Expression sein. Diese würde ebenfalls dazu führen, dass die S172-spezifischen T-Zellen die HepG2.2.15 Zellen schlechter bzw. nicht erkennen. Dieser Faktor ist aber sicher von geringerer Relevanz, da die MHC-I-Expression für die anderen von uns getesteten HBV-Peptide ausreichend war und auch in anderen Arbeiten die MHC-I-Expression in HepG2.2.15 ausreichend für eine T-Zell-Aktivierung war (Gehring et al., 2007; Khakpoor et al., 2018).
4. Eine Mutation im Bereich der codierenden Sequenzen für das S172-Peptid in den HepG2.2.15 könnte zu einer Änderung der Peptidsequenz führen. In der Literatur wurde bis jetzt jedoch keine Mutation in diesem Bereich festgestellt und das S172-Peptid als stark konservierte Region beschrieben (Nayersina et al., 1993; Rehmann et al., 1995b). Um das sehr unwahrscheinliche Vorliegen einer spontanen Mutation während der Zellkultivierung im Bereich des integrierten HBV-Genoms auszuschließen, könnte ggf. eine PCR vom integrierten HBV-Genom durchgeführt werden mit anschließender Sequenzierung des PCR-Produkts.

Trotz des Erkennens von HBV infizierten HepaRG-Zellen durch unsere S172-spezifischen T-Zell-

Rezeptoren, wäre eine Kokultur mit primären humanen Hepatozyten sinnvoll, um festzustellen, ob das S172-Peptid auch in primären Hepatozyten prozessiert und ausreichend mittels MHC-I präsentiert wird. Nichtsdestotrotz konnten wir zeigen, dass alle unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auch ihre Epitope nach endogener Peptidprozessierung und MHC-I-Beladung erkennen und somit eine wichtige Voraussetzung für die *in vivo* Versuche und späteren klinischen Versuche erfüllen.

3.4.4 Vergleich der MHC-Restriktion von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Die aus HLA-A*02:01⁺ Patienten isolierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannten das entsprechende HBV-Peptid auch auf anderen HLA-A*02-Subtypen (siehe Kapitel 2.6.4). Dabei wurden, bis auf HLA-A*02:08, 11 der 12 getesteten HLA-A*02-Subtypen mindestens von einem HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt. Dass diese drei HBV-Peptide im Sinne einer unselektiveren T-Zell-Erkennung von T-Zell-Linien auf verschiedenen HLA-A2-Subtypen erkannt werden, stellte auch Bertoni et al., 1997 für die Subtypen A*02:02, A*02:03, A*02:06 fest.

Immunogene natürliche T-Zell-Peptide haben meist HLA-Affinitäten von unter 500 nM (Sette et al., 1994). Für die Peptide C18, S20 und S172 konnte z.B. eine hohe HLA-Bindungsaffinität zu den HLA-A2-Subtypen A*02:02, A*02:03, A*02:06 mit IC₅₀-Werten unter 50 nM festgestellt werden, mit Ausnahme der Bindungskapazität des HLA-A2-Subtyps A*02:02, für die die beiden S-spezifischen Peptide einen IC₅₀-Wert um die 100 nM besaßen (Bertoni et al., 1997). Dass T-Zell-Rezeptoren einer Epitopspezifität manche dieser 3 HLA-Subtypen nicht erkennen, scheint damit nicht allein mit einer generell instabilen Peptid-MHC-I-Bindung erklärt werden zu können, sondern möglicherweise eher durch die unterschiedliche Fähigkeit der T-Zell-Rezeptoren den Peptid-HLA-A2-Subtyp-Komplex zu binden.

Die HLA-Subtypen HLA-A*02:06, HLA-A*02:07 unterscheiden sich zum HLA-A*02:01 in einer Aminosäure, dass HLA-A*02:03 in drei. Die Unterschiede in der Proteinsequenz liegen dabei alle im Peptidbindenden-Spalt vor und können dadurch die Bindungskonformation der zu präsentierenden Peptide beeinflussen (Liu et al., 2011). Kristallstrukturanalysen vom C18-Peptid auf HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07 ergaben dabei die größte sterische Hinderung zwischen der Bindungstasche des HLA-A*02:03 und dem Core-Peptid, welche zu einer reduzierten Bindungsaffinität führte (Liu et al., 2011) und eventuell erklären könnte, warum alle unsere C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren das C18 Peptid nicht auf A*02:03⁺ Zielzellen erkennen konnten.

Durch die Fähigkeit unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren, das entsprechende HBV-Peptid auf verschiedenen HLA-A2-Subtypen zu erkennen, können unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auch in Ländern bzw. Weltregionen eingesetzt werden, in denen der HLA-A*02:01-Subtyp sehr niedrig ist bzw. andere HLA-A*02-Subtypen in der Bevölkerung dominieren (s. Abb. 2.6.8 a, b). Wären unsere T-Zell-Rezeptoren strikt auf das HLA-A*02:01-Molekül restringiert, könnten in Nordostasien (China und Hong Kong) nur 14,33 % der Bevölkerung (berechnet mit dem Analysetool „*population coverage*“ von IEDB.org) potentiell mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren behandelt werden. Durch die zusätzliche Erkennung der HLA-Subtypen A*02:06, A*02:07 und A*02:03 durch einen Teil unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren kann aber ein dreifach größerer Anteil der chinesischen Bevölkerung, nämlich 44,36 %, theoretisch mit unseren HBV-spezifischen

T-Zell-Rezeptoren im Sinne einer adoptiven T-Zell-Therapie therapiert werden. Durch das Vorliegen eines T-Zell-Repertoires könnten abhängig von der Population, die behandelt werden soll, die T-Zell-Rezeptoren verwendet werden, die die häufigsten HLA-A2-Subtypen in der Population erkennen würden. Es ist aber auch hervorzuheben, dass allein durch die Kombination des C18-spezifischen TZR 5E und des S20-spezifischen TZR 4G, alle HLA-A2-Subtypen abgedeckt wären, die durch unsere T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Dies hätte den Vorteil, dass in Anbetracht der kostenintensiven klinischen Testung und Aufbereitung unter GMP-Bedingungen auch bereits mit diesen zwei hoch aviden T-Zell-Rezeptoren theoretisch 44,3 % der Weltbevölkerung behandelt werden könnten – unter der etwas vereinfachten Annahme, dass nur die HLA-Restriktion limitierender Faktor für die Verwendung in einer Patientenpopulation ist.

Die Erkennung der HLA-A2-Subtypen A*02:06, A*02:07 und A*02:03 ist insbesondere daher von Relevanz, da 68 % aller chronisch Hepatitis B Infizierten aus der westpazifischen Region (115 Millionen Infizierte) oder aus Afrika (60 Millionen) kommen (WHO, 2017). Der Großteil der HBV-Infizierten in der westpazifischen Region leben dabei in China. Im Jahr 2018 waren in China schätzungsweise 84 Millionen Menschen HBsAg positiv (Wang et al., 2019).

Der HLA-A2-Subtyp A*02:07 wurde von allen T-Zell-Rezeptoren erkannt. Der HLA-A2-Subtyp A*02:06 wurde nur von den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren FLP14, FLP122 und 5E sowie dem S172-spezifischen TZR WL31 gut erkannt, aber nicht von S20-spezifischen T-Zellen. Es können durch die Erkennung von A*02:06 weitere 5 % der chinesischen Bevölkerung mit diesen T-Zell-Rezeptoren potentiell therapiert werden. Der S20-spezifische TZR 4G erkannte wiederum als einziger der elf getesteten T-Zell-Rezeptoren den HLA-A2-Subtyp A*02:03 und wäre damit in 38,1 % der chinesischen Bevölkerung potentiell einsetzbar.

Allerdings ist bei der Abschätzung, wieviele Patienten für die Behandlung mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in Frage kommen könnten, ein weiterer Faktor miteinzubeziehen – die HBV-Genotypenverteilung. Dies ist von Relevanz, da für die verwendeten Epitope (C18, S20 und S172) genotypische Variationen in der Peptidsequenz vorliegen und diese Auswirkung auf die Peptid-MHC sowie die T-Zell-Erkennung haben können. Zudem gibt es deutliche geographische Unterschiede, so sind es in Europa vorwiegend die HBV-Genotypen A/D, die in Infizierten zu finden sind, in China hingegen vorwiegend die Genotypen B/C. Es sind schätzungsweise 92 % der chronischen HBV-Infektionen in China auf die Genotypen B/C zurückzuführen (Velkov et al., 2018). Dass diese Unterschiede in der Verteilung der HLA-A2-Subtypen sowie der Verteilung HBV-Genotypen Auswirkung auf das natürliche T-Zell-Repertoire in der chinesischen bzw. kaukasischen Bevölkerung hat, konnten Tan et al., 2008 zeigen.

Im Anschluss an die vorliegende Arbeit wurde daher eine weitere LCL-Kokultur durch Karin Wisskirchen durchgeführt, um zu überprüfen, ob unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren die genotypischen Variationen der HBV-Peptide (C18: FLPSDFFPSI, S20: FLLTKILTI, S172: WLSLLVQFV) auch auf den in China häufigen HLA-A*02-Subtypen erkennen. Transduzierte HBV-spezifische T-Zellen wurden mit A*02:01⁺ bzw. A*02:06⁺ oder A*02:07⁺ lymphoblastoiden Zelllinien kokultiviert, die mit den entsprechenden HBV-Peptiden beladen worden waren. Alle C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren, bis auf den TZR 6K und 7D, erkannten die C18-Peptid-Variante „FLPSDFFPSI“ auf den A*02:06⁺ oder A*02:07⁺ Zielzellen nur unwesentlich schlechter als das C18-Peptid des

Genotyps A/D (FLPSDFFPSV). Bei den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren war der TZR 4G wieder der stärkste. Er erkannte alle getesteten Peptid-HLA-Subtyp-Kombinationen, nur die S20-Peptid-Variante „FLLTKILTI“ präsentiert auf A*02:06⁺ nicht. Die S172-Peptid-Variante „WLSLLVQFV“ wurde auf den A*02:01⁺ oder A*02:07⁺ nicht aber auf den A*02:06⁺ Zielzellen erkannt (Wisskirchen et al., 2017). Eine weitere genauere funktionelle Testung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren mit diesen genotypischen Variationen der Peptide C18, S20 und S172 wäre sinnvoll, denn die genotypischen Variationen in den Epitopen können mit einer schnelleren Dissoziation der Peptide von den HLA-Molekülen einhergehen und somit Auswirkung auf die Sensitivität der T-Zell-Antwort haben (Tan et al., 2008).

In unserer Modellrechnung zur Bestimmung der Anzahl an potentiellen Patienten für eine adoptive T-Zell-Therapie (siehe Kapitel 2.6.4) bezogen wir die HLA-A2-Subtypenverteilung sowie die HBV-Genotypenverteilung pro Land mit ein. China weist mit 29 Millionen Patienten, die einen HLA-Subtyp tragen und einen HBV-Genotyp tragen, der von mindestens einem unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannt wird, am meisten potentielle CHB-Patienten für eine adoptive T-Zell-Therapie auf, gefolgt von Indien mit um die 4,4 Millionen CHB-Patienten. Insgesamt könnten nach unserer Modellrechnung mindestens 60 Millionen chronisch Hepatitis B-Infizierte mit unseren HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren behandelt werden.

Unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren können demnach, über die HLA*A2:01⁺ Population hinaus, auch für die in den HBV-Epidemiegebieten häufig vorkommenden A*02:03⁺, A*02:06⁺ und A*02:07⁺ Populationen angewendet werden und wären potentiell in 60 Millionen Patienten mit chronischer Hepatitis B einsetzbar.

3.5 Expression und Funktionalität der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in murinen T-Zellen

Es wurde bereits gezeigt, dass der Transfer von HBV-spezifischen murinen T-Zellen eine Immunkontrolle des HBV in Mausmodellen der chronischen Hepatitis B ermöglicht (Guidotti et al., 1996). Gehring und Kollegen (Gehring et al., 2011a) transferierten per retroviraler Transduktion gentechnisch modifizierte humane HBV-spezifische T-Zellen in immunkompromittierte Mäuse, denen zuvor die humane HBV-Antigene exprimierende Hepatomazelllinie HepG2 injiziert wurde. Damit konnten sie zeigen, dass der adoptive Transfer von HBV-spezifischen T-Zellen eine Therapiemöglichkeit für das HBV-induzierte hepatozelluläre Karzinom sein könnte.

Um jedoch Aussagen treffen zu können, ob der Transfer von allogenen oder autologen gentechnisch veränderten T-Zellen eine Therapiemöglichkeit für die chronische Hepatitis B darstellen könnte, sind andere *in vivo* Mausmodelle nötig, in denen z.B. die Antigendichte und ihr Einfluss auf die T-Zell-Exhaustion und das immunsupprimierende Milieu der Leber simuliert wird (Guidotti et al., 1995; Inuzuka et al., 2014). Wir kreuzten deshalb die als chronisches HBV-Modell etablierte Mauslinie HBV1.3 (Guidotti et al., 1995) mit der Mauslinie HHD2 (Pascolo et al., 1997), die das modifizierte humane HLA-A*02:01 „HHD“ exprimiert und generierten somit die Mauslinie HBV-A2. Die Idee ist unsere HLA-A*02:01 restringierten HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in diesem *in-vivo-Modell* der chronischen Hepatitis B weiter zu untersuchen. In den hier erwähnten Vorversuchen konnte

gezeigt werden, dass unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren auch in murinen T-Zellen exprimiert werden und diese in HBV-spezifische Effektorzellen umwandeln. Interessant ist dabei, dass, wie bei den humanen CD4⁺ T-Zellen, auch in den murinen T-Zellen deutliche Unterschiede bezüglich der Streptamerbindung auffielen. Wie bei den humanen CD4⁺ T-Zellen korreliert die Streptamerbindung dabei nicht mit der funktionellen Avidität wie auch von anderen Forschungsgruppen beschrieben (Hombrink et al., 2013; Bentzen et al., 2016). Nach neueren Erkenntnissen lassen sich allein aus der Stärke der Multimerbindung eines T-Zell-Rezeptors keine verlässlichen Angaben zur Avidität einer T-Zelle machen, sondern es scheinen auch andere Faktoren wie z.B. kraftabhängige Wechselwirkungen zwischen TZR und pMHC Auswirkungen auf die T-Zell-Aktivierung zu haben (siehe Kapitel 3.3). Zudem konnten wir zeigen, dass die HBV-Peptide auf dem modifizierten HLA.A*02:01 HHD nach Peptid- Beladung präsentiert und durch unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Dabei scheint auch die Expression des HHD-Moleküls auf den murinen Leberzellen ausreichend zu sein, wie die Kokultur der transduzierten B3Z-Zellen mit Peptid-beladenen HHD⁺ primär murinen Hepatozyten zeigte. Um MHC- bzw. Antigenichte des HBV-A2 Mausmodell *in vitro* noch besser zu imitieren, könnten auch primäre murine Hepatozyten aus HBVA2 Mäusen isoliert werden und dann mit transduzierten HBV-spezifischen murinen T-Zellen kultiviert werden. Die Ergebnisse der oben genannten Voruntersuchungen sind daher vielversprechend, dass sich das HBV-A2 Mausmodell für die *in vivo* Testung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren eignet. Die Befürchtung, dass in HLA-A2-transgenen Mäusen durch eine andere Prozessierungsmaschinerie andere Peptide prozessiert und präsentiert werden und somit andere T-Zell-Epitope von Relevanz sind, wurde widerlegt. So konnte nach Impfung von HLA-A2 transgenen Mäuse mit HBV-Antigenen eine Immunantwort gegen die Peptide C18 und S172 nachgewiesen werden (Wentworth et al., 1996) sowie in einem HBsAg/HLA-A*02 transgenen Mausmodell nach DNA-Impfung eine CD8⁺ Immunantwort gegen das S20-Peptid (Loirat et al., 2003).

Ein Nachteil des HBV-A2 Mausmodell ist, dass man mit diesem nicht nachweisen kann, ob der adoptive T-Zell-Transfer auch zur wünschenswerten Elimination der cccDNA führen würde, da das HBV-Genom als Transgen im Genom des Wirts integriert ist und nicht in Form von cccDNA in den Hepatozyten vorliegt.

Dieser Fragestellung kann jedoch in einem Mausmodell, bei dem humane HLA-A*02:01⁺ Hepatozyten in immundefiziente Mäuse xenotransplantiert und anschließend mit HBV infiziert werden (Allweiss et al., 2014), nachgegangen werden. In diesem Mausmodell konnte in späteren Experimenten durch Karin Wisskirchen und Kollegen gezeigt werden, dass transferierte humane HBV-spezifische T-Zellen infizierte Hepatozyten spezifisch eliminieren und cccDNA nach der Behandlung nicht mehr nachweisbar ist (Wisskirchen et al., 2019).

Die möglichen Wechselwirkungen der transferierten gentechnisch modifizierten T-Zellen mit dem endogenen HBV-toleranten Immunsystem des Empfängers könnten wiederum besser im HBV-A2 Mausmodell untersucht werden, sodass auch dieses Modell weiterhin untersucht werden sollte. Andere interessante Mausmodelle zur Untersuchung der adoptiven T-Zell-Therapie der chronischen Hepatitis B wäre die HBV-Transfektion mittels Adeno-assoziiertem Virus von HLA-A*02:01⁺ Mäusen (Huang et al., 2012; Dion et al., 2013) oder die HBV-Infektion von humanisierten Mäusen mit humanem Immunsystem und humanen Hepatozyten, wie es bereits von Washburn et al., 2011 für HCV

beschrieben wurde.

Letztendlich konnten unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in murine T-Zellen exprimiert werden und eine spezifische Effektorantwort hervorrufen. Dies ermöglicht die weitere Untersuchung unserer T-Zell-Rezeptoren sowie das Therapieverfahren der adoptiven T-Zell-Therapie der Hepatitis B in murinen Mausmodellen, wie u. a. dem HBV-A2 Mausmodell, um somit weitere wichtige präklinische *in vivo* Daten zu generieren.

3.6 Zusammenfassende Bewertung der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Alle HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren führten, transduziert in CD8⁺ T-Zellen, zu einer starken antiviralen Effektorantwort. Die C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren waren allerdings im Vergleich zu den S-spezifischen T-Zell-Rezeptoren insbesondere in der spezifischen Lyse der T2-Zellen und der Hepatomazellen sensitiver. C18-spezifische T-Zellen sind bekannterweise in der akuten HBV-Infektion die dominierende T-Zell-Population (Maini et al., 1999) und scheinen auch in chronisch HBV-Infizierten die häufigste und zugleich gegen T-Zell-Dysfunktion robusteste T-Zell-Population zu sein (Schuch et al., 2018). Auch scheint der Anteil an HBV-Core-spezifischen CD4⁺ T-Zellen höher als der Anteil an HBsAg-spezifischen T-Zellen in Knochenmarkspender und den dazugehörigen Empfängern nach HBsAg-Elimination zu sein und ist daher mit Ausheilung der chronischen Hepatitis B assoziiert (Lau et al., 2002). Es ist daher sicher von Vorteil hoch avide C18-spezifische T-Zellen für die adoptive T-Zell-Therapie der Hepatitis B zu benutzen. Allerdings sind auch die Surface-spezifischen T-Zell-Rezeptoren nicht zu vernachlässigen. Einerseits scheinen die Surface-Epitope bei Hepatoma-Zellen stark exprimiert zu werden (Khakpoor et al., 2018) und somit eignen sich S-spezifische T-Zellen zur Immuntherapie des HBV-assoziierten HCC, andererseits könnte auch gerade der geringere Nachweis von S-spezifischen T-Zellen in chronisch Hepatitis B Infizierten dafür sprechen, dass diese zur Elimination einer chronischen HBV-Infektion notwendig sind (Schuch et al., 2018).

Die größten Unterschiede zwischen den T-Zell-Rezeptoren bezüglich der funktionellen Avidität waren in den CD4⁺ T-Zellen vorzufinden. Durch Verwendung von CD4⁺ T-Zellen in der adoptiven T-Zell-Therapie – allein oder in Kombination mit CD8⁺ T-Zellen – kann möglicherweise die Wirksamkeit weiter gesteigert werden (Muranski und Restifo, 2009; Kamphorst und Ahmed, 2013). Der Transfer von CD4⁺ T-Zellen scheint dabei sowohl in der adoptiven Therapie von Malignomen (Kahn et al., 1991; Surman et al., 2000; Hunder et al., 2008) als auch von chronischen Viruserkrankungen durch Triggerung oder Verstärkung der antitumoralen bzw. antiviralen Immunantwort erfolgversprechend zu sein (Aubert et al., 2011). In einem Mausmodell zur Therapie des HBV-assoziierten hepatozellulären Karzinoms mittels adoptivem T-Zell-Transfer konnte gezeigt werden, dass sowohl der Transfer von S20-spezifischen CD8⁺ als auch der CD4⁺ zur vollständigen Tumorelimination notwendig ist (Koh et al., 2013).

Eine funktionierende CD4⁺ T-Zell-Funktion ist auch für die Immunkontrolle des HBV wichtig (Ferrari et al., 1990). Eine frühe CD4⁺ T-Zell-Antwort scheint dabei ausschlaggebend für eine effektive und koordinierte CD8⁺ T-Zell-Antwort und einen akuten selbstlimitierenden Verlauf der

HBV-Infektion zu sein. Im Gegensatz dazu scheint eine verlangsamte oder fehlende CD4⁺ T-Zell-Antwort zu einer chronischen HBV-Infektion zu führen, trotz Vorliegen von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Asabe et al., 2009).

Die CD4⁺ T-Zellen scheinen dabei nicht nur wichtig für die Initiierung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zell-Antwort und für die Antikörperproduktion zu sein, sondern auch für die Wiederherstellung von dysfunktionalen CD8⁺ Effektor-T-Zellen (Kamphorst und Ahmed, 2013). Für die chronische Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus-Infektion wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass durch Transfer von CD4⁺ T-Zellen sowohl die Dysfunktion von CD8⁺ T-Zellen wieder aufgehoben als auch eine spezifische B-Zell-Antwort ausgelöst werden konnte (Aubert et al., 2011). Auch in chronisch HBV-Infizierten liegt eine Dysfunktion HBV-spezifischer T-Zellen vor (Fiscaro et al., 2010). Die „*T-cell exhaustion*“ der CD8⁺ T-Zellen, durch chronische Überstimulation mit viralen Antigenen und dem immunsuppressiven Milieu in der Leber, könnte somit möglicherweise durch den Transfer von HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen überwunden werden. Das Ziel einer Immuntherapie der chronischen HBV-Infektion wäre deshalb sowohl die Anzahl und Potenz HBV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen als auch die Anzahl der CD4⁺-Helferzellen zu erhöhen (Protzer et al., 2012).

Bei Verwendung MHC-I-restringierter T-Zell-Rezeptoren in CD4⁺ T-Zellen ist für eine ausreichende antigenspezifische Immunantwort eine hohe TZR-Affinität nötig, die eine stabile TZR:Peptid:MHC-Bindung auch ohne CD8-Korezeptor ermöglicht (Stone und Kranz, 2013). Diese hohe Affinität kann z.B. durch Verwendung gentechnisch modifizierter hoch avider T-Zellen (Soto et al., 2013) oder durch gleichzeitigen Transfer des CD8-Korezeptors (Xue et al., 2013) erreicht werden. Erstaunlicherweise wurden fast alle unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in CD4⁺ T-Zellen unabhängig vom CD8-Korezeptor exprimiert und zeigten zudem eine spezifische Th1-Zytokinproduktion mit polyfunktionaler Zytokinproduktion von IFN- γ , TNF- α und IL-2.

Die mit den HBV-spezifischen transduzierten CD4⁺ T-Zellen wiesen dabei im Vergleich zu den transduzierten CD8⁺ T-Zellen eine vermehrte IL-2 Produktion auf. Die spezifische IL-2 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen ist wichtig für eine funktionierende antivirale CD8⁺ T-Zell-Antwort (Lichterfeld et al., 2004; Smyk-Pearson et al., 2008) und verhindert bzw. hebt möglicherweise den dysfunktionalen Zustand von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im immunsuppressiven Lebermilieu auf. Bénéchet et al., 2019 konnten nämlich in einem Hepatitis B Mausmodell demonstrieren, dass durch die Applikation von IL-2 der durch falsches „Priming“ verursachte dysfunktionale Zustand von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wieder behoben werden konnte.

Zudem konnte teils auch eine direkte zellvermittelte Zytotoxizität durch den TZR-Transfer in CD4⁺ T-Zellen erreicht werden, wenn auch geringer als in CD8⁺ T-Zellen. Die geringere zellvermittelte Zytotoxizität der TZR⁺ CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger hoher polyfunktionaler Zytokinproduktion könnte dabei in der adoptiven T-Zell-Therapie den Vorteil haben, dass es zu einer geringen Leberschädigung kommt bei gleichzeitig indirekter Zytokin vermittelter Elimination der cccDNA. Die von T-Zellen sezernierten Zytokine wie z.B. IFN- γ und TNF- α führen dabei nicht nur zur Elimination der cccDNA, sondern greifen an verschiedenen Punkten in den Lebenszyklus des HBV antiviral ein (Xia und Protzer, 2017; Xia et al., 2016). Bei *in vitro* Experimenten, anschließend an die Versuche zu dieser Arbeit, konnte Wisskirchen et al., 2019 zeigen, dass nach Blockade der Zytokine IFN- γ und TNF- α mittels Antikörper die

Fähigkeit der CD4⁺ T-Zellen zur cccDNA Elimination reduziert war. In den CD8⁺ T-Zellen war im Gegensatz dazu weiterhin eine starke Reduktion der cccDNA Level trotz Blockade der Zytokine IFN- γ und TNF- α zu verzeichnen. Ob die alleinige Verwendung von HBV-spezifischen CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen oder die Kombination beider in der adoptiven T-Zell-Therapie der chronischen Hepatitis B sinnvoll wäre bzw. in welcher Form die HBV-spezifische CD8⁺-T-Zell-Antwort durch Kotransfer mit HBV-spezifischen CD4⁺-T-Zellen verbessert wird, muss allerdings noch in weiteren *in vitro* und insbesondere *in vivo* Versuchen überprüft werden.

Vergleicht man die einzelnen T-Zell-Rezeptoren der jeweiligen Peptidspezifität hinsichtlich der Effektorfunktionen in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und der Erkennung von HLA-A2 Subtypen ergibt sich Folgendes:

In den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren zeigten alle T-Zell-Rezeptoren bis auf den T-Zell-Rezeptor FLP122 eine starke Effektorantwort, wobei die TZR 6K und 5E die höchste Avidität aufwiesen. Allerdings erkannten die T-Zell-Rezeptoren 5E und FLP14 am meisten HLA-A*02-Subtypen von den C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren und sind somit potentiell in einer größeren Patientenpopulation anwendbar. Der C18-spezifische TZR C_AB von Antonio Bertoletti's Arbeitsgruppe gehört anhand der hervorgerufenen Effektorfunktion in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen ebenfalls zu den hoch aviden C18-spezifischen T-Zell-Rezeptoren. Die Fähigkeit HLA-A2-Subtypen zu erkennen wurde für den TZR C_AB allerdings nicht geprüft.

In den S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren waren die Unterschiede eindeutiger. Hier fiel vor allem der hoch averse TZR 4G auf, der insbesondere in den CD4⁺ T-Zellen eine starke Effektorantwort zeigte. Des Weiteren war der TZR 4G der einzige S20-spezifische TZR, der transduziert in CD4⁺ T-Zellen eine signifikant IFN- γ Produktion nach Kokultur mit den HBV-replizierenden Hepatomazellen hervorrief. Die mit dem TZR 4G transduzierten T-Zellen erkannten zudem in der S20-spezifischen Gruppe am meisten HLA-A2-Subtypen.

Bei den S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wies der TZR WL12 die bessere Effektorantwort auf, insbesondere in den CD4⁺ T-Zellen, allerdings erkannte der TZR 31 mehr HLA-A2-Subtypen.

Die hoch aviden T-Zell-Rezeptoren 6K, 5E, 4G und WL12 stammen dabei alle aus dem Spender 1 (siehe 2.1), bei dem bereits vor 25 Jahren eine akute Hepatitis B ausgeheilt war, während die niedrig aviden T-Zell-Rezeptoren aus den akut infizierten Spendern isoliert worden waren. Interessanterweise konnten aus dem Blut des Spenders nicht direkt *ex vivo* HBV-spezifische T-Zellen per Tetramerfärbung isoliert werden. Normalerweise geht man davon aus, dass mittels Tetramerfärbung etwa 0,1–1,1% HBV-spezifischer T-Zellen (im peripheren Blut) akut HBV-Infizierter vorzufinden sind (Urbani et al., 2002). Dass hoch averse HBV-spezifische T-Zellen aus einem Spender mit seit Jahren ausgeheilten Hepatitis erst nach erneuter Stimulation dedektierbar waren, könnte durch das Vorhandensein kleiner Populationen HBV-spezifischer zentraler Gedächtnis-T-Zellen zu erklären sein. Die hoch aviden T-Zell-Rezeptoren 6K, 5E, 4G und WL12 sind möglicherweise durch wiederholte Antigenexposition einer stärkeren Selektion für hoch averse T-Zell-Rezeptoren unterzogen worden (Busch und Pamer, 1999).

Wir haben somit einerseits für jede der drei Peptidspezifitäten hoch averse T-Zell-Rezeptoren (6K, 5E, 4G und WL12) isolieren können, haben aber auch einige T-Zell-Rezeptoren mit niedrigerer Avidität. Dies könnte von daher interessant sein, da es aktuell auch zu einem gewissen Umdenken bezüglich der

anzustrebenden Avidität bei Antigenrezeptoren in der adoptiven T-Zell-Therapie kommt (D’Ippolito et al., 2019). Denn in der klinischen Anwendung von hoch aviden Antigen-Rezeptoren zeigte sich, dass hoch avide Antigen-Rezeptoren zwar einerseits zu einer hohen Effektorantwort gegen das Zielantigen führen, aber auch mit einer erhöhten On- and Off-Target Toxizität einhergehen (Johnson et al., 2009; Linette et al., 2013). Es wird daher u. a. von d’Ippolito und Kollegen postuliert, dass weniger avide Antigenrezeptoren zu einem geringeren Nebenwirkungsprofil und somit zu einer besseren Therapiesicherheit führen (D’Ippolito et al., 2019). Dabei könnten entweder mehrere Antigenrezeptoren mit verschiedener Avidität gleichzeitig dem Patienten verabreicht werden oder der Patient erhält bei hoher Antigenlast zunächst weniger avide T-Zellen und dann zur vollständigen Antigen-Eradikation bzw. Therapieerhaltung hoch avide T-Zellen.

Zusammenfassend konnten wir hoch avide T-Zell-Rezeptoren gegen 3 bekannte immunogene HBV-Peptide isolieren, die sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen in starke HBV-spezifische Effektorzellen umwandeln. Zudem decken wir mit unserem TZR-Repertoire ein breites Spektrum an HLA-A2-Subtypen ab, darunter auch die in Asien gehäuft vorkommenden HLA-Subtypen HLA*A2:03 und HLA*A2:06 und HLA*A2:07 - der Kontinent in dem 75% aller chronisch HBV-Infizierten leben (Merican et al., 2000). Mit diesen Eigenschaften sind unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren für die adoptive T-Zell-Therapie der Hepatitis B bestens geeignet. Wir erhoffen uns dadurch die starke multispezifische T-Zell-Antwort, wie sie beim akuten Verlauf der Hepatitis B zu beobachten ist und die zur Eliminierung des Virus führt, mit diesen T-Zell-Rezeptoren nach retroviraler Transduktion in T-Zellen imitieren zu können.

3.7 Bewertung des adoptiven T-Zell-Transfers mit natürlichen T-Zell-Rezeptoren als Immuntherapie der chronischen Hepatitis B und Ausblick

Die Idee, dass die adoptive T-Zell-Therapie eine potentielle kurative Therapie der chronischen Hepatitis B sein kann, begann, als Shouval und Kollegen 1995 erstmals berichteten, dass in einem chronisch HBV-infizierten Patienten nach Erhalt von Knochenmarkzellen aus einem Anti-HBc und Anti-HBs positiven Spender, HBsAg und die HBV-DNA verschwanden und eine Serokonversion zu Anti-HBs statt fand (Shouval und Ilan, 1995). In weiteren Studien wurde dies bestätigt und gezeigt, dass eine Serokonversion von HBsAg zu Antikörper gegen das HBsAg (Anti-HBs) nur zustande kommt, wenn der Knochenmarkspender eine natürliche Immunität (Anti-HBc⁺, Anti-HBs⁺) besaß. Eine alleinige Immunisierung der Knochenmarkspender (Anti-HBs) führte nicht zu einem Verschwinden von HBsAg (Lau et al., 1998). Die Problematik ist, dass die Knochenmarktransplantation mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie schweren Infektionen oder der Graft-Versus-Host-Reaktion einhergeht, sodass dieses Verfahren zur alleinigen Therapie der Hepatitis B ohne Vorliegen einer malignen hämatologischen Grunderkrankung nicht geeignet ist. Durch den Transfer von autologen HBV-spezifischen T-Zellen sollten weniger Komplikationen auftreten, auch weil keine Immunsuppression nach Transfer der T-Zellen notwendig wäre. Durch die Verwendung von autologen Zellen würde auch die teils schwierige Suche nach dem passenden Spender – Stichwort HLA-Matching – nicht mehr nötig sein, sondern alleine die HLA-Restriktion des verwendeten T-Zell-Rezeptors wäre

zu beachten. Da in chronisch HBV-Infizierten eine adäquate HBV-spezifische T-Zell-Antwort sehr schwach ist oder sogar fehlt bzw. eine funktionelle Erschöpfung der HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen besteht, können funktionelle HBV-spezifische T-Zellen nicht bzw. nur schwer isoliert und somit auch nicht nach Expansion wieder reinfundiert werden. Durch Einführung von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren oder chimären Antigenrezeptoren (CAR) könnte autologen T-Zellen von chronisch HBV-Infizierten eine HBV-Spezifität verliehen werden. Zusätzlich könnte mit HBV-spezifischen T-Zellen nicht nur die chronische Hepatitis B sondern auch das HBV-assoziierte HCC behandelt werden. Die Arbeitsgruppe um Antonio Bertolotti publizierte hierzu bereits einen Fallbericht (Qasim et al., 2015). Autologe T-Zellen, welche mit einem Surface-spezifischen TZR transduziert worden waren, führten in einem lebertransplantierten Patienten mit neuen disseminierten HBsAg⁺ HCC Metastasen und zirkulierendem HBsAg zu einer deutlichen Reduktion (90 %) des HBsAg ohne funktionseinschränkenden Leberschaden oder anderen Nebenwirkungen, wie „on“ oder „of target“ Nebenwirkungen. Ein Tumorregress bzw. Rückgang der Tumormasse oder eine komplette Elimination von HBsAg konnte allerdings in diesem Fall nicht erreicht werden (Qasim et al., 2015).

Welche Antigenrezeptoren sich am besten für die adoptive T-Zell-Therapie der CHB eignen würden ist noch unklar. Die Verwendung von chimären Antigenrezeptoren hätte den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer HLA-Unabhängigkeit im Gegensatz zu HLA-restringierten natürlichen T-Zell-Rezeptoren in allen chronisch HBV-infizierten Patienten theoretisch verwendet werden könnten. Da die Erkennung des Antigens durch Antikörperfragmente erfolgt, können Zellen allerdings nur spezifisch erkannt und lysiert werden, wenn sie das entsprechende Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren, wie z.B. das Hepatitis-B-Oberflächenprotein. Virale Proteine wie das Core- oder X-Protein, die nicht auf der Zelloberfläche exprimiert werden, sind somit als Antigen für den CAR nicht geeignet. Dies ist deswegen von Relevanz, da in HBV-infizierten Lebern nicht alle infizierten Hepatozyten das gleiche Antigen-Profil aufweisen, sondern vielmehr ein Mosaik an infizierten Hepatozyten besteht, die HBV-Antigene, HBV-DNA und cccDNA in unterschiedlicher Menge und an unterschiedlichen Lokalisation exprimieren (Zhang et al., 2016). So konnten Zhang et al., 2016 z.B. zeigen, dass sich HBsAg-Expression invers zur HBV-DNA und cccDNA Menge in Hepatozyten verhält und auch die Kolokalisation (Kolokalisationsindex von 8,9%) von Core- und Surface-Antigenen sehr gering ist. Dieses Mosaikmuster findet sich folglich dann auch in der Expression von MHC-I präsentierten HBV-Epitopen wieder (Khakpoor et al., 2018). T-Zellen, die mit rein S-spezifischen CAR-Rezeptoren versehen wären, würden infizierte Zellen, die nur Core-Antigene exprimieren, somit nicht erkennen, wohingegen unsere Core-spezifischen T-Zellen diese spezifisch eliminieren könnten.

Zudem scheint der CAR bei geringen Antigenmengen weniger sensitiv als natürliche T-Zell-Rezeptoren zu sein (Krebs et al., 2013), sodass infizierte Zellen, die keine oder nur geringe Mengen an HBsAg an der Zelloberfläche exprimieren, möglicherweise nicht erkannt werden und das HBV in diesen persistieren kann. Zugleich gibt es Bedenken, dass der chimäre Antigen-Rezeptor durch die hohe Konzentration von frei zirkulierendem HBsAg im Blut entweder unspezifisch aktiviert wird und es zu einem ungewollten Gewebe- bzw. Leberschaden kommt oder die Überstimulation zu einer funktionellen Erschöpfung der CAR⁺ T-Zellen führt. Letztere Bedenken konnten aber für den S-CAR im HBV transgenen Mausmodell nicht bestätigt werden (Krebs et al., 2013).

Die Verwendung von natürlichen T-Zell-Rezeptoren hat den Vorteil, dass hoch affine T-Zell-

Rezeptoren gegen verschiedenste HBV-Antigene aus Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis B isoliert und verwendet werden können und somit am ehesten die polyspezifische und hoch avide T-Zell-Antwort, die in akuten HBV-Infizierten zur Elimination des Virus führt, imitiert.

Aufgrund der HLA-Restriktion ist die infrage kommende Patientenpopulation pro TZR allerdings eingeschränkt. Daher müssten zumindest für die häufigsten HLA-Moleküle die immunogenen HBV-Peptide charakterisiert und dagegen spezifische T-Zell-Rezeptoren isoliert werden. Die Charakterisierung und gentechnische Herstellung unter GMP-Bedingungen wäre deshalb sehr kostenintensiv, insbesondere wenn T-Zell-Rezeptoren mit unterschiedlicher Peptid-Spezifität kombiniert werden sollten. Durch die Verwendung von Epitopen mit degenerierter HLA-Restriktion bei der Isolation der T-Zellen konnten wir HBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren isolieren, die die HBV-Epitope und deren relevante genotypische Epitopvarianten nicht nur präsentiert auf HLA-A*02:01 sondern auch auf anderen HLA-A*02-Subtypen erkannten und somit in eine größeren Anzahl von Patienten eingesetzt werden könnten. Ca. 44,3 % der Weltbevölkerung würden einen HLA-Subtyp besitzen, der entweder durch den C18-spezifischen TZR 5E oder den S20-spezifischen TZR 4G erkannt wird und ca. 60 Millionen der weltweit chronisch HBV-Infizierten könnten nach unseren Hochrechnungen mit einem dieser zwei T-Zell-Rezeptoren theoretisch sofort behandelt werden.

Eine befürchtete spezifische Komplikation der adoptiven T-Zell-Therapie der Hepatitis B ist, dass es durch die forcierte zytotoxische Immunantwort zu einem beträchtlichen Leberschaden mit der potentiell letalen Komplikation eines schweren Leberversagens kommen kann. Dieser Befürchtung widersprechen jedoch einige Daten aus dem HBV-transgenen Mausmodell und Erfahrungen aus klinischen Studien. Guidotti und Kollegen konnten in HBV-transgenen Mäusen, in denen nahezu alle Hepatozyten HBV-Gene exprimieren, zeigen, dass der Leberschaden zwar mit der Anzahl an transferierten T-Zellen korreliert, jedoch zur Kontrolle des HBV eine Effektorzellzahl von 5×10^6 oder 1×10^7 Effektorzellen ausreichte, um die HBV-DNA unter die Nachweisgrenze zu senken und dabei nur 10 % bzw. 24 % der Hepatozyten zerstört wurden (Guidotti et al., 1996). Auch bei dem Transfer von T-Zellen in HBV-transgene Mäuse, die mit dem HBV-spezifischen CAR ausgestattet waren, kam es zur Kontrolle der HBV-Replikation und nur zu einem vorübergehenden Leberschaden (Krebs et al., 2013). Im Menschen konnte in mehreren Fällen von chronisch HBV-Infizierten gezeigt werden, dass durch den Transfer von HBV-spezifischen T-Zellen im Rahmen von Knochenmarktransplantationen eine Elimination des HBV ohne größere Leberschäden möglich ist (Lau et al., 1997; Lau et al., 2002). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass das HBV und dessen cccDNA bereits aus einem Großteil der infizierten Hepatozyten durch die von den T-Zellen sezernierten Zytokine IFN- γ und TNF- α eliminiert wird, sodass eine zytotoxische T-Zell-Effektorantwort gar nicht mehr nötig ist (Guidotti et al., 1996; Xia et al., 2016).

Für unsere T-Zell-Rezeptoren 6K und 4G konnte Karin Wisskirchen anschließend an diese Arbeit in einem Mausmodell, in dem humane Hepatozyten in eine immundefiziente Maus xenotransplantiert wurden, zeigen, dass durchaus infizierte Hepatozyten vorwiegend durch die zytotoxische Effektorantwort eliminiert werden und ein Zusammenhang zwischen der Rate an infizierten Hepatozyten und des durch den T-Zell-Transfer verursachten Leberschadens besteht. In Mäusen in denen 90 % der humanen Hepatozyten infiziert waren, kam es nach T-Zell-Transfer zu einer vorübergehenden Leberschädigung, die klinisch auch mit einem Gewichtsverlust von unter 10 % einherging, bei

allerdings auch nahezu vollständiger Elimination der infizierten Hepatozyten und nicht mehr nachweisbaren cccDNA-Leveln in der Leber (Wisskirchen et al., 2019). Allerdings entsprechen solche hohen Infektionsraten wie in diesem Mausmodell nicht der Mehrheit der Infektionsraten von Hepatozyten in chronisch HBV-Infizierten, insbesondere wenn die Patienten antiviral anbehandelt werden (Wursthorn et al., 2006). Unter anderem scheint die Viruslast mit der Rate an infizierten Hepatozyten zusammenzuhängen, sowohl in HBeAg-positiven (Naoumov et al., 1990) wie auch HBeAg-negativen CHB-Patienten (Huang et al., 2010), sodass bei Anwendung der adoptiven T-Zell-Therapie der CHB im klinischen Setting sicher eine gute Charakterisierung des Infektionsstatus mit ggf. der Durchführung einer Leberbiopsie notwendig wäre. Eine weniger invasive und schnellere Alternative zur Leberbiopsie könnte ggf. die Feinnadelaspiration aus der Leber sein (Gill et al., 2019), die auch im Langzeitmonitoring von CHB-Patienten nach adoptiver T-Zell-Therapie eingesetzt werden könnte. Um das Risiko eines fulminanten Leberschadens weiter zu reduzieren, könnte vor Beginn der adoptiven T-Zell-Therapie eine medikamentöse Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga erfolgen, um die Zahl an HBV-infizierten Zellen weiter zu reduzieren und somit möglicherweise zugleich die Chance auf eine Ausheilung zu erhöhen. Eine Kombinationstherapie mit pegIFN- α und Adefovir konnte die Zahl an HBsAg⁺ Hepatozyten von durchschnittlich 36 % (max. 95 %) auf 14 % (max. 50 %) und die Zahl an HBcAg⁺ Hepatozyten von 16 % (max. 90 %) auf 7 % (max 70 %) reduzieren (Wursthorn et al., 2006). Daher simulierten Karin Wisskirchen und Kollegen in ihrem Mausmodell mit Hilfe des Entry-Inhibitor Myrcludex in einem weiteren Versuch nur eine partielle Infektion der Leber und konnten zeigen, dass es hierunter zu keiner klinisch relevanten Leberschädigung kam bei trotzdem deutlicher Senkung der Virusmarker und spezifischer Elimination von infizierten Hepatozyten. Gleichzeitig konnte keine relevante Schädigung von benachbarten nicht infizierten Hepatozyten im Sinne eines „*bystander killings*“ festgestellt werden (Wisskirchen et al., 2019).

Mit einer transienten Expression HBV-spezifischer T-Zell-Rezeptoren in T-Zellen durch mRNA-Elektroporation, erhofft sich die AG um Antonio Bertolotti, das Risiko für einen schweren anhaltenden Leberschaden zu reduzieren (Kah et al., 2017). Des Weiteren modifizierten sie das Isolations- und Stimulationsverfahren von T-Zellen vor mRNA-Elektroporation und generierten dadurch T-Zellen, die vorwiegend über die Sekretion von IFN- γ und weniger über die zytotoxische zellvermittelte Antwort ihre antivirale Effektorfunktion ausübten (Koh et al., 2018). Im Vergleich zur gentechnischen Modifizierung von T-Zellen mittels retroviraler Transduktion scheint dies aber auch mit einer schwächeren antiviralen Antwort einher zu gehen und bedarf wiederholter Applikationen von gentechnisch modifizierten T-Zellen um einen gleichen anhaltenden antiviralen Effekt zu erhalten (vergleiche Kah et al., 2017 und Wisskirchen et al., 2019).

Block und Kollegen postulierten, dass neue Therapeutika, welche eine funktionelle Heilung im Sinne einer anhaltenden Unterdrückung der Viruslast, des HBsAg und der cccDNA als Therapieziel haben, optimalerweise folgende Eigenschaften mitbringen sollten, nämlich eine schnelle Senkung der Viruslast und des HBsAg mit Beginn der Therapie sowie die Elimination der cccDNA aus infizierten Hepatozyten (Block et al., 2013). All diese Eigenschaften konnten die HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in den von Karin Wisskirchen durchgeführten *in vivo* Experimenten aufweisen. Die uns vorliegenden Daten machen also Hoffnung, dass die adoptive T-Zell-Therapie eine Heilung

der chronischen Hepatitis B ermöglichen kann. Es sind jedoch weiterhin einige Fragen offen, die in weiteren, insbesondere *in vivo* Experimenten geklärt werden sollten.

Die oben erwähnten überzeugenden Ergebnisse aus den *in vivo* Experimenten von Karin Wisskirchen erfolgten in einem Mausmodell mit kompletter Defizienz des autologen Immunsystems (Wisskirchen et al., 2019). Es ist aber noch unklar, wie z.B. die transferierten T-Zellen mit einem HBV-toleranten Immunsystem interagieren, wie es insbesondere in vertikale HBV-Infizierten vorliegt. Um diese Fragestellungen zu untersuchen, würde sich möglicherweise das HBVA2-Mausmodell anbieten. Des Weiteren wäre zu untersuchen, ob die Kombinationen von T-Zell-Rezeptoren verschiedener HBV-Spezifität einer monospezifischen Therapie mit einem hoch affinen TZR tatsächlich überlegen ist. Davon ist angesichts der mosaikartigen HBV-Antigen-Verteilung in chronisch Infizierten (Khakpoor et al., 2018) und der zunehmenden Evidenz für Escape-Mutationen in T-Zell-Epitopen (Kefalakes et al., 2015; Zhang et al., 2018) auszugehen, aber es ist noch experimentell zu beweisen. Auch die im Kapitel 3.6 bereits thematisierte Fragestellung, ob und in welcher Form die Kombination von CD8⁺ T-Zellen mit CD4⁺ T-Zellen die Effektorantwort und Proliferationsfähigkeit der transferierten HBV-spezifischen T-Zellen verbessert und sie möglicherweise vor *T cell exhaustion* schützt, wäre weiter zu untersuchen. Offen ist auch die Frage, ob und in welcher Kombination eine adoptive T-Zell-Therapie mit anderen Medikamenten oder Immuntherapien sinnvoll kombiniert werden könnte. Die Vorbehandlung mit etablierten Virostatika zur Senkung der Viruslast und Infektionsrate von Hepatozyten, um den Leberschaden gering zu halten, erscheint sinnvoll und scheint auch nach ersten *in vitro* Daten keinen negativen Einfluss auf die Antigenerkennung und Effektorfunktion der T-Zellen zu haben (Wisskirchen et al., 2019). Aber auch die Kombination mit neueren Therapien wie z.B. Anwendung von siRNA zur Reduzierung der Antigenproduktion, die insbesondere bei Patienten mit hoher Viruslast und Antigenexpression interessant wäre, um einer *T cell exhaustion* entgegen zu wirken (Michler et al., 2020) oder die Kombination mit dem Entry-Inhibitor Myrcludex (Wedemeyer et al., 2019) könnte interessant sein. Für Letzteren konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass es durch Kombination von Myrcludex mit dem einmaligen Transfer von HBV-spezifischen T-Zellen zu einer Langzeitkontrolle kam, wohingegen bei alleinigem einmaligem Transfer von T-Zellen die HBV-Marker wieder anstiegen (Wisskirchen et al., 2019).

Das von uns generierte TZR-Repertoire mit multispezifischen polyklonalen hoch aviden T-Zell-Rezeptoren gegen drei etablierte immunogene HBV-Peptide ermöglicht uns, diese Fragestellungen zur adoptiven T-Zell-Therapie der Hepatitis B weiter zu untersuchen, mit dem Ziel der klinischen Anwendung und Heilung der chronischen Hepatitis B.

Kapitel 4

Material

4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
AxSYM	Abbott
Beta-counter Top Count NXT	Perkin Elmer
Brutschrank Cell 150	Heraeus
Einfrierhilfe	Nalgene
ELISA-Reader infinite F200	Tecan
FACSCantoII	BD
Geldokumentation Fusion Fx7	Peqlab
Hybridisierungs-ofen	Thermo Scientific
Lightcycler 480	Roche
Neubauer-Zählkammer	Brand
Thermocycler T300	Biometra
Tischzentrifuge 54173	Eppendorf
Zellkulturzentrifuge 4K15	Sigma

4.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Artikel-Nr.	Hersteller
Einmalpipetten	Cellstar	Greiner
Filcons 30 µm	030-33 S	WIPAK
Filter 0,45 µm	831 826	Sarstedt
Filter 0,20 µm	831 826 001	Sarstedt
Impf-schlinge	861 562 010	Sarstedt
Kanülen 20 G (gelb)	4657519	Braun
Kryogefäße	122263	Greiner
Li-Heparin Röhren	21.065	Sarstedt
LUMA-Platte96		Perkin Elmer

Produkt	Artikel-Nr.	Hersteller
Nicht behandelte Zell-Kultur-Platten	351147	BD
Pipetten für Zellkultur		Greiner
Platten für Retronectin-Beschichtung	659102	Greiner
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	616201 bzw. 623201	Greiner
Reaktionsgefäße 1,5 ml (DNA low bind)	30.108.051	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml	Z05-PF60309	BD
Reaktionsgefäße 50 ml	GZ-17301-05	BD
Spritzen	194212010	Braun
V-Bodenplatte	9292.1	Roth
Zellkulturplatten 96-Well	92696	TTP
Zellkulturplatten 24-Well	92424	TTP
Zellkulturplatten 12-Well	92412	TTP
Zellkulturplatten 6-Well	92406	TTP
Zellkulturschalen 10 cm	93100	TTP
Zellkulturschalen 6 cm	93060	TTP
Zellkulturflaschen T150	90151	TTP
Zellkulturflaschen T75	90076	TTP
Zellkulturflaschen T25	90026	TTP
Zellsieb 100 µm	352360	BD Falcon

4.3 Chemikalien / Reagenzien / Medienzusätze

Chemikalien	Artikel-Nr.	Hersteller
Agarose	35-1020	Peqlab
Ampicillin 50 mg/ml	K029.1	Roth
BFA	B7651	Sigma
Biotin	B4501	Sigma
Blasticidin 10 mg/ml	A11139-03	Gibco
Brom-Chloro-Propan	B9673	Sigma
BSA	A1470	Sigma
Collagen R	47254	Serva
Chlorophenolred- β -D-galactopyranoside (CPRG)	99792-79-7	Sigma
DMSO	D2650	Sigma
DMSO	D5879	Sigma-Aldrich
dNTPs 10 mM	18427-013	Invitrogen

Chemikalien	Artikel-Nr.	Hersteller
EMA	E1374	Invitrogen
EGTA	11290	Serva
FCS	10270	Gibco
FCS für mTZM	3302-P271120	PAN Biotech
Ficoll LSM 1077	J15-004	PAA
Fugene 6	11 814 443 001	Roche
Geneticin	10131-019	Thermo Fisher
Gentamicin 40 mg/ml	PZN-03928180	Ratiopharm
Glutamin 200 mM	25030	Gibco
Glucose	22720	Serva
Heparin-Natrium 25000	PZN- 03029843	Ratiopharm
Hepes 200 M	15630	Gibco
Humanserum		Eigenproduktion aus Serum-Pool-Aktion
Hydrocortison	PZN-01877030	Pfizer
IL-2 (für murine Zellen)	202-IL	RD Systems
IL-2 Proleukin (für humane Zellen)	PZN-2238131	Novartis
Insulin (human) (Insuman Rapid 40 IE/ml)	PZN8923069	Sanofi
Inosine	26350	Serva
Linear Acrylamid	AM9520	Ambion
Lipofectamin 2000	11668-019	Invitrogen
Natrium-Pyruvat 100 mM	11360	Gibco
NEAA 100x	11140	Gibco
Neomycin (Geneticin)	10131	Gibco
PBS	10010	Gibco
Pen/Strep 104 U bzw. 104 mg/ml	15140	Gibco
Percoll	17-0891-02	GE Healthcare
Poly-L-Lysin	P4707	Sigma
Protaminsulfat	P3369	Sigma
Puromycin 10 mg/ml	ant-Pr-1	Invitrogen
Radioaktives Cr51	Cr-RA-8	Hartmann Analytic
Retronectin	T100B	Takara
RNase Inhibitor	03 335 339 001	Roche
Tissue-Tek O.C.T.	4583	Sakura
Trizol	15596-026	Invitrogen
Trypanblau	15250	Gibco
Versen EDTA	15040	Gibco

Chemikalien	Artikel-Nr.	Hersteller
β -Mercaptoethanol 50 mM	31350	Gibco

4.4 Enzyme

Enzym	Artikel-Nr.	Hersteller
AMV Reverse Transkriptase	11 495 062 001	Roche
Benzonase	D00086290	Novagen
Collagenase	40E11939	Worthington
DNase	04 716 728 001	Roche
Phusion Polymerase	F-549-S	Finnzymes
Proteinase K	7528.2	Roth
RNase A	740505	Macherey-Nagel
SAP	EF0511	Fermentas
SuperScript II Reverse Trans- criptase	18064022	Invitrogen
T4 DNA Ligase	EL0015	Fermentas
Trypsin	15400	Gibco
FastDigest EcoRI	FD0274	Thermo Scientific
FastDigest NotI	FD0596	Thermo Scientific
Bsp1407I(BsrGI)	ER0931	Thermo Scientific
EcoRI	ER0271	Thermo Scientific
NotI	ER0595	Thermo Scientific

4.5 Kits

Kit	Artikel-Nr.	Hersteller
AMV RT	11 483 188 001	Roche
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit hu- man	0130-096-533	Miltenyi Biotec
CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit hu- man	0130-096-895	Miltenyi Biotec
Gel Extraction Kit	28706	Quiagen
Human IFN γ ELISA *	430103	BioLegend
Midiprep Plasmid DNA Endotoxin-free	PLED35-1KT	Sigma
Miniprep Plasmid DNA	K0503	Fermentas
PCR Pure Taq	27-9557-02	GE Healthcare
Peqlab Gel Ex	12-2500-02	Peqlab

Kit	Artikel-Nr.	Hersteller
Rapid DNA Dephos and Ligation Kit	04898117001	Roche
XTT	11 465 015 001	Roche
Enzygnost® HBe monoclonal	OQDMG11C11	Siemens Healthcare Diagnostics

*statt Avidin HRP aus Kit wurde Avidin HRP von BD (Artikel-Nr. 51-26437E-7) verwendet

4.6 Puffer und Lösungen

Puffer	Substanzen	Stockkonzentration	Volumen	Endkonzentration
β -Galaktosidase Lysepuffer	Na ₂ HPO ₄	1 M	2,4 ml	
	NaH ₂ PO ₄	1 M	1,6 ml	
	KCL	1 M	0,4 ml	
	MgSO ₄	1 M	0,4 ml	
	EDTA	25 mM	0,4 ml	
	10 % NP40		0,5 ml	
	H ₂ O		0,4 ml	
	Mercaptoethanol		120 μ l	
β -Galaktosidase Reaktionspuffer	Phosphatpuffer pH 7,4		800 μ l	
	MgCl ₂	2 M	50 μ l	
	Mercaptoethanol		7 μ l	
	CPRG	600mM	100 μ l	
	H ₂ O		9 ml	
FACS-Puffer	PBS 99,9 %			
	PSA 0,01 %			
TAC-Puffer	NH ₄ Cl			0,16 M
	Tris pH 7,65			0,17 M
	beides autoklavieren und bei Bedarf 9/10 Ammoniumchlorid mit 1/10 Tris-Lösung frisch mischen			
TAE	Tris			2 M
	Essigsäure			2 M
	EDTA pH 8			50 mM

4.7 Zellen

Zellen	Beschreibung	Medium	Quelle
Buffy coat	PBMC ohne Ficoll-Aufreinigung, negative Spender aus CMV Immunmonitoring, immer frisch aufgetaut	hTZM	Christiane Frömmel, AG Neuenhan, Mikrobiologisches Institut TUM
293T	HLA-A2+ Embryonale Nierenzellen	RPMI-Vollmed.	AG Protzer, Laborbestand
B3Z	murines T-Zell Hybridom, H-2K ^b restringierte TZR gegen OVA-Peptid SIINFEKL, <i>lacZ</i> -Aktivierung durch NF-AT	RPMI Vollmed.	AG Uckert, MDC Berlin
HepG2	humane Hepatoma-Zelllinie	DMEM Vollmed., bzw. Differenzierungs-Medium	AG Protzer, Laborbestand
HepG2.2.15	HepG2 transfiziert mit HBV-Genom, stabile HBV-Produktion nach Differenzierung	DMEM Vollmedium, bzw. Differenzierungs-Medium	AG Protzer, Laborbestand
HepRG HLA-A*02:01 ⁺	HepRG (humane Hepatoma-Zelllinie) retroviral transduziert mit HLA-A*02:01 Molekül	HepRG-Medium, bzw. HepRG-Differenzierungs-Medium	AG Protzer, generiert von Christina Dargels
Lymphoblastoide Zelllinien (LCL)	EBV-transformierte B-Zelllinien	RPMI-Vollmed.	AG Krackhardt , AG Bertoletti
PBMC	gepoolte PBMC-Mischung	hTZM	Eigenherstellung „Serum-Pool-Aktion“ Virologie und AG Krackhardt
Plat-E	293T stabil transfiziert mit MoMulv gag, pol und env unter dem EF1 Promoter	DMEM-Vollmed. + 1 µg/ml Puromycin + 10 µg/ml Blasticidin	AG Uckert, MDC Berlin
Stbl3	E.coli, chemisch-kompetent	LB	Invitrogen C7373-03
T2	HLA-A*02:01 ⁺ Hybrid einer T- und B-lymphoblastoiden Zelllinie mit TAP-Defizienz	RPMI-Vollmed.	Christiane Frömmel, AG Neuenhan, MIBI (Salter1986)

EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (LCL)

LCL	HLA-A	Nummer *	Quelle
JY	A*0201	9287	AG Krackhardt
BELLO	A*02:02		AG Bertoletti
CF160	A*02:03		AG Bertoletti
RML	A*02:04	9016	AG Krackhardt
WT49	A*02:05	9285	AG Krackhardt
CLA	A*02:06/A*24	9209	AG Krackhardt
TABO89	A*0207	9066	AG Krackhardt
KLO	A*02:08	9213	AG Krackhardt
OZB	A*02:09/A3	9216	AG Krackhardt
XLIND	A*02:10/A*30	9220	AG Krackhardt
TUBO	A*02:16/A*0301	9045	AG Krackhardt
AMALA A	A*02:17	9064	AG Krackhardt

* Bei Angabe einer Nummer siehe Prasad und Yang, 1996

4.8 Zellkulturmedien

Medium	Bestandteile	Menge
Einfriermedium	FCS	90 %
	DMSO	10 %

Allgemeine Zellkulturmedien

DMEM-Voll-Medium	DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	NEAA	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
RPMI-Voll-Medium	RPMI	500 ml
	FCS	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	NEAA	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
Waschmedium	RPMI	500 ml
	Pen/Strep	5,5 ml

Medium	Bestandteile	Menge
Zellkulturmedien für T-Zellen		
humanes T-Zell-Medium (hTZM)	RPMI	500 ml
	Humanserum	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	NEAA	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
	Hepes	5,5 ml
	Gentamicin	208 µl
murines T-Zell-Medium (mTZM)	RPMI-dutch modified	500 ml
	FCS Pan Biotech	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	β-Mercaptoethanol	550 µl
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
	Zellkulturmedien für Kultur von Hepatoma-Zellen bzw. primärer muriner Hepatozyten	
Differenzierungsmedium	William's Medium	500 ml
	FCS	25 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	NEAA	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
	DMSO	2,75 ml
	HepRG-Medium	William's Medium
FBS (Fetaclone II)		50 ml
Pen/Strep		5,5 ml
Glutamin		5,5 ml
human Insulin		SI0,023IU
Hydrocortison		4,7 µg/l
Gentamicin		80 µg/ml
HepRG-Differenzierungsmedium		HepRG-Medium
	DMSO	1,8 %
PMH-Wasch-Medium	Spinners MEM	500 ml
	Glutamin	5,6 ml
	Glucose 5 %	6 ml
	HEPES (pH 7,4)	11,5 ml
	human Insulin	0,16 ml

Medium	Bestandteile	Menge
	Pen/Strep	5,6 ml
	Natrium-Pyruvat (100 mM)	30 ml
Präperfusions-Medium	PMH-Wasch-Medium	500 ml
	EGTA (100 mM)	2,5 ml
	Heparin (100 mM)	0,5 ml
Kollagenase-Medium	Williams	500 ml
	CaCl ₂ 1 M	1,8 ml
	Glutamin	5,6 ml
	Glucose 5 %	6 ml
	HEPES (pH 7,4)	11,5 ml
	Insulin	0,16 ml
	Pen/Strep	5,6 ml
	Na-Pyruvat (100 mM)	30 ml
Erhaltungs-Medium für primäre murine Hepatozyten	Williams	500 ml
	Gentamycin (50 mg/ml)	0,55 ml
	Glutamin	5,6 ml
	Glucose 5 %	6 ml
	HEPES (pH 7,4)	11,5 ml
	Hydrocortison	0,5 ml
	Inosine	2,8 ml
	Insulin	1,4 ml
	Pen/Strep	5,6 ml
	DMSO 100 %	5 ml

Medium für E. coli Stbl3

SOC-Medium	Hefe-Extrakt	2,5 g
	Trypton	10 g
	NaCl	0,29 g
	KCL	0,093 g
	MgCl ₂ x6H ₂ O	1,02 g
	MgSO ₄ x7H ₂ O	1,02 g
	Glucose	1,802 g

Medium	Artikel-Nr.	Hersteller
AIM-V	31035	Gibco
DMEM V	11960	Gibco
Opti-MEM-V	31985	Gibco
RPMI V	21875	Gibco
RPMI-dutch modified	22409	Gibco
Williams V	22551	Gibco
Spinners MEM	31380-025	Gibco

Zutaten für Zellkulturmedien	Zubereitung
Calciumchlorid (CaCl ₂)	1 Molare Calciumchloridlösung wurde mit ddH ₂ O hergestellt und dann autoklaviert
EGTA	0,1 M EGTA in ddH ₂ O aufgelöst
Glucose	5 g Glucose wurde in 200 ml aufgelöst, und dann über einen 0,2 µm Filter steril filtriert
Heparin	Heparin wurde mit PBS auf eine Konzentration von 1 × 10 ⁴ U/ml verdünnt
Heparin	Heparin wurde mit PBS auf eine Konzentration von 10 U/ml verdünnt
Hydrokortison	100 mg wurde in 20,6 ml einer Earle's Salzlösung mit 100 mM HEPES pH 7,4 vermischt und über 0,45 µm Filter filtriert
Inosine	2,5 mg/ml wurden in sterilem PBS aufgelöst und mit 0,2 µm Filter filtriert, Aliquots wurden bei 4 °C
Insulin	25 mg Insulin wurden in ca. 0,1 M HCl mit 1 % FSC über 10' aufgelöst und dann mit der selben Lösung auf ein Gesamtvolumen von 8,3 ml verdünnt. Von der Lösung wurden dann 0,15 ml in 2 ml Tubes gelagert. Zum Gebrauch wurden die Aliquots aufgetaut und in einem Verhältnis von 1 zu 10 mit Earles Salzlösung mit 20 mM HEPES pH 7,4 verdünnt.

4.9 Mäuse

Maus (Bezeichnung laut Tierhaltung)	Beschreibung	Quelle
HHDII	exprimiert modifiziertes humanes HLA-A*02 Transgen, Knockout des murinen β2M und H-2D _b	AG Drexler, Virologie
C57BL/6 CD45.1	„Black6“, exprimiert kongenen Marker CD45.1	AG Busch, MIH TUM
HBV1.3tg hom C57BL/6	HBV-Transgen	AG-Protzer, Tierstallbestand
HBV-A2	Kreuzung aus HBV1.3tg und HHDII	Eigenherstellung von Karin Krebs

4.10 Peptide

Lokalisation	Abkürzung	Sequence	Herstellung	Firma
S20-28	S20	FLLTRILTI	Reinheit >80 %, HPLC	JPT Peptide Technologies (Berlin)
S172-180	S172	WLSLLVPFV	Reinheit >80 %, HPLC	JPT Peptide Technologies (Berlin)
C18-27	C18	FLPSDFFPSV	Reinheit >80 %, HPLC	JPT Peptide Technologies (Berlin)
OVA257-264	OVA	SIINFEKL	Reinheit >80 %, HPLC	JPT Peptide Technologies (Berlin)

* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC = engl. Abkürzung von *high performance liquid chromatography*)

4.11 Streptamere

Die MHC:Peptid Komplexe der verwendeten Streptamere wurden aus einem löslichen humanen HLA-A*02:01, humanem β -2-Mikroglobulin, StrepTag3 und den entsprechenden Peptiden (C18, S20 und S172) gefaltet. Die Herstellung erfolgte durch Anna Hochholzer, AG Busch (MIH, TUM).

4.12 Antikörper (AK)

humanes Antigen	Fluoreszenz	Klon	Artikel-Nr.	Hersteller	Verdünnung
ICS Antikörper-Panel					**
IL-2	APC	5.344.111	34116	BD	1:10
IFN- γ	FITC	25723.11	340449	BD	1:20
TNF- α	Pb	MAb11	48-7349-42	eBioscience	1:20
CD8a	APC-780	RPA-T8	47-0088-42	eBioscience	1:200
CD4	PE Cy7	OKT4	917414	Biologend	1:100
murine TRBC	PE	H57-597	5533172	BD	1:20
verwendete AK bei Streptamerfärbungen					
CD4	FITC	MEM-241	21270043	ImmunoTools	1:100
CD8	APC	MEM-31	21270086	ImmunoTools	1:200
CD4	APC	OKT4	17-0048-73	eBioscience	1:7
CD8a	APC-780	RPA-T8	47-0088-42	eBioscience	1:200
sonstige AK für Durchflusszytometrie					
CD4	APC	OKT4	17-0048-73	eBioscience	1:7
CD3	FITC	UCHT1	11-0038	eBioscience	1:7
CD4	PB	DK25	PB984	Dako	1:70
CD4	PE	OKT4	12-0048-42	eBioscience	1:200
HLA.A2 (BB7.2)	FITC		s32236	Santa Cruz Biotechnology	
AK für Stimulation der PBMC					
CD28	keine	CD28.2	16-0289-85	Invitrogen	s. Methoden
CD3	keine	OKT-3	16-0037-85	Invitrogen	s. Methoden

** Verwendete Verdünnung für ICS der transduzierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen

Substanz	Artikel-Nr.	Hersteller
Cytofix-Cytoperm	554714	BD
Perm Wash	554723	BD

murines Antigenen	Fluoreszenz	Klon	Artikel-Nr.	Hersteller	Verdünnung
Streptamerfärbung der transduzierten B3Z-Zellen					
CD3	FITC	17A2	555274	BD	1:150
CD8	APC	5H10	MCD0805	Invitrogen	1:250
CD8	PE	53-6.7	553033	BD	1:150
FACS-Analyse der transduzierten murinen Splenozyten					
CD4	PE	GK1.5	553730	BD	1:200
CD8	APC	5H10	MCD0805	Invitrogen	1:300
CD3	FITC	17A2	555274	BD	1:150
CD4	Pb	RM4-5	48-0042-82	eBioscience	1:200
Antikörper zur Stimulation von murinen Splenozyten					
mCD3		17A2		eBioscience	siehe Methoden
mCD28		37.N.51.1		eBioscience	siehe Methoden

4.13 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pcDNA3.1-MLVg/p. (gag/pol)	Vektor zur Expression der gruppenspezifischen Antigene (gag) und Polymerase (pol) des Mo-MLV-Retrovirus, zur Herstellung von MP71 Retroviren	hergestellt von Christopher Baum, Hannover; erhalten von AG Uckert, Berlin
pALF-10A1 (env)	Vektor zur Expression des Hüllproteins des Murinen Leukämievirus zur Verpackung der retroviralen MP71-DNA und Generierung von MP71-Retroviren	AG Uckert, Berlin (Uckert2000)
pMP71.GFP _{pre}	retroviraler Vektor mit GFP-Markergen unter MPSV-LTR-Kontrolle und zusätzlicher Einbringung einer <i>modified mRNA splice cite</i> (mss) sowie PRE-Element (postranskriptionelles regulatorisches Element) des Murmeltier-Hepatitisvirus	AG Uckert, Berlin (Engels et al., 2003)

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pMP71_beta_TCR_WL12(blau)	β -Kette TZR WL12 (TRBV7-6*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_WL12(blau)	α -Kette TZR WL12 (TRAV12-2*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_WL31(rot)	β -Kette TZR WL31 (TRBV6-5*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_WL31(rot)	α -Kette TZR WL31 (TRAV39*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_5E	β -Kette TZR 5E (TRBV13*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_5E	α -Kette TZR 5E (TRAV13-1*02)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_6K	β -Kette TZR 6K (TRBV27*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_6K	α -Kette TZR 6K (TRAV13-1*02)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_7D	β -Kette TZR 7D (TRBV24-1*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_7D	α -Kette TZR 7D (TRAV17*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_D1	β -Kette TZR D1 (TRBV12-4*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_D1	α -Kette TZR D1 (TRAV17*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_FLP122	β -Kette TZR FLP122 (TRBV27*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_FLP122	α -Kette TZR FLP122 (TRAV12-2*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_FLP14	β -Kette TZR FLP14 (TRBV2*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_FLP14	α -Kette TZR FLP14 (TRAV12-2*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_G6	β -Kette TZR G6 (TRBV12-3*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_G6	α -Kette TZR G6 (TRAV17*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_beta_TCR_4G	β -Kette TZR 4G (TRBV5-1*01)	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71_alpha_TCR_4G	α -Kette TZR 4G (TRAV34*01)	AG Protzer, Kai Metzger

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pMP71.co_TCR_WL12(blau)	optimierter TZR WL12	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_WL31(rot)	optimierter TZR WL31	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_5E	optimierter TZR 5E	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_6K	optimierter TZR 6K	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_7D	optimierter TZR 7D	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_D1	optimierter TZR D1	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_FLP122	optimierter TZR FLP122	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_FLP14	optimierter TZR FLP14	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_G6	optimierter TZR G6	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.co_TCR_4G	optimierter TZR 4G	AG Protzer, Kai Metzger
pMP71.C18_AGAB	optimierter TZR C_{AB}	AG Bertolletti
pMP71.S183_AGAB	optimierter TZR S_{AB}	AG Bertolletti
pMP71.co-cys_TCR	muriner TZR mit codonoptimierten konstanten Regionen + zusätzlicher Cystein-Brücke	AG Uckert, Elisa Kieback

4.14 Primer

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur
Identifizierung der TZR-Ketten mit degenerierten Primern		
CA1	AGACCTCATGTCTAGCACAG	
CA2	GTGACACATTTGTTTGAGAATC	
VPANHUM	TGAGTGTCCCPGAPGG2P	
VP1	GCIITKTIYTGGTAYMGACA	
VP2	CTITKTWTTGGTAYCIKCAG	
CP1	GCACCTCCTTCCCATTAC	

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur
Primer für TZR-Ketten-Synthese		
5'TRBV7-6.01- KOZAK-NotI	CAGGCGGCCCGCCACCATGGGCACCAGTCTCC	60 °C
5'TRBV6-5.0- KOZAK-NotI	CAGGCGGCCCGCCACCATGAGCATCGGCCTC	58 °C
5'TRBV27-0.1- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGGCCCCCAGC	62 °C
5'TRBV12-3.01- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGACTCCTGGACC	53 °C
5'TRBV24-1.01- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGCCTCCCTGCTC	60 °C
5'TRBV2-0.1- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGATACCTGGCTCGTATGC	65 °C
5'TRBV9-0.1- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGGCTTCAGGCTCCTC	65 °C
5'TRBV13-0.1- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGCTTAGTCCTGACCTGC	60 °C
5'TRBV28-0.1- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGGAATCAGGCTCCT	60 °C
5'TRBV5-1.01- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGGCTCCAGGCTGC	65 °C
5'TRAV12-2.01- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGAAATCCTTGAGA	45 °C
5'TRAV41.01- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGTGAAGATCCG	50 °C
5'TRAV13-1.02- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGACATCCATTCGAG	52 °C
5'TRAV17-0.1- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGGAAACTCTCCTGGGA	60 °C
5'TRAV5-0.1- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGAAGACATTTGCTGGATT	52 °C
5'TRAV39.01- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGAAGAAGCTACTAGCAATG	56 °C
5'TRAV22*01- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGAAGAGGATATTGGGAGC	60 °C
5'TRAV35.02- NotI-Kozak	CAGGCGGCCCGCCACCATGCTCCTTGAACATTTATTA	56,02 °C

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur
5'T5- TRAV14/DV4*02	CAGGCGGCGCCACCATGTCACTTTCTAGCCTGC	57,57 °C
3'TRBC-1 EcoRI	TGGAATTCTCAGAAATCCTTTCTCTTGACC	61 °C
3'TRBC-2-EcoRI	TGGAATTCCTAGCCTCTGGAATCCTTTCTC	62 °C
3'TRAC-EcoRI	TGGAATTCTCAGCTGGACCACAGCCGCAGC	78 °C
3'TRAC1-BsrG1	CTTGATACATCAGCTGGACCACAGCCGCAGC	78 °C
Primer für Synthese der optimierten TZR-Sequenzen		
betaVariable_fw	TCCCTCTCTCCAAGCTCACT	
betaVariable_rv	GCTCGAACAGGGACACCTT	
alphaVariable_fw	AAGCAGGCCGGCGACG	
alphaVariable_rv	TCTGGGGTCCTTCAGCTGGT	
betaConstant_fw	GAAGATCTGAGGAACGTGACC	
betaConstant_rv	CGGGGTCTCTTCCACGTC	
alphaConstant_fw	CCGCCGTGTACCAGCTGAA	
alphaConstant_rv- _EcoRI	TGGAATTCTCAGCTGGACCACAGCC	
alphaConstant_rv- _BSRG	CTTGATACATCAGCTGCTCCACAGCCGC	
Primer für Sequenzierung von MP71		
PrimMP71for	GCAGCATCGTTCTGTGTTGT	
PrimMP71rev	TTGTCTTGTGGCAATACACC	

Primersequenzen zur Identifizierung der TZR-Ketten mit Primerset bitte Dissertation von Schuster, 2008 entnehmen.

4.15 Sonstiges

Substanz	Artikel-Nr.	Hersteller
Smart Ladder 1kb	1700-02	Eurogentec
Streptactin-PE	6-5000-005	IBA
PI 25 mg	CN74.1	SIGMA

Kapitel 5

Methoden

5.1 Allgemeine Zellkultur

Die Zellkulturversuche wurden alle unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei der Kultivierung von adhären Zellen wurden bei einer 90–100 % Konfluenz, d.h. durchschnittlich alle 3–4 Tage, der Zellrasen mit Trypsin von der Oberfläche abgelöst und gesplittet. Ein Splitting der Suspensionszelllinien erfolgte bei Gelbfärbung des Mediums und/oder wenn augenscheinliche Proliferationsklümpchen auffielen. Für die Differenzierung von Leberzelllinien wurden Platten mit Kollagen (1:10) 30' bei 37 °C beschichtet. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zellen wurden zuvor ggf. vorverdünnt und dann in einem 1:2 Verhältnis mit Trypanblau angefärbt. Die Zellsuspension wurde dann auf die Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurde die Zellzahl in zwei Großquadranten bestimmt und mit 10⁴ und ggf. Vorverdünnungsfaktor multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5' zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und anschließend für 24 h in einer Einfrierhilfe bei –80 °C und danach in Flüssigstickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden eingefrorene Zellen rasch im Wasserbad erwärmt, dann mit 10 ml warmem Medium abzentrifugiert und in Kultur genommen. Ausnahme stellten primäre Lymphozyten dar, welche in zweimal 50 ml abzentrifugiert wurden. Wurden dies in Form von Buffy Coats aufgetaut, wurden zum Auftaumedium 50 U/ml Benzonase zugesetzt.

5.2 Retrovirale Transduktion von T-Zell-Rezeptoren in humane T-Zellen

5.2.1 Transfektion von 293T-Zellen

Drei Tage vor Transfektion wurden $2,5 \times 10^5$ 293T-Zellen in 2 ml Antibiotika freiem DMEM-Voll-Medium auf 6-Well-Platten ausgesät. Die Platten wurden zuvor mit je 2 ml Poly-L-Lysin, 1:20 in PBS pro Well beschichtet, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und danach mit 2 ml PBS pro Well gewaschen. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das alte Medium durch 2 ml neues Medium ausgetauscht. Nach Herstellerangaben wurde die Transfektion der 293T-Zellen mit 2 µg

TCR-Plasmid und je 1 µg Verpackungsplasmiden cDNA3.1-gag-pol und pALF10.a1-env sowie 10 µg Lipofectamin durchgeführt. Der Transfektionsansatz wurde für 6 h bei 37 °C inkubiert und danach der Überstand durch 1,5 ml DMEM-Voll-Medium ersetzt. Am zweiten und dritten Tag wurde der Überstand für die erste bzw. zweite Transduktion der PBMCs abgenommen und nach der ersten Abnahme durch 1,5 ml DMEM-Voll-Medium ersetzt.

5.2.2 Vorbereitung der humanen PBMCs

Die humanen PBMCs wurden am selben Tag, an dem die Transfektion stattfand, per Ficoll aus Heparin-Blut gewonnen oder nach Lagerung im Stickstofftank aufgetaut. Bei der Aufbereitung des Frischblutes wurde eine 1:1 Verdünnung mit RPMI-Voll-Medium hergestellt und je 25 ml auf eine 12,5 ml Ficoll-Schicht in einem 50 ml Falcon vorsichtig aufgetragen. Dies wurde dann mit 650 g für 20' bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die oberhalb der Ficollschicht liegende weißlich trübe PBMC-Schicht vorsichtig abgetragen und zweimal mit 50 ml Waschmedium abzentrifugiert. Wenn tiefgerorene PBMCs verwendet wurden, wurden diese zuerst in 37 °C warmem Wasserbad aufgetaut und dann behutsam in 10 ml hTZM (plus Benzonase im Verhältnis 1:1000) im 50 ml Falcon resuspendiert. Das Falcon wurde dann mit Wasch-Medium auf 50 ml aufgefüllt und mit 1500 rpm für 10' bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann erneut in 1 ml hTZM (mit Benzonase) resuspendiert, mit 50 ml Wasch-Medium aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal durchgeführt. Zur Zellzählung wurden die Zellen meist in 1 - 10 ml hTZM resuspendiert und entsprechend 1:10 – 1:2 verdünnt. *Non-tissue-culture-treated* 24-Well-Platten wurden zuvor mit 0,5 ml PBS und 5 µg/ml anti-CD3 (hOKT) und 0,05 µg/ml anti-hCD28 pro Well für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden diese mit 0,5 ml 2% BSA pro Well geblockt und nach 30' bei 37 °C nochmal mit 2 ml PBS gewaschen. In den anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten 24-Well-Platten wurden 1×10^6 Zellen pro Well in 1,5 ml hTZM mit 300 IU IL-2 pro ml ausgesät und für 2 Tage kultiviert.

5.2.3 Retrovirale Transduktion der humanen T-Zellen

Es wurden in der Vorbereitung *non-tissue-culture-treated* 24-Well-Platten mit 0,25 ml Retronectin (20 µg/ml in PBS) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Retronectin durch 0,5 ml 2% BSA in PBS ersetzt und für 30' bei RT geblockt. Abschließend wurden die Platten mit 2 ml PBS pro Well gewaschen. Der Retrovirusüberstand wurde nach 2 Tagen von den 293T-Zellen abgenommen und durch einen 45 µm Filter filtriert. Zu den transfizierten 293T-Zellen wurde pro Well 1,5 ml frisches DMEM-Voll-Medium hinzugefügt. Von dem filtrierten Retrovirus-Überstand wurden 0,5 bis 0,7 ml pro Well aufgetragen und dann mit 2000 g bei 32 °C für 2 h zentrifugiert. Währenddessen wurden die stimulierten PBMCs aus den 24-Well-Platten durch auf- und abpipettieren abgelöst und dann mit 1400 rpm für 10' bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Pellets wurden dann in 5 ml Resuspensionsmedium aufgenommen (1:1; hTZM und AIMV Medium (+5% FCS)) und die Zellzahl bestimmt. Je nach Gesamtzellzahl wurden zwischen $0,7 \times 10^6$ und 1×10^6 T-Zellen pro Retronectin-gecoatetem Well in 1,5 ml hTZM mit 300 IU IL-2 pro ml ausgesät, nachdem der Retrovirusüberstand zuvor abgenommen wurde. Die Zellen wurden anschließend für 10 min mit 1000 g bei 32 °C spinokuliert. Nach 24 h erfolgte die 2. Transduktion, dazu wurden der neu

abgenommene Retrovirusüberstand wie oben bereits beschrieben aufbereitet und auf die Retronectin-coateten Wells aufgetragen. Anschließend wurden die T-Zellen auf die mit dem entsprechenden RV-gecoateten Wells wie oben beschrieben aufgetragen. Die Zellen wurden für 1–2 Tage weiter in den 24-Well-Platten kultiviert, bevor sie in kleine Zellkulturflaschen mit einer Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen/ml überführt wurden. Alle 2 Tage wurde dann 2/3 des Mediums durch frisches hTZM mit 300 IU IL-2 pro ml ausgetauscht.

5.3 Retrovirale Transduktion von T-Zell-Rezeptoren in murine T-Zellen

5.3.1 Transfektion der Verpackungszelllinie Plat-E

Ein Tag vor Transfektion wurden 1×10^6 Plat-E Zellen in 2 ml DMEM-Voll-Medium (ohne Antibiotika) in Poly-L-Lysin beschichtete 6-Well-Platten ausgesät. Die Plat-E Zellen wurden mit 4 µg TZR-Plasmid DNA (mittels Endotoxin-freier Präparation gewonnen) und 10 µl Lipofectamin pro Well transfiziert. Das weitere Vorgehen wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben.

5.3.2 Aufreinigung von murinen Splenozyten

Murine Splenozyten wurden aus Milzen von HHDtg bzw. CD45.1tg Mäusen aufgereinigt. Nach Präparation der Milz wurde diese in 3 ml mTZM in einer 3 cm Zellkulturschale durch ein 100 µm Zellsieb mit dem geriffelten Ende eines Spritzenstempels zerrieben. Die durch das Zellsieb zerkleinerte Zellsuspension wurde mit einer 20 G Kanüle aufgezogen um eine weitere Vereinzelnung der Splenozyten zu erreichen. Insgesamt wurde pro Milz diese Schritt noch zwei Mal durchgeführt. Die gewonnenen Splenozyten wurden anschließend bei 180 g, bei 6 °C für 8' zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde 3 ml TAC-Puffer hinzugegeben und die Zellen für 2' im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Zellyse wurde mit 27 ml mTZM gestoppt und erneut zentrifugiert. Um mögliche restliche Zellklumpen zu beseitigen, wurde das Zellpellet in 10 ml mTZM resuspendiert und erneut über ein angefeuchtetes Zellsieb gegeben. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und danach in 20 ml aufgenommen. Für die Waschvorgänge wurde immer eiskaltes Medium verwendet und während sämtlichen oben aufgezählten Schritten wurden die Zellen auf Eis gehalten.

5.3.3 Aufreinigung von primären murinen Hepatozyten

Die Tiere wurden mit CO₂ getötet. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol desinfiziert, die Maus entsprechend auf der Unterlage fixiert und der Bauchraum eröffnet. Die Darmschlingen wurden nach rechts zur Seite gelegt und die Leber und die zuführende Pfortader wurden dargestellt. Die Pfortader wurde mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle punktiert. Das Präperfusionsmedium wurde zuvor auf ca. 40 °C erhitzt, damit es eine Temperatur von 37 °C hatte, wenn es die Leber erreichte. Mittels einer Pumpe wurde die Leber mit dem erwärmten Präperfusionsmedium über 5–10 min mit einer Laufrate von 9 ml/min perfundiert. Nach Start der Perfusion wurde die Vena cava inferior eröffnet, damit ein ausreichender Abfluss gewährleistet war. Als nächstes wurde die Leber mit

Kollagenase-Medium bei einer Laufrate von 15 ml/min über ca. 8 min perfundiert. Die Kollagenase (30 mg auf 100 ml) wurde kurz vor der Perfusion zum Kollagenase-Medium hinzugefügt und das Kollagenase-Medium ebenfalls auf 40 °C im Wasserbad erhitzt. Gelang eine ausreichende Perfusion der Leber in situ nicht, wurde die Leber herauspräpariert und die Leber ex situ unter sterilen Zellkulturbedingungen in eine Petrischale mit Kollagenase-Medium gelegt und mit Kollagenase-Medium über 15 min perfundiert (Laufrate 15 ml/min). Ab nun wurden alle Schritte ebenfalls unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde die per Kollagenase verdaute Leber in eine kleine Petrischale mit Kollagenase-Medium gelegt und die Gallenblase entfernt. Die Hepatozyten bzw. das Leberparenchym wurde vorsichtig von der Leberkapsel abgelöst und die gewonnene Zellsuspension durch einen Zellstainer in ein 50 ml Falcon filtriert. Die Zellsuspension in den Falcons wurde mit kaltem Wasch-Medium aufgefüllt und für 5' mit 50 g bei 12 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in ca. 8,5 ml Erhaltungsmedium resuspendiert und pro Mausleber wurden 2 Wells einer 6-Well-Platte mit 1 ml/Well und 12 Wells einer 24-Well-Platte mit 0,5 ml/Well mit dieser Zellsuspension zur Kultivierung ausgesät. Die primären Hepatozyten wurde für 3 Tage kultiviert, bevor die Kokultur mit den B3Z Zellen begonnen wurde.

5.3.4 Retrovirale Transduktion der murinen T-Zellen

Transduziert wurden entweder murine B3Z-Zellen oder murine Splenozyten, die zuvor aus Milzen von CD45.1tg Mäusen isoliert wurden. Vor Transduktion der Zellen wurden 6-Well-Platten mit 1 ml verdünntem Retronektin (1:80 in PBS für 2 h bei RT) inkubiert. Danach wurde das Retronektin abgenommen und ggf. zur erneuten Verwendung wieder eingefroren. Anschließend wurden die Platten mit 2% BSA in PBS für 30' bei 37 °C geblockt und anschließend ggf. mit 0,025 M Hepes über Nacht bei 4 °C gelagert. Der von den transfizierten Plat-E-Zellen abgenommene Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert.

Sollten murine Splenozyten transduziert werden, so wurden einen Tag vor der Transduktion $2,5 \times 10^6$ Splenozyten pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht (ÜN) in 2,5 ml mTZM mit 10 ng/ml IL-2, 2 µg/ml anti-mCD3 und 0,1 µg/ml anti-mCD28 stimuliert. Zur Transduktion der murinen Splenozyten wurden dann 720 µl Retrovirusüberstand pro Retronektin-beschichtetes Well aufgetragen und mit 2000 g bei 32 °C für 2 h zentrifugiert. Währenddessen wurden die murinen Splenozyten für 10' mit 180 g bei RT zentrifugiert und in frischem mTZM aufgenommen. Dann wurden pro Well ca. 1×10^6 murine Splenozyten in 1 ml mTZM auf die Retrovirus-beschichteten 6-Well-Platten aufgetragen und für 10' mit 100 g zentrifugiert. Nach 24 h erfolgte die 2. Transduktion. Der neu produzierte Retrovirusüberstand wurde, wie oben bereits beschrieben, aufbereitet und auf Retronektin-gecoatete Wells per Zentrifugation (200 g bei 32 °C für 2 h) aufgetragen. Anschließend wurden die T-Zellen auf die mit dem entsprechenden RV-gecoateten Wells wie oben beschrieben zur 2. Transduktion aufgetragen. Die Zellen wurden dann für 1–2 Tage in den Platten weiter kultiviert bevor sie in kleine Zellkulturflaschen mit einer Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen/ml überführt wurden.

Bei Transduktion von B3Z-Zellen war keine Stimulation nötig. Ansonsten erfolgte die Transduktion wie oben beschrieben. An Retrovirusüberstand wurde 1 ml pro Retronektin-beschichtetem Well aufgetragen.

5.4 Kokulturen und funktionelle Analysen der humanen T-Zellen

Vor den funktionellen Analysen wurde 2–4 Tage zuvor die IL-2 Stimulation im Sinne einer Resting-Phase reduziert, indem 2/3 des alten hTZM durch hTZM mit nur noch 30 IU IL-2 pro ml ersetzt wurde. Dann wurde die funktionelle Testung nach dem in Abb. 5.4.1 aufgezeichneten Zeitplan durchgeführt.

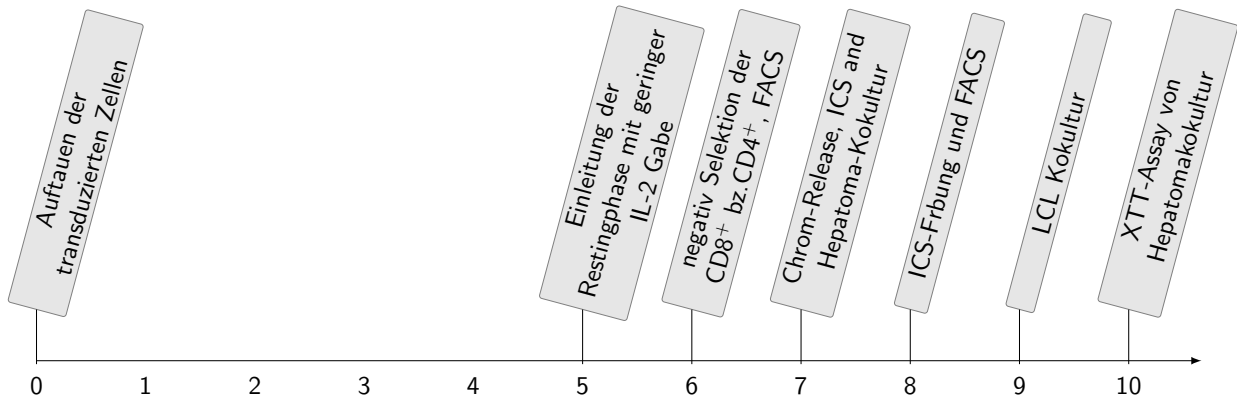


Abb. 5.4.1: Zeitplan der separaten funktionellen Testung von transduzierten CD8⁺ und CD4⁺ Zellen (Zeit in d)

5.4.1 Separation der CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen

Zur getrennten funktionellen Analyse von transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ wurden für die C18- und S20-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduzierte T-Zellen aufgetaut, die zuvor transduziert und anschließend nach 7 Tagen Stimulation eingefroren worden waren. Bei den S172-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurden aufgrund zu geringer Zellzahl erneut PBMCs transduziert. Von den tiefgefrorenen PBMCs wurden $3,5\text{--}4 \times 10^7$ Zellen pro TZR aufgetaut (siehe Kapitel 5.2.2) und in 13 ml hTZM mit 300 IU/ml IL-2 in kleine Zellkulturflaschen resuspendiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen auf zwei kleine Zellkulturflaschen gesplittet und 6,5 ml hTZM mit 300 IU/ml IL-2 hinzugefügt. Am 5. Tag wurden die Zellen in die Restingphase versetzt, indem 6,5 ml altes Medium durch hTZM mit 30 IU/ml IL-2 ersetzt wurde.

Aus den proliferierten transduzierten PBMCs wurde am darauffolgenden Tag mittels dem CD8⁺ bzw. CD4⁺T Cell Isolation Kit von MACS Miltenyi Biotec per Depletion der Nicht-Zielzellen aufgereinigte CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen gewonnen. Dazu wurden die Nicht-Zielzellen an Biotin-gelabelte Antikörper gebunden, die wiederum in einem zweiten Schritt mit einem Anti-Biotin-Antikörper, der mit einem MicroBead konjugiert ist, markiert wurden. Die Zellsuspension wurde dann über eine MACS Säule, die im magnetischen MACS Separator befestigt war, filtriert. Die nicht gelabelten Zellen erschienen im Durchfluss und die gelabelten Zellen wurden über die MicroBeads in der Säule im magnetischen Feld raus filtriert. Der MACS Buffer wurde selbst hergestellt, indem eine 2 mM EDTA-Lösung mit einem pH von 7,4 angesetzt und autoklaviert wurde und anschließend daraus durch Hinzufügen von steril filtriertem BSA eine 0,5 % BSA-Lösung hergestellt wurde. Pro TZR wurden je 3×10^7 PBMCs mit dem CD8⁺ bzw. CD4⁺T Cell Isolation Kit nach Herstellerangaben

aufgereinigt. Beim Auswaschen der nicht depletierten Zellen wurde zweimal mit 5 ml Puffer gespült. Die depletierten Zellen wurden mit 5 ml Puffer ausgewaschen und anschließend in 8 ml hTZM mit 300 IU/ml IL-2 aufgenommen.

5.4.2 Kokultur mit Hepatomazellen und XTT-Test

Die Hepatomazelllinien HepG2 bzw. HepG2.2.15 sind nicht geeignet für die Verwendung im Chrom-Release-Assay (s. Kapitel 5.4.5), da sie sich schlecht vereinzeln lassen und durch Trypsinierung ihre Differenzierung einbüßen und die gewollte HBV-Replikation in den Zielzellen reduziert wäre. Deswegen musste ein anderes Verfahren zur Bestimmung der Viabilität bzw. der spezifisch lysierten Hepatomazellen nach Kokultur mit transduzierten T-Zellen verwendet werden. Es wurde das Zell-Proliferations-Kit XTT von Roche verwendet. Dieses basiert auf der Verstoffwechslung des gelben Tetrazolium Salzes XTT durch metabolisch aktive Zellen in den roten Farbstoff Formazan, dessen Konzentration mittels Spektrophotometer bestimmt werden kann.

HepG2 bzw. HepG2.2.15 -Hepatomazellen wurden mit 5×10^4 Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte ausgesät und dann für 10 Tage mit Differenzierungsmedium behandelt. Nach der Ausdifferenzierung dieser Zellen waren die Hepatomazellen konfluent und es konnten Kokulturen mit verschiedenen Effektor- zu Zielzellverhältnissen angesetzt werden. Die als Effektorzellen verwendeten transduzierten CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen wurden dabei auf ihre Transduktionsrate angepasst, d.h. die Anzahl an TZR⁺ Zellen war für jeden TZR gleich, die Gesamtzellzahl der hinzugefügten Zellen jedoch unterschiedlich. Für die Kokultur wurden 200 µl des Differenzierungsmediums durch 100 µl hTZM ersetzt, die transduzierten CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen wurden dann mit der entsprechenden berechneten Konzentration in 100 µl aufgetragen. Nach 72 h Kokultur wurde, nach Abzentrifugation mit 1500 rpm für 2', 150 µl ÜS pro Well abgenommen und zur späteren Analyse mittels IFN- γ -ELISA bei -20 °C tiefgefroren. Zu den Zellen wurden sofort 125,5 µl XTT-Lösung pro Well hinzugegeben. Diese wurde nicht nach Herstellerangaben verwendet, sondern bestand aus 100 µl DMEM ohne Phenolrot, 25 µl XTT-Reagent und 0,5 µl Elektronenkoppler. Nach einer Inkubation bei 37 °C für etwa 2–3 h wurde die Konzentration an verstoffwechseltem Formazan mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt.

Die IFN- γ -Konzentration aus dem Kokulturüberstand wurde mittels dem Human IFN- γ -ELISA von BioLegend durchgeführt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt bis auf den Unterschied, dass statt Avidin HRP aus dem Kit Avidin HRP von BD (Artikel-Nr. 51-26437E-7) verwendet wurde. Aufgrund zum Teil sehr hoher IFN-Konzentration im Überstand der Kokulturen mussten die Proben teils um den Faktor 50 verdünnt werden, damit sie mit dem IFN- γ -ELISA von BioLegend gemessen werden konnten.

5.4.3 Kokultur mit HepaRG

Da HepaRG Zellen nicht HLA-A*02:01⁺ sind, musste eine neue Zelllinie per retroviraler Transduktion generiert werden. Die Generierung dieser HLA-A*02:01⁺ HepaRG-Zelllinie wurde von Christina Dargels aus unserem Labor durchgeführt (Wisskirchen et al., 2017).

Die HepaRG HLA-A*02:01⁺ Zellen wurden in 12-Well-Platten für 2 Wochen in HepaRG-Medium (William's Medium mit Zusatz von 10 % FBS Fetaclone II, 1 % Pen/Strep, 1 % Glutamin, 0,023 IU/ml

human Insulin, 4,7 µg/l Hydrocortison, 80 µg/ml Gentamicin) und anschließend für weitere 2 Wochen in HepaRG-Differenzierungsmedium (HepRG-Medium mit zusätzlich 1,8 % DMSO) ausdifferenziert. Dann wurde ein Teil der Zellen mit konzentriertem HBV (MOI 200), gewonnen aus HepG2.2.15, und 5 % PEG als Zusatz infiziert. Der Ansatz wurde über Nacht inkubiert und anschließend die Zellen pro Well dreimal mit 1ml PBS gewaschen.

Nach weiteren 20 Tage Differenzierung im HepRG-Differenzierungsmedium wurde die Kokultur angesetzt. Zur Abschätzung der Infektionsrate wurde zuvor HBeAg aus dem Überstand mit dem Enzygnost HBe monoclonal Kit bestimmt. Diese war mit einem durchschnittlichen HBeAg von 0,129 OD sehr gering. Als Effektorzellen wurden T-Zellen, die mit den drei T-Zell-Rezeptoren 5E, 4G und WL12 zuvor transduziert worden waren verwendet. Pro TZR wurden 4×10^4 TZR⁺ CD3⁺ Effektorzellen mit entweder HLA.A*02:01⁺ oder HLA.A*02:01⁻ HBV infizierten HepaRG-Zellen kokultiviert. Des Weiteren wurde pro TZR eine Negativkontrolle mit 4×10^4 TZR⁺ CD3⁺ Effektorzellen und nicht infizierten HLA.A*02:01 HepaRG angesetzt. Als Kokulturmedium wurde pro Well 2 ml Hepa-RG-Medium verwendet. Anzumerken ist hierbei, dass wir in einem Vorversuch herausfanden, dass differenzierte HepaRG-Zellen in HepaRG-Medium ohne DMSO-Zusatz nach ca. 3 Tagen etwas vermehrt tote Zellen und nach 6 Tagen deutlich vermehrt tote Zellen im Vergleich zum HepaRG-Differenzierungsmedium aufwiesen.

Nach 24 h wurde Überstand für einen IFN- γ -ELISA abgenommen und nach 72 h wurde ein XTT durchgeführt. Für den XTT-Test wurden nach Entfernung des alten Mediums pro Well 500 µl DMEM ohne Phenolrot, 62,5 µl XTT-Reagent und 1,25 µl Elektronenkoppler hinzugefügt und für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde die Konzentration an verstoffwechseltem Formazan mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt.

5.4.4 Kokultur mit lymphoblastoiden Zell-Linien (LCL)

Durch die Kooperation mit der AG Krackhardt (Translationale Immuntherapie, Medizinische Klinik III, Rechts der Isar, München) sowie der AG Bertoletti (Singapore Institute for Clinical Sciences, A*STAR, Singapore) standen uns 12 lymphoblastoide Zelllinien mit unterschiedlichen HLA-A2-Subtypen zu Verfügung (siehe Tabelle 4.7). Die 13 lymphoblastoiden Zell-Linien wurden mit 1 µM für 2 h bei 37 °C inkubiert und dann 2,5 Mal gewaschen. Dann wurden 1×10^4 TZR⁺ T-Zellen mit 2×10^4 Peptid beladenen LCL inkubiert. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und zur Bestimmung der IFN- γ -Konzentration verwendet (siehe Kapitel 5.4.2).

5.4.5 Chromium-Release-Assay

Der Chromium-Release-Assay ist ein sensitiver Killing-Assay, bei dem in unserem Fall Zielzellen mit Peptid beladen und mit radioaktivem Chrom markiert wurden. Werden diese Zellen lysiert, kann das freigesetzte radioaktive Chrom aus dem ÜS bestimmt werden. Als Zielzellen wurden die T2-Suspensionszellen verwendet und mit verschiedenen Konzentrationen Peptid beladen. Die Peptidverdünnungen wurden mittels Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 von der Peptid-Stockkonzentration ausgehend hergestellt. Die T2-Zellen wurden zunächst mit Wasch-Medium bei 1500 rpm für 5' bei RT gewaschen und dann in 10 ml Wasch-Medium gelöst und die

Zellzahl bestimmt. Pro Peptidkonzentration wurden dann 1×10^6 Zellen abzentrifugiert und das Medium bis auf ca. 20 μl abgesaugt. Anschließend wurde zu dem Zellpellet 10 μl der jeweiligen Peptidkonzentration hinzugefügt und dann mit weiteren 30 μl hTZM resuspendiert. Im Radioaktivlabor wurde das radioaktive Chrom 1:4 mit hTZM verdünnt und davon pro Peptidverdünnung 40 μl zu den T2-Zellen hinzugefügt (Gesamtvolumen 100 μl), sodass 1×10^6 Zellen mit 50 μCi Chrom inkubiert wurden. Dadurch wurde die Peptidkonzentration um 1:10 verdünnt, sodass die Endkonzentration in der Kokultur um das 10-fache geringer war als die zuvor angesetzte Peptidkonzentration. Die T2-Zellen wurden dann für 1–1,5 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden pro Peptidkonzentration je 3 Triplikate mit 2×10^4 TZR⁺ Effektorzellen in 100 μl pro Well auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Nachdem die Zielzellen 3,5x mit 10 ml hTZM mit 1500 rpm für 5' bei RT gewaschen worden waren, wurden davon 2×10^4 Zellen in 100 μl hTZM pro Well hinzugefügt. Um die Spontanlyse bzw. Maximallyse zu bestimmen, wurde zu den Zielzellen statt der Effektorzellen hTZM bzw. 2% Triton hinzugefügt. Die Kokulturen wurden dann für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten abzentrifugiert und 30 μl ÜS auf eine LUMA-Platte aufgetragen. Die LUMA-Platten wurden über Nacht unter dem Abzug getrocknet und am folgenden Tag dann am Top Count NXT ausgelesen (Messeinheit: „counts“). Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel bestimmt: $((\text{counts Ko-Kultur} - \text{counts Spontanlyse}) / (\text{counts Maximallyse} - \text{counts Spontanlyse})) \times 100$.

5.5 Kokulturen und funktionelle Analysen der murinen T-Zellen

5.5.1 Kokultur der transduzierten murinen B3-Zellen mit murinen Splenozyten

Aus der Milz einer HHDtg und einer CD45.1⁺ Maus wurden Splenozyten isoliert wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben. Die murinen Splenozyten wurden mit 1 μM des jeweiligen HBV-Peptids, dem OVA-Peptid oder keinem Peptid für 1 h in AIMV-Medium inkubiert. Danach wurden die Peptid-beladenen Splenozyten gewaschen. Es wurden Triplikate pro Kokultur angelegt. 1×10^5 Effektorzellen (transduzierte oder nicht transduzierte B3Z Zellen) wurden in 100 μl mTZM mit Peptid beladenen bzw. unbeladenen murinen Splenozyten (1×10^5 Zellen in 100 μl) pro Well kokultiviert. Die transduzierten B3Z Zellen wurden mit Splenozyten aus der HHDtg Maus kokultiviert. Als Positivkontrolle für den Assay wurden untransduzierte B3Z und ein Pool aus transduzierten B3Z-Zellen mit Peptid beladenen CD45.1⁺ Splenozyten kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden untransduzierte B3Z und ein Pool aus transduzierten B3Z-Zellen mit unbeladenen CD45.1⁺ Splenozyten kokultiviert. Nach 48 h wurde ein β -Galaktosidase-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 5.5.3).

5.5.2 Kokultur der transduzierten murinen B3-Zellen mit primär murinen Hepatozyten

Die mit den S20-spezifischen TZR 4G und dem C18-spezifischen TZR 6K transduzierten B3Z-Zellen wurden 10 d vor der Kokultur mit den primären Hepatozyten aufgetaut und in RPMI-Voll-Medium in Kultur genommen. Die primär murinen Hepatozyten (PMH) aus einer HHDtg Maus (HHD⁺) bzw. einer CD45.1⁺ Maus (H2D^{b+}) wurden 3 Tage vor der Kokultur gewonnen, wie in Kapitel 5.3.3 beschrieben und in PMH Erhaltungs-Medium in einer 24-Well-Platte kultiviert. Am Tag vor der Kokultur wurde per FACS-Analyse die Expressionsrate in den B3Z-Zellen bestimmt. Vor Beginn der

Kokultur wurde je ein Well der HHD⁺ PMH bzw. H2D^{b+} PMH mit dem C18- bzw. S20-Peptid und zwei Wells der H2D^{b+} PMH mit dem OVA-Peptid (SIINFEKL) beladen. Zwei Wells der HHD⁺ PMH wurden unbehandelt belassen. Die Peptidbeladung erfolgte, indem in 1 ml Erhaltungs-Medium 1 μ M des entsprechenden Peptids für 1 h bei 37 °C mit den PMH inkubiert wurde. Anschließend wurden die PMH gewaschen, indem die Wells auf 2/3 des Volumens mit Erhaltungs-Medium aufgefüllt wurden und mit einer Pipette über dem Zellrasen auf- und abpipettiert wurde und danach das Medium mit dem aufgewirbelten Zellschrott abgenommen wurde. Die Wells wurden dann erneut mit 2 ml Kokultur-Medium (William's Medium + 5 % FCS + 10 % Pen/Strep + 10 % L-Glutamin) gewaschen. Nach dem erneuten Waschvorgang wurde dann 0,5 ml Kokulturmedium zu den PMH pro Well sowie anschließend $0,5 \times 10^6$ Effektorzellen (mit TZR 4G oder TZR 6K transduzierte CD3⁺ CD8⁺ Streptamer⁺ B3Z-Zellen) in 1 ml Kokultur-Medium hinzugefügt. Die Kokultur wurde dann für 24 h bei 37 °C fortgeführt.

Je TZR wurden Kokulturen mit unbeladenen bzw. dem jeweiligen HBV beladenen HHD⁺ Hepatozyten und mit dem OVA-Peptid bzw. dem jeweiligen HBV-Peptid beladenen H2D^{b+} HLA.A*02:01-Hepatozyten angesetzt. Nach 24 h wurde ein β -Galaktosidase-Assay aus den Überständen durchgeführt und daraus indirekt die T-Zell-Aktivierung bestimmt.

5.5.3 β -Galaktosidase-Assay

Der β -Galaktosidase-Assay wurde verwendet, um die T-Zell-Aktivierung in den murinen B3Z-Zellen zu bestimmen. Die B3Z-Zellen exprimieren das Enzym β -Galaktosidase unter dem NFAT2-Promoter, sodass die β -Galaktosidase in diesem Modell als Marker für T-Zell-Aktivierung genommen werden kann. Dazu wurden die Zellen der Kokultur mit 1500 rpm für 1' abzentrifugiert und der ÜS abgenommen und bei -20 °C tiefgefroren.

Für die Kokultur der B3Z-Zellen mit den murinen Splenozyten in 96-Well-Platten wurden die Zellen in 100 μ l Lysepuffer pro Well resuspendiert und für 5–10' bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zu dem Lysat wurde 100 μ l β -Galaktosidase Reaktionspuffer, in dem sich das Substrat der β -Galaktosidase befindet, gegeben und für 20' bei RT inkubiert. Danach wurde die β -Galaktosidaseaktivität über die Umsetzung des Substrats Chlorophenolrot- β -D-Galactopyranosid in den Farbstoff Chlorophenol photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm mit dem ELISA-Reader Infinte F200 bestimmt.

Für die Kokultur der B3Z-Zellen mit den primär murinen Hepatozyten in der 24-Well-Platte wurden entsprechend die Zellen in 2 ml Lysepuffer pro Well resuspendiert und für 5–10' bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurden pro Well 1 ml des Lysats auf eine neue 24-Well-Platte übertragen und 1 ml β -Galaktosidase Reaktionspuffer hinzugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde wie oben beschrieben die β -Galaktosidaseaktivität photometrisch durch Bestimmung der Extinktion mittels dem ELISA-Reader Infinte F200 bestimmt.

Die photometrische bestimmte Extinktion für jede Kokultur wurde ins Verhältnis zur gemessenen Extinktion nach spezifischer Stimulation des endogenen OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptors der B3Z-Zellen gesetzt.

5.6 Durchflusszytometrie

5.6.1 Streptamer- und Oberflächenfärbung

Pro Probe wurden zwischen 50–150 μl Zellsuspension in eine 96-Well-V-Boden-Platte überführt und mit 1500 rpm für 5' bei 4 °C abzentrifugiert und anschließend mit 180 μl FACS-Puffer gewaschen (1500 rpm, 5', 4 °C). War eine Streptamerfärbung der T-Zell-Rezeptoren mit gleichzeitiger Oberflächenfärbung vorgesehen, wurde zuerst die Streptamerfärbung durchgeführt. Pro Well wurden die Zellen dann in 50 μl FACS-Puffer, in den zuvor 1 μl Streptactin und 0,4 μg des jeweiligen pMHC hinzugefügt worden waren, resuspendiert und für 25' auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation auf Eis wurden die entsprechenden Antikörper für die Oberflächenfärbung in 20 μl FACS-Puffer hinzugefügt und für weitere 20' inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2,5 mal mit 180 μl FACS-Puffer gewaschen (1500 rpm, 5', 4 °C), in 100–200 μl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Zur Färbung der toten Zellen wurde kurz vor der Messung 10 μl verdünntes PI in FACS-Puffer hinzugefügt und kurz gemischt. Die Messungen wurden an einem BD FACSCantoII durchgeführt und anschließend mittels FlowJo 9.2 Software analysiert.

5.6.2 Kokultur mit T2-Zellen und intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die Effektorzellen zuvor mit Peptid beladenen T2-Zellen kokultiviert. Zu den abzentrifugierten T2-Zellen wurde pro 1×10^6 Zellen 10 μl der entsprechenden Peptidvorverdünnung hinzugefügt und erneut mit hTZM um 1:10 verdünnt. Nach Resuspension der Zellen wurden diese für 1 h bei 37 °C mit Peptid beladen. Anschließend wurden die T2-Zellen 3,5x mit 14 ml Waschmedium gewaschen und danach mit hTZM auf 1×10^5 /100 μl eingestellt.

In der Kokultur wurden dann 1×10^5 Peptid-beladene T2-Zellen mit 1×10^5 Effektorzellen für insgesamt 4 h in 200 μl hTZM miteinander inkubiert. Nach der ersten Stunde Kokultur wurde BFA (finale Konzentration 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben, um die Sekretion der Zytokine zu blocken, um später eine gute intrazelluläre Zytokinfärbung zu erreichen. Nach 4 h wurden die 96-Well-Platten mit Parafilm verschlossen und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Tag fand die intrazelluläre Färbung (ICS) statt. Alle folgenden Schritte der ICS wurden auf Eis durchgeführt. Es wurde das Cytofix/Cytoperm-Kit von BD verwendet. Die mit 1500 rpm für 5' bei 4 °C abzentrifugierten Zellen wurden mit 50 μl EMA (1:2000 in FACS-Puffer, Stock 2mg/ml) für 20' unter Lichtbestrahlung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2,5x mit 200 μl gewaschen und für die PBMCs bzw. CD8⁺ Zellen eine Streptamerfärbung durchgeführt. Dazu wurden pro Well 0,5 μl Streptactin und 0,2 μg pMHC in 30 μl FACS-Puffer verwendet. Nach 45' Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen 1,5x gewaschen, in 100 μl Cytofix/Cytoperm pro Well resuspendiert und für 20' inkubiert. Im nächsten Schritt wurde dann 100 μl Perm/Wash-Puffer hinzugefügt und die Zellen mit 1800 rpm für 5' bei 4 °C abzentrifugiert und 2x mit 200 μl Perm/Wash-Puffer mit 1800 rpm für 5' bei 4 °C gewaschen. Danach wurden die Zellen pro Well zur Oberflächenfärbung (CD8, CD4 und für TZR-Färbung in CD4⁺ Zellen der anti- μTRBC) und intrazelluläre Färbung (IFN- γ , TNF- α , IL-2) in 50 μl Perm/Wash-Puffer Antikörpermischung für 20' inkubiert. Darauf wurden die Zellen 3,5x mit 200 μl Perm/Wash-Puffer gewaschen, in 180 μl resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messungen wurden an einem BD FACSCantoII durchgeführt.

5.7 Molekularbiologische Methoden

5.7.1 RNA-Isolation

Zur Isolierung der RNA aus den T-Zellen wurden die Zellen mit 400 g bei 4 °C für 5' abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Trizol für 5' bei RT inkubiert. Es wurde je ml Trizol 200 µl Bromchlorpropan hinzugefügt und für 15'' gevortext. Nach 10' Inkubation wurde die Suspension mit 1200 g bei 4 °C für 5' zentrifugiert. Die sich bildende obere farblose, wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gevortext. Nach 10' Inkubation bei RT wurde erneut mit 1200 g bei 4 °C für 5' zentrifugiert und der ÜS vorsichtig ohne Verlust des RNA-Pellets abgenommen. Das RNA-Pellet wurde dann mit 0,5 ml 75% Ethanol in DEPC- H₂O mit 1200 g bei 4 °C für 5' gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl DEPC- H₂O aufgenommen.

5.7.2 cDNA-Synthese

Die aus den HBV-spezifischen T-Zell-Klonen gewonnene RNA wurde mittels zwei verschiedener Verfahren in cDNA umgeschrieben. Für die anschließende Identifizierung (siehe Kapitel 5.7.3) der α -TZR-Ketten mittels der degenerierten Primer wurde cDNA als Template benötigt, die über den spezifischen Primer CA1 synthetisiert wurde. Die cDNA-Synthese für die Identifizierung der α -TZR-Kette wurde mit dem AMV-Kit von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Primer CA1, der im konstanten Bereich der α -Kette bindet, wurde als spezifischer Primer verwendet. Es wurde dabei 1 µg RNA oder bei geringer RNA-Konzentration das Maximalvolumen von 8,2 µl eingesetzt.

je Ansatz:

10x Reaktionspuffer	2	µl		
MgCl ₂	4	µl		
dNTPs	2	µl		
CA1-Primer (10 pmol/µl)	2	µl		
RNase Inhibitor	1	µl		
AMV Reverse Transkriptase	0,8	µl		
H ₂ O	up to 20	µl		
Template RNA	1 µg oder 8,2 µl			
Gesamt.:	20	µl		

			cDNA-Synthese Programm		
			1.	25 °C	10'
			2.	42 °C	60'
			3.	99 °C	5'

Für die Identifizierung der β -TZR-Kette sowie die Amplifikation der kompletten TZR-Ketten mit den spezifischen Primern wurde die cDNA-Synthese mit dem Superscript II Reverse Transcriptase von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.7.3 PCR-Verfahren zur Identifizierung der TZR-Ketten

Zur Identifizierung der TZR-Ketten wurde jeweils ein Fragment aus der entsprechenden variablen Region der TZR-Ketten amplifiziert und anschließend sequenziert. Da diese aufgrund der somatischen Rekombination verschiedene V-Segmente enthalten können und die DNA-Sequenz für die variablen Regionen somit unbekannt war, wurden zwei etablierte PCR-Verfahren verwendet. So besteht die Möglichkeit für jedes einzelne V-Segment einen spezifischen Primer zu verwenden. Für

die verschiedenen möglichen V-Segmente der β -TZR-Kette sind das 34 verschiedene Primer, für die α -TZR-Kette 38 verschiedene Primer. Dies bedeutet jedoch, dass für jedes einzelne V-Segment eine separate PCR durchgeführt werden muss. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von degenerierten Primern, die an konservierte Bereiche der V-Segmente binden und somit eine gleichzeitige Amplifikation fast des kompletten T-Zell-Rezeptor-Repertoires ermöglichen (Zhou et al., 2006). Beide Methoden decken einen Großteil des V-Segment-Repertoires ab, da jedoch bei der Verwendung der degenerierten Primer insgesamt weniger PCR-Ansätze und somit weniger cDNA benötigt wird, wurde diese zuerst durchgeführt und nur bei keinen oder unsauberem PCR-Produkten eine PCR mit dem spezifischen Primer-Repertoire durchgeführt. Für alle PCRs wurden das PCR Pure Taq Kit von GE verwendet, bei dem Polymerase, Puffer und Nukleotide bereits vordosiert in Einzeldosenperlen vorliegen und daher nur noch Primer, cDNA und Wasser hinzugefügt wurde.

5.7.3.1 PCR mit degenerierten Primern

Es wurde ein von Bernhard Frankenberger (Hämatologikum, München) optimiertes Protokoll verwendet, basierend auf der Publikation von Zhou et al., 2006. Für die Amplifikation der β -Kette wurde als erstes der VP1-Primer, der an 76 % Prozent aller V-Segmente bindet, mit dem Primer CP1, der in der konstanten Region bindet, verwendet. Konnte hier kein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden, wurde die PCR mit dem Primer VP2, der 26 % der V-Segmente abdeckt, wiederholt. Für die α -Kette wurde die cDNA aus der Synthese mit dem CA1 Primer verwendet. Mit dem 5'-Primer VPANHUM und dem 3'-Primer CA2 erfolgte dann die PCR zur Identifikation der α -Kette.

Deg. α -Ketten-PCR		Deg. β -Ketten-PCR	
cDNA(AMV)	3 μ l	cDNA(SuperscriptII)	1,5 μ l
VPANHUM Primer 10 pmol/ μ l	4 μ l	VP1 oder VP2 Primer 5 pmol/ μ l	16 μ l
CA2 Primer 10 pmol/ μ l	4 μ l	CP1 Primer 5 pmol/ μ l	1,6 μ l
H ₂ O	14 μ l	H ₂ O	5,9 μ l
	25 μ l		25 μ l

95 °C	10'		
<hr/>			
95 °C	1'		
50 °C	2'	2x	
72 °C	2'		
<hr/>			
95 °C	1'		
55 °C	2'	40x	
72 °C	2'		
<hr/>			
72 °C	10'		

95 °C	2'		
<hr/>			
95 °C	30''		
50 °C	30''	2x	
72 °C	30''		
<hr/>			
72 °C	10' x		

5.7.3.2 PCR mit Primerset für TZR-Ketten

Konnte mit den degenerierten Primern keines oder nur ein unreines PCR-Produkt amplifiziert werden, wurde zur Identifizierung der β - oder α -Kette eine PCR mit den Primern spezifisch für

die einzelnen variablen Regionen durchgeführt. Es standen 34 verschiedene 5'V β -Primer bzw. 38 verschiedene 5'V α -Primer für die Bindung in den variablen (V) TZR-Regionen zur Verfügung. Der jeweils entsprechende 3'-Primer (3'T-C α bzw. P-3'C β II) lag im jeweiligen konstanten Bereich (C) des TZR-Gens.

Der entsprechende 3'-Primer (P-3'C β II bzw. 3'T-C α) bindet im jeweiligen konstanten Bereich der TZR-Kette.

Zudem erfolgte eine interne Kontrolle der PCR durch Amplifikation eines Bereichs in der konstanten Region mit den Primern P5'V β ST und P3'V β ST, um zu zeigen, dass die PCR methodisch korrekt durchgeführt wurde.

für α -Kette		für β -Kette	
cDNA (SuperscriptII oder AMV)	1 μ l	cDNA(SuperscriptII)	1 μ l
5'V α X Primer 10 pmol/ μ l	6 μ l	P5'V β X Primer	6 μ l
5'V α ST Primer 2,5 pmol/ μ l	2,8 μ l	P5'V β ST Primer 5 pmol/ μ l	4 μ l
3'V α ST Primer 2,5 pmol/ μ l	2,8 μ l	P3'V β ST Primer 5 pmol/ μ l	4 μ l
3'T-C α Primer 5 pmol/ μ l	4 μ l	P3'-C β II Primer 5 pmol/ μ l	4 μ l
H ₂ O	8,4 μ l	H ₂ O	6 μ l
	25 μ l		25 μ l
95 °C 2'			
95 °C 30''			
56 °C 30'' 2x			
72 °C 20''			
72 °C 10'			

5.7.4 Klonierung der einzelnen TZR-Ketten

Für jede α - und β -Kette wurden nach Identifizierung der TZR-Ketten anhand von vollständigen V-Segment-Sequenzen aus der IMGT-Datenbank „IMGT/Gene-DB“ Primer entworfen ¹. Die 5'-Primer waren dabei zwischen 15 bis 18 bp komplementär zum Beginn des V-Segments der jeweiligen α - oder β -Kette. Am 5'-Ende waren des Weiteren eine Kozak-Sequenz, für eine bessere Expression, sowie die Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym NotI angefügt. Die 3'-Primer waren in 20 bp komplementär zu den konstanten Regionen der TZR-Ketten und hatten am 5'-Ende eine EcoRI bzw. eine BsrGI-Restriktionsschnittstelle angefügt.

Mit den spezifischen Primern wurden nun aus der cDNA der T-Zell-Klone die jeweiligen TZR-Ketten amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen in den retroviralen Vektor pMP71, der uns von der Arbeitsgruppe Uckert (Max Delbrück Center, Berlin) zur Verfügung gestellt wurde, kloniert. Zur Amplifikation der TZR-Ketten wurde das Polymerase Kit Phusion Hot Start II benutzt. Die Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde über den T_m-calculator von Thermo Scientific berechnet ².

¹IMGT/Gene-DB aufgerufen unter www.imgt.org/genedb, siehe auch (Giudicelli et al., 2006)

²www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/

				Temp.	Zeit	Zyklen
5x Phusion HF Buffer	10	µl	Initiale Denaturierung	98 °C	30''	
10 mM dNTPs	1	µl				
5'-Primer (10 pmol/µl)	2,5	µl	Annealing	98 °C	10''	} 6x
3'-Primer (10 pmol/µl)	2,5	µl				
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5	µl				
Template cDNA	100	ng	Denaturierung	98 °C	20''	} 28x
			Annealing und Extension	72 °C	30''	
H ₂ O up to	50	µl	Extension			
Total:	50	µl	Finale Extension	72 °C		
			Pause	16 °C		

Die PCR-Produkte wurden per Gel-Elektrophorese auf ihre Größe geprüft und die korrekten Banden (β -Ketten bei 900bp, α -Ketten bei 800bp) ausgeschnitten und mit dem peqGold-Gel-Extraction Kit aufgereinigt. Danach wurden die PCR-Produkte mit den Fast-Digest-Enzymen NotI und EcoRI bzw. Bsp1407I (BsrGI) verdaut und erneut mit dem QIAquick-PCR-Purification aufgereinigt. Der Vektor pMP71 wurde ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, per Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Bande des vollständig verdauten MP71 wurde aufgereinigt. Die Ligation wurde mit dem Rapid DNA Dephos&Ligation Kit von Roche mit Dephosphorylierung des Vektors nach Herstellerangaben durchgeführt. 5 µl des Ligationsansatzes wurden dann zu 50 µl chemisch-kompetenten Stbl3 Bakterien hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde ein Hitzeschock der Stbl3-Bakterien bei 42 °C für 90'' durchgeführt mit sofortiger anschließender Kühlung der Bakterien auf Eis für 10'. Der komplette Ansatz wurde dann auf eine Ampicillin-haltige Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und damit 5 ml LB-Medium (mit Ampicillin) angeimpft. Anschließend wurde eine Mini-Präparation nach Herstellerangaben mit dem Kit von Fermentas sowie ein Kontrollverdau der Plasmid-DNA durchgeführt.

5.7.5 Klonierung der optimierten TZR-Konstrukte

Die Codonoptimierung der variablen TZR-Region wurde durch GeneArt von Invitrogen (Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Diese wurden dann durch eine dreistufige Fusions-PCR mit einer bereits optimierten murinen konstanten TZR-Region, die uns von der AG Uckert (Max Delbrück Center, Berlin) zur Verfügung gestellt worden war, verbunden (siehe Grafik im Ergebnisteil 2.4.1).

Um für alle T-Zell-Rezeptoren die gleiche PCR durchführen zu können, wurde an das 5'-Ende der variablen Regionen für die β -Kette eine zum Zielvektor pMP71 überlappende Sequenz und für die α -Kette eine Teilsequenz des P2A-Elements angefügt. Am 3'-Ende der variablen Regionen wurde jeweils eine Teilsequenz der entsprechenden konstanten Region angefügt. Diese Sequenzen wurden dann von GeneArt codonoptimiert und in einen Standardvektor kloniert.

Anhang	Bestandteil + Sequenz
5'V- β -Kette	MP71 + NotI-Schnittstelle + Kozak-Sequenz TCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAG GCGGCCGC CACC
3'V- β -Kette	muriner opt. TRBC-Abschnitt GAAGATCTGAGGAACGTGACCCCCCAAGGTGTCCCTGTTTCGAGC
5'V- α -Kette	P2A AAGCAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGGCCC
3'V- α -Kette	muriner opt. TRAC-Abschnitt ATCCAGAACCCCGAGCCCGCCGTGTACCAGCTGAAGGACCCAGA

Aus diesem Vektor wurden die neu codonoptimierten variablen Regionen der α - und β -Ketten mit den Primern alphaVariable_fw und alphaVariable_rev bzw. betaVariable_fw und betaVariable_rev amplifiziert (siehe Tabelle 5.7.1). Die murinen konstanten Regionen wurden aus einem codonoptimierten murinen TZR-Konstrukt, welches von der AG Uckert in den Vektor MP71 kloniert wurde, mit den Primern alphaConst_fw und alphaConstant_rv_EcoRI bzw. Primern betaConst_fw und betaConst_rev amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt, die korrekten Banden ausgeschnitten und aufgereinigt.

	Temperatur				Zeit	Zyklen
	β -Variabel	β -Konstant	α -Variabel	α -Konstant		
Initiale Denaturierung			98 °C		60''	1
Denaturierung			98 °C		10''	} 30
Annealing	65 °C	63 °C	68 °C	65 °C	20''	
Extension			72 °C		20''	
Finale Extension			72 °C		10'	1
Pause			16 °C			

Tabelle 5.7.1: PCR zur Amplifikation der optimierten variablen und konstanten TZR-Regionen.

Im nächsten Schritt wurden mittels Fusions-PCR die variablen und konstanten Regionen der α -Kette bzw. β -Kette miteinander verbunden und amplifiziert (siehe Tabelle 5.7.2). Zuerst wurden die variablen und konstanten Regionen der α - bzw. β -Kette aus Schritt 1 für 1' bei 98 °C denaturiert, anschließend erfolgte ein Annealing der überlappenden Bereiche und dann die Extension bei 72 °C. Die dadurch fusionierte α - bzw. β -TZR-Kette wurde nun mit den Primern alphaVariable_fw und alphaConst_rv_EcoRI. bzw. betaVariable_fw und betaConst_rv amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt.

Im letzten Schritt wurden nun die zueinander gehörenden TZR-Ketten über das P2A-Element miteinander verbunden und amplifiziert (siehe Tabelle 5.7.3). Wie bereits zuvor wurden zuerst die α - und β -Kette über die komplementären Überhänge (P2A-Sequenz) miteinander fusioniert. Anschließend wurde das β -Kette-P2A- α -Kette Konstrukt mit den Primern betaVariable_fw und alphaConstant_rv_EcoRI amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden wieder per Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Danach wurden die PCR-Produkte mit den Restrikti-

	Temperatur		Zeit	Zyklen
	β -Kette	α -Kette		
Denaturierung	98 °C		60''	} 5
Annealing	in 5 °C Schritten runter auf 40 °C		30'' pro 5 °C	
Extension	72 °C		60''	
Primer hinzufügen	+ betaVariable_fw + betaConstat_rev	+ alphaVariable_fw + alphaConstant_rv		
Denaturierung	98 °C		10''	} 30
Annealing	68 °C	65 °C	20''	
Extension	72 °C		20''	
Finale Extension	72 °C		10'	1
Pause	16 °C			

Tabelle 5.7.2: Fusions-PCR zur Generierung der optimierten TZR-Ketten.

	Temperatur		Zeit	Zyklen
	β -Kette	α -Kette		
Denaturierung	98 °C		60''	} 5
Annealing	in 5 °C Schritten runter auf 40 °C		30'' pro 5 °C	
Extension	72 °C		60''	
Primer hinzufügen	betaVariable_fw	alphaConstant_rv_EcoRI		
Denaturierung	98 °C		10''	} 30
Annealing	65 °C		20''	
Extension	72 °C		20''	
Finale Extension	72 °C		10'	1
Pause	16 °C			

Tabelle 5.7.3: Fusions-PCR zur Generierung der optimierten TZR-Konstrukte mit den über das P2A verbundene β und α -TZR-Ketten.

onsenzymen NotI und EcoRI verdaut und wie bereits in Kapitel 5.7.4 beschrieben in den retroviralen Vektor pMP71 kloniert. Per Kontrollverdau und Sequenzierung der Plasmide wurde die Klonierung überprüft.

5.7.6 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Es wurde zur Herstellung von Agarosegelen 1% Agarose in TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlung wurden 0,4 mg/l Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel gegossen. Bei Extraktion der Banden wurden die Gele so kurz wie möglich belichtet und die ausgeschnittenen Gelstücke nach Herstellerangaben mit Kits von Quiagen und Peqlab aufgereingt.

5.8 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) mit eigenen Primern (10 pmol/ μ l) durchgeführt. Die Konzentration der Plasmid-Templates war zwischen 30-100 ng/ μ l, die von PCR-Produkten zwischen 10-50 ng/ μ l. Zur Sequenzierung der DNA-Fragmente aus den PCRs zur Identifizierung der α - oder β -TZR-Ketten wurden sowohl die degenerierten Primer für den variablen Bereich als auch die Primer, die im konstanten Bereich banden, verwendet. Die gewonnenen Sequenzen der TZR-Ketten wurden mit dem Tool „IMGT/V-QUEST“ der Website imgt.org³, siehe auch Brochet et al., 2008 ausgewertet.

Die korrekte Klonierung der einzelnen Ketten in den retroviralen Vektor MP71 wurde mittels Sequenzierung mit den Primern PrimMP71for und PrimMP71rev überprüft, die *upstream* und *downstream* der Insertstelle im Vektor binden. Bei den optimierten TZR-Konstrukten wurden wegen der Größe des *Inserts* teils zusätzliche entsprechende Primer aus der Fusions-PCR benutzt.

5.9 Durchführung der Modellrechnung zur Schätzung der Anzahl behandelbarer Patienten

Mit dem Analysetool „*population coverage*“ von iedb.org lässt sich der prozentuale Anteil einer Bevölkerung kalkulieren, der auf eine HLA-restringierte T-Zell-Therapie unter Berücksichtigung der genotypischen HLA-Subtypen-Häufigkeit und der HLA-Restriktion ansprechen sollte (Bui et al., 2006) – die sogenannte *population coverage*.

Mit Hilfe des Tools wurde für unsere HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren berechnet, welcher Bevölkerungsanteil von verschiedenen Ländern bzw. Weltregionen HLA-A*02-Subtypen trägt, die von den HBV-spezifischen Rezeptoren erkannt werden. Zur Berechnung der *population coverage* der einzelnen T-Zell-Rezeptoren (siehe Abb. 2.6.8) wurde dabei in der Eingabemaske des Tools⁴ Folgendes eingegeben:

- Unter „*Select area(s) and/or population(s)*“ wurde die entsprechende Weltregion bzw. die entsprechenden Länder ausgewählt.
- Unter „*Select calculation option(s)*“ wurde „*Class I separate*“ ausgewählt.
- Unter „*MHC Restricted Allele(s)*“ wurden dann die HLA-A2-Subtypen eingetragen, die von dem T-Zell-Rezeptor in der LCL-Kokultur erkannt wurden (siehe Kapitel 2.6.4).

Die berechneten Werte (Wert zur „*population coverage*“ (PC-Wert) und die genotypische Frequenz der HLA-Subtypen-Häufigkeit pro Land bzw. Weltregion) wurden dann in eine Excel-Datei importiert und aufbereitet.

³www.imgt.org/IMGT_vquest/input

⁴zu finden unter tools.iedb.org/population/

Für die Modellrechnung zur Schätzung der Anzahl von CHB Patienten ($n^{CHB \text{ for } ACT}$) pro Land, die mit mindestens einem unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren theoretisch behandelt werden könnten, wurde folgende Formel verwendet.

$$n^{CHB \text{ for } ACT} = (n^{CHB(A)} + n^{CHB(D)}) * p^{A/D} + n^{CHB(B)} * p^B + n^{CHB(C)} * p^C + (n^{CHB(E)} + n^{CHB(F)}) * p^{E/F}$$

In der Modellrechnung wurde berücksichtigt, dass die HBV-infizierten Patienten mit unterschiedlichen HBV-Genotypen infiziert sein können, deren geographische Verteilung sehr unterschiedlich ist (Velkov et al., 2018) und deren Peptidsequenz für die Peptide C18, S20 und S172 zum Teil genotypische Variationen aufweisen (Desmond et al., 2008).

Wie im Folgenden genauer erläutert wurden die PC-Werte unserer HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren für die HBV-Genotypen A/D, B, C und E/F berechnet. Unsere in der LCL-Kokultur verwendeten Peptide C18 („FLPSDFFPV“), S20 („FLLTRILTI“) und S172 („WLSLLVPFV“) entsprechen den Peptidsequenzen der HBV-Genotypen A und D.

Es wurde daher für die HBV-Genotypen A und D pro Population der PC-Wert ($= p^{A/D}$) mit Angabe einer MHC-Restriktion für die HLA-A*02-Subtypen :01, :02, :03, :04, :05, :06, :07, :09, :10, :16, :17 berechnet (Eingabe unter „*MHC Restricted Allele(s)*“ wie oben beschrieben). Diese HLA-A*02-Subtypen wurden mindestens von einem der HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in der LCL-Kokultur erkannt, wenn sie die oben genannten HBV-Peptidsequenzen präsentierten. Beim HBV-Genotypen B liegt für das C18-Peptid ein relevanter Polymorphismus mit der Sequenz „FLPSDFFPV“ sowie eine genotypische Variation des S20-Peptids mit der Sequenz „FLLTKILTI“ vor (Desmond et al., 2008), die nach den anschließend an diese Arbeit durchgeführten Versuchen von Karin Wisskirchen nur auf den HLA-A02:01, :06 und :07 erkannt wurden (Wisskirchen et al., 2017). Das S172-Peptid ist identisch zu dem in unserer Kokultur verwendeten S172-Peptid („WLSLLVPFV“). Wir gingen daher bei der Berechnung des PC-Werts für den HBV-Genotypen B ($= p^B$) von einer HLA-Restriktion für die HLA-Subtypen :01, :02, :04, :05, :06, :07, :09, :17 aus. Beim HBV-Genotypen C liegt eine genotypische Variation für das C18-Peptid („FLPSDFFPV“) vor, das S20-Peptid und das S172-Peptid sind identisch zum in der LCL-Kokultur verwendeten Genotyp A/D. Zur PC-Wert Berechnung wurden daher bei der HLA-Restriktion die HLA-A*02-Subtypen :01, :02, :03, :04, :05, :06, :07, :09, :17 verwendet ($= p^C$). Auch die HBV-Genotypen E/F haben im S20-Peptid die Variante „FLLTKILTI“ vorliegen und der Genotyp F noch eine genotypische Variante im S172-Peptid (WLSLLVQFV). Das C18-Peptid ist von der Peptidsequenz identisch zu den HBV-Genotypen A/D. Daher wurden zur Berechnung der PC-Werte der Genotypen E/F die HLA-A*02-Subtypen :01, :02, :04, :05, :06, :07, :09, :10, :16, :17 verwendet ($= p^{E/F}$).

Die Daten zur Anzahl chron. HBV-Infizierter des entsprechenden HBV-Genotyps pro Land ($n^{CHB(A)}$, $n^{CHB(B)}$, $n^{CHB(C)}$, $n^{CHB(D)}$, $n^{CHB(E)}$, $n^{CHB(F)}$) wurde aus Velkov et al., 2018 übernommen.

5.10 Statistik

Die graphische Darstellung und statistische Analyse erfolgte zum Großteil mit GraphPad Prism von GraphPad Software sowie zum Teil mit Excel von Microsoft. In den Graphen wurde, wenn nicht anders gekennzeichnet, der Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Berechnung der EC₅₀-Werte wurde mit GraphPad Prism über das Rechenmodell „log(agonist) vs. response – Variable slope“ durchgeführt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizient zwischen der Streptamerbindung in CD4⁺ T-Zellen und den EC₅₀-Werten aus dem Chrom-Release mit den CD4⁺ T-Zellen wurde mit Excel durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- Ahn, S. H., Y. N. Park, J. Y. Park, H. Y. Chang, J. M. Lee, J. E. Shin, K. H. Han, C. Park, Y. M. Moon und C. Y. Chon (2005). „Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance“. In: *Journal of Hepatology* 42(2), S. 188–194. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.10.026.
- Allweiss, L., T. Volz, M. Lütgehetmann, K. Giersch, T. Bornscheuer, A. W. Lohse, J. Petersen, H. Ma, K. Klumpp, S. P. Fletcher und M. Dandri (März 2014). „Immune cell responses are not required to induce substantial hepatitis B virus antigen decline during pegylated interferon-alpha administration“. In: *Journal of Hepatology* 60(3), S. 500–507. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.10.021.
- Ando, K., L. G. Guidotti, S. Wirth, T. Ishikawa, G. Missale, T. Moriyama, R. D. Schreiber, H. J. Schlicht, S. N. Huang und F. V. Chisari (1994). „Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo.“ In: *Journal of Immunology* 152, S. 3245–53.
- Arcaro, A., C. Grégoire, T. R. Bakker, L. Baldi, M. Jordan, L. Goffin, N. Boucheron, F. Wurm, P. A. van der Merwe, B. Malissen und I. F. Luescher (Nov. 2001). „CD8 β endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56lck complexes“. In: *Journal of Experimental Medicine* 194(10), S. 1485–1495. DOI: 10.1084/jem.194.10.1485.
- Artyomov, M. N., M. Lis, S. Devadas, M. M. Davis und A. K. Chakraborty (2010). „CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(39), S. 16916–16921. DOI: 10.1073/pnas.1010568107.
- Arzberger, S., M. Hösel und U. Protzer (2010). „Apoptosis of hepatitis B virus-infected hepatocytes prevents release of infectious virus.“ In: *Journal of Virology* 84(22), S. 11994–12001. DOI: 10.1128/JVI.00653-10.
- Asabe, S., S. F. Wieland, P. K. Chattopadhyay, M. Roederer, R. E. Engle, R. H. Purcell und F. V. Chisari (2009). „The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection.“ In: *Journal of Virology* 83(19), S. 9652–9662. DOI: 10.1128/JVI.00867-09.
- Aubert, R. D., A. O. Kamphorst, S. Sarkar, V. Vezys, S.-J. Ha, D. L. Barber, L. Ye, A. H. Sharpe, G. J. Freeman und R. Ahmed (Dez. 2011). „Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(52), S. 21182–7. DOI: 10.1073/pnas.1118450109.
- Bailey, S. R. und M. V. Maus (2019). *Gene editing for immune cell therapies*. DOI: 10.1038/s41587-019-0137-8.

- Banu, N., A. Chia, Z. Z. Ho, A. T. Garcia, K. Paravasivam, G. M. Grotenbreg, A. Bertoletti und A. J. Gehring (Mai 2015). „Building and optimizing a virus-specific T cell receptor library for targeted immunotherapy in viral infections“. In: *Scientific Reports* 4(1), S. 4166. DOI: 10.1038/srep04166.
- Barker, L. F., J. E. Maynard, R. H. Purcell, J. H. Hoofnagle, K. R. Berquist, W. T. London, R. J. Gerety und D. H. Krushak (1975). „Hepatitis B virus infection in chimpanzees: titration of subtypes.“ In: *The Journal of infectious diseases* 132(4), S. 451–458.
- Bartenschlager, R. und H. Schaller (1992). „Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome.“ In: *The EMBO Journal* 11(9), S. 3413–3420. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05420.x.
- Bauer, T., M. Sprinzl und U. Protzer (Jan. 2011). „Immune control of hepatitis B virus“. In: *Digestive Diseases* 29(4), S. 423–433. DOI: 10.1159/000329809.
- Bendle, G. M., C. Linnemann, A. I. Hooijkaas, L. Bies, M. a. de Witte, A. Jorritsma, A. D. M. Kaiser, N. Pouw, R. Debets, E. Kieback, W. Uckert, J.-Y. Song, J. B. a. G. Haanen und T. N. M. Schumacher (Mai 2010). „Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy“. In: *Nature Medicine* 16(5), S. 565–570. DOI: 10.1038/nm.2128.
- Bénéchet, A. P., G. De Simone, P. Di Lucia, F. Cilenti, G. Barbiera, N. Le Bert, V. Fumagalli, E. Lusito, F. Moalli, V. Bianchessi, F. Andreato, P. Zordan, E. Bono, L. Giustini et al. (Okt. 2019). „Dynamics and genomic landscape of CD8⁺ T cells undergoing hepatic priming“. In: *Nature* 574(7777), S. 200–205. DOI: 10.1038/s41586-019-1620-6.
- Bentzen, A. K., A. M. Marquard, R. Lyngaa, S. K. Saini, S. Ramskov, M. Donia, L. Such, A. J. S. Furness, N. McGranahan, R. Rosenthal, P. T. Straten, Z. Szallasi, I. M. Svane, C. Swanton et al. (Okt. 2016). „Large-scale detection of antigen-specific T cells using peptide-MHC-I multimers labeled with DNA barcodes“. In: *Nature Biotechnology* 34(10), S. 1037–1045. DOI: 10.1038/nbt.3662.
- Bertoletti, A., F. V. Chisari, A. Penna, S. Guilhot, L. Galati, G. Missale, P. Fowler, H. J. Schlicht, A. Vitiello und R. C. Chesnut (Apr. 1993). „Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein.“ In: *Journal of Virology* 67(4), S. 2376–2380. DOI: 10.1128/JVI.67.4.2376-2380.1993.
- Bertoletti, A., A. Costanzo, F. V. Chisari, M. Levrero, M. Artini, A. Sette, A. Penna, T. Giuberti, F. Fiaccadori und C. Ferrari (Sep. 1994). „Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope.“ In: *Journal of Experimental Medicine* 180(3), S. 933–943. DOI: 10.1084/jem.180.3.933.
- Bertoletti, A., C. Ferrari, F. Fiaccadori, A. Penna, R. Margolskee, H. J. Schlicht, P. Fowler, S. Guilhot und F. V. Chisari (Dez. 1991). „HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(23), S. 10445–10449. DOI: 10.1073/pnas.88.23.10445.
- Bertoletti, A. und C. Ferrari (2013). „Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: Towards restoration of immune control of viral infection“. In: *Postgraduate Medical Journal* 89(1051), S. 294–304. DOI: 10.1136/postgradmedj-2011-301073rep.
- Bertoni, R., J. Sidney, P. Fowler, R. W. Chesnut, F. V. Chisari und A. Sette (Aug. 1997). „Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic

- T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis.“ In: *Journal of Clinical Investigation* 100(3), S. 503–513. DOI: 10.1172/JCI119559.
- Bessone, F. und M. Dirchwolf (2016). „Management of hepatitis B reactivation in immunosuppressed patients: An update on current recommendations“. In: *World Journal of Hepatology* 8(8), S. 385. DOI: 10.4254/wjh.v8.i8.385.
- Betts, M. R., D. a. Price, J. M. Brenchley, K. Loré, F. J. Guenaga, A. Smed-Sorensen, D. R. Ambrozak, S. a. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek und R. a. Koup (Mai 2004). „The functional profile of primary human antiviral CD8⁺ T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration“. In: *The Journal of Immunology* 172(10), S. 6407–6417. DOI: 10.4049/jimmunol.172.10.6407.
- Biermer, M., R. Puro und R. J. Schneider (Apr. 2003). „Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid integrity through activation of NF- κ B“. In: *Journal of Virology* 77(7), S. 4033–4042. DOI: 10.1128/JVI.77.7.4033-4042.2003.
- Block, T. M., R. Gish, H. Guo, A. Mehta, A. Cuconati, W. Thomas London und J.-T. Guo (Apr. 2013). „Chronic hepatitis B: What should be the goal for new therapies?“ In: *Antiviral Research* 98(1), S. 27–34. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.01.006.
- Blumberg, B. S., B. J. Gerstley, D. A. Hungerford, W. T. London und A. I. Sutnick (Mai 1967). „A serum antigen (Australia antigen) in Down’s syndrome, leukemia, and hepatitis.“ In: *Annals of Internal Medicine* 66(5), S. 924–31. DOI: 10.7326/0003-4819-66-5-924.
- Böcher, W. O., S. Herzog-Hauff, J. Schlaak, K.-H. Meyer zum Büschenfelde und H. F. Löhler (Jan. 1999). „Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or after HBs vaccination: Stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma“. In: *Hepatology* 29(1), S. 238–244. DOI: 10.1002/hep.510290120.
- Bock, C., S. Schwinn, S. Locarnini, J. Fyfe, M. P. Manns, C. Trautwein und H. Zentgraf (März 2001). „Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome“. In: *Journal of Molecular Biology* 307(1), S. 183–196. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4481.
- Bohne, F., M. Chmielewski, G. Ebert, K. Wiegmann, T. Kürschner, A. Schulze, S. Urban, M. Krönke, H. Abken und U. Protzer (Jan. 2008). „T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes“. In: *Gastroenterology* 134(1), S. 239–247. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.002.
- Boni, C., P. Fisicaro, C. Valdatta, B. Amadei, P. Di Vincenzo, T. Giuberti, D. Laccabue, A. Zerbini, A. Cavalli, G. Missale, A. Bertoletti und C. Ferrari (Apr. 2007). „Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection“. In: *Journal of Virology* 81(8), S. 4215–4225. DOI: 10.1128/JVI.02844-06.
- Bossi, G., A. B. Gerry, S. J. Paston, D. H. Sutton, N. J. Hassan und B. K. Jakobsen (Nov. 2013). „Examining the presentation of tumor-associated antigens on peptide-pulsed T2 cells“. In: *OncoImmunology* 2(11), e26840. DOI: 10.4161/onci.26840.
- Bowen, D. G., M. Zen, L. Holz, T. Davis, G. W. McCaughan und P. Bertolino (Sep. 2004). „The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity“. In: *Journal of Clinical Investigation* 114(5), S. 701–712. DOI: 10.1172/JCI200421593.

- Brochet, X., M.-P. Lefranc und V. Giudicelli (Mai 2008). „IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis“. In: *Nucleic Acids Research* 36, W503–W508. DOI: 10.1093/nar/gkn316.
- Bui, H. H., J. Sidney, K. Dinh, S. Southwood, M. J. Newman und A. Sette (2006). „Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines“. In: *BMC Bioinformatics* 7, S. 1–5. DOI: 10.1186/1471-2105-7-153.
- Busch, D. H. und E. G. Pamer (Feb. 1999). „T cell affinity maturation by selective expansion during infection“. In: *Journal of Experimental Medicine* 189(4), S. 701–710. DOI: 10.1084/jem.189.4.701.
- Buster, E. H. C. J., H. J. Flink, Y. Cakaloglu, K. Simon, J. Trojan, F. Tabak, T. M. K. So, S. V. Feinman, T. Mach, U. S. Akarca, M. Schutten, W. Tielemans, A. J. van Vuuren, B. E. Hansen und H. L. a. Janssen (2008). „Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon α -2b“. In: *Gastroenterology* 135(2), S. 459–467. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.05.031.
- Callender, G. G., H. R. Rosen, J. J. Roszkowski, G. E. Lyons, M. Li, T. Moore, N. Brasic, M. D. McKee und M. I. Nishimura (Mai 2006). „Identification of a hepatitis C virus-reactive T cell receptor that does not require CD8 for target cell recognition“. In: *Hepatology* 43(5), S. 973–981. DOI: 10.1002/hep.21157.
- Chen, M. T., J.-N. Billaud, M. Sallberg, L. G. Guidotti, F. V. Chisari, J. Jones, J. Hughes und D. R. Milich (Okt. 2004). „A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(41), S. 14913–14918. DOI: 10.1073/pnas.0406282101.
- Chisari, F., C. Pinkert, D. Milich, P. Filippi, A. McLachlan, R. Palmiter und R. Brinster (Dez. 1985). „A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state“. In: *Science* 230(4730), S. 1157–1160. DOI: 10.1126/science.3865369.
- Choi, E. M.-L., J.-L. Chen, L. Wooldridge, M. Salio, A. Lissina, N. Lissin, I. F. Hermans, J. D. Silk, F. Mirza, M. J. Palmowski, P. R. Dunbar, B. K. Jakobsen, A. K. Sewell und V. Cerundolo (Nov. 2003). „High avidity antigen-specific CTL identified by CD8-independent tetramer staining“. In: *The Journal of Immunology* 171(10), S. 5116–5123. DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.5116.
- Cohen, C. J., Y. F. Li, M. El-Gamil, P. F. Robbins, S. A. Rosenberg und R. A. Morgan (2007). „Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond“. In: *Cancer Research* 67(8), S. 3898–3903. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3986.
- Cohen, C. J., Y. Zhao, Z. Zheng, S. A. Rosenberg und R. A. Morgan (Sep. 2006). „Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability“. In: *Cancer Research* 66(17), S. 8878–8886. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1450.
- Cole, D. K., B. Laugel, M. Clement, D. a. Price, L. Wooldridge und A. K. Sewell (Okt. 2012). „The molecular determinants of CD8 co-receptor function“. In: *Immunology* 137(2), S. 139–148. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2012.03625.x.

- Cooper, A., G. Tal, O. Lider und Y. Shaul (Sep. 2005). „Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2“. In: *The Journal of Immunology* 175(5), S. 3165–3176. DOI: 10.4049/jimmunol.175.5.3165.
- Cornberg, M., U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer, T. Berg, W. Jilg, A. Erhardt, S. Wirth, C. Sarrazin, M. Dollinger, P. Schirmacher, K. Dathe, I. Kopp, S. Zeuzem et al. (Juli 2011). „Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion“. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 49(07), S. 871–930. DOI: 10.1055/s-0031-1273462.
- D’Ippolito, E., K. Schober, M. Nauerth und D. H. Busch (Okt. 2019). „T cell engineering for adoptive T cell therapy: safety and receptor avidity“. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 68(10), S. 1701–1712. DOI: 10.1007/s00262-019-02395-9.
- Dandri, M., T. Volz, M. Lütgehetmann und J. Petersen (Dez. 2005). „Animal models for the study of HBV replication and its variants“. In: *Journal of Clinical Virology* 34, S54–S62. DOI: 10.1016/S1386-6532(05)80011-3.
- Dandri, M., M. R. Burda, H. Will und J. Petersen (Juli 2000). „Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir In vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA“. In: *Hepatology* 32(1), S. 139–146. DOI: 10.1053/jhep.2000.8701.
- Dane, D. S., C. H. Cameron und M. Briggs (Apr. 1970). „Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis.“ In: *Lancet* 1(7649), S. 695–8. DOI: 10.1016/s0140-6736(70)90926-8.
- Das, A., M. Hoare, N. Davies, a. R. Lopes, C. Dunn, P. T. Kennedy, G. Alexander, H. Finney, A. Lawson, F. J. Plunkett, A. Bertolotti, A. N. Akbar und M. K. Maini (Sep. 2008). „Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Experimental Medicine* 205(9), S. 2111–2124. DOI: 10.1084/jem.20072076.
- Deeks, S. G., B. Wagner, P. a. Anton, R. T. Mitsuyasu, D. T. Scadden, C. Huang, C. Macken, D. D. Richman, C. Christopherson, C. H. June, R. Lazar, D. F. Broad, S. Jalali und K. M. Hege (2002). „A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy.“ In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 5(6), S. 788–797. DOI: 10.1006/mthe.2002.0611.
- Dembić, Z., W. Haas, R. Zamoyska, J. Parnes, M. Steinmetz und H. von Boehmer (Apr. 1987). „Transfection of the CD8 gene enhances T-cell recognition“. In: *Nature* 326(6112), S. 510–511. DOI: 10.1038/326510a0.
- Derby, M. A., M. A. Alexander-Miller, R. Tse und J. A. Berzofsky (Feb. 2001). „High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL“. In: *The Journal of Immunology* 166(3), S. 1690–1697. DOI: 10.4049/jimmunol.166.3.1690.
- Desmond, C. P., S. Gaudieri, I. R. James, K. Pfafferott, A. Chopra, G. K. Lau, J. Audsley, C. Day, S. Chivers, A. Gordon, P. A. Revill, S. Bowden, A. Ayres, P. V. Desmond et al. (2012). „Viral Adaptation to Host Immune Responses Occurs in Chronic Hepatitis B Virus (HBV) Infection, and Adaptation Is Greatest in HBV e Antigen-Negative Disease“. In: *Journal of Virology* 86(2), S. 1181–1192. DOI: 10.1128/jvi.05308-11.

- Desmond, C. P., A. Bartholomeusz, S. Gaudieri, P. A. Revill und S. R. Lewin (Jan. 2008). „A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics.“ In: *Antiviral therapy* 13(2), S. 161–75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18505168>.
- Dienstag, J. L. und H. H.-J. Schmidt (2009). „Akute virale Hepatitis“. In: *Harrisons Innere Medizin*. Hrsg. von M. Dietel, N. Suttorp und M. Zeitz. 17. Aufl. ABW Wissenschaftsverlag, S. 2385–2405.
- Dion, S., M. Bourguine, O. Godon, F. Levillayer und M.-L. Michel (Mai 2013). „Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules“. In: *Journal of Virology* 87(10), S. 5554–5563. DOI: 10.1128/jvi.03134-12.
- Dockree, T., C. J. Holland, M. Clement, K. Ladell, J. E. McLaren, H. A. Van Den Berg, E. Gostick, K. L. Miners, S. Llewellyn-Lacey, J. S. Bridgeman, S. Man, M. Bailey, S. R. Burrows, D. A. Price und L. Wooldridge (Jan. 2017). „CD8⁺ T-cell specificity is compromised at a defined MHC1/CD8 affinity threshold“. In: *Immunology and Cell Biology* 95(1), S. 68–76. DOI: 10.1038/icb.2016.85.
- Donnelly, M. L. L., G. Luke, A. Mehrotra, X. Li, L. E. Hughes, D. Gani und M. D. Ryan (Mai 2001). „Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein ‘cleavage’ mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal ‘skip’“. In: *Journal of General Virology* 82(5), S. 1013–1025. DOI: 10.1099/0022-1317-82-5-1013.
- Dudareva, S., K. Kremer, T. Harder und R. Zimmermann (2019). „Virushepatitis B und D im Jahr 2018“. In: *Epidemiologisches Bulletin* 2019 Nr. 29, S. 261–270. DOI: 10.25646/6203.1.
- Dunn, C., D. Peppas, P. Khanna, G. Nebbia, M. Jones, N. Brendish, R. M. Lascar, D. Brown, R. J. Gilson, R. J. Tedder, G. M. Dusheiko, M. Jacobs, P. Klenerman und M. K. Maini (2009). „Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection“. In: *Gastroenterology* 137(4), S. 1289–1300. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.054.
- Engels, B., H. Cam, T. Schüler, S. Indraccolo, M. Gladow, C. Baum, T. Blankenstein und W. Uckert (Aug. 2003). „Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes.“ In: *Human gene therapy* 14(12), S. 1155–68. DOI: 10.1089/104303403322167993.
- Ferrari, C., A. Penna, A. Bertolotti, A. Valli, a. D. Antoni, T. Giuberti, A. Cavalli, M. a. Petit und F. Fiaccadori (Nov. 1990). „Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection.“ In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145(10), S. 3442–9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2230128>.
- Fisicaro, P., V. Barili, B. Montanini, G. Acerbi, M. Ferracin, F. Guerrieri, D. Salerno, C. Boni, M. Massari, M. C. Cavallo, G. Grossi, T. Giuberti, P. Lampertico, G. Missale et al. (2017). „Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B“. In: *Nature Medicine* 23(3), S. 327–336. DOI: 10.1038/nm.4275.
- Fisicaro, P., C. Valdatta, M. Massari, E. Loggi, E. Biasini, L. Sacchelli, M. C. Cavallo, E. M. Silini, P. Andreone, G. Missale und C. Ferrari (2010). „Antiviral intrahepatic T-Cell responses can be restored by blocking Programmed Death-1 pathway in chronic hepatitis B“. In: *Gastroenterology* 138(2), 682–693.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.09.052.

- Franchis, R. de (Feb. 1993). „The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers“. In: *Annals of Internal Medicine* 118(3), S. 191. DOI: 10.7326/0003-4819-118-3-199302010-00006.
- Ganem, D. und A. M. Prince (März 2004). „Hepatitis B virus infection — natural history and clinical consequences“. In: *New England Journal of Medicine* 350(11), S. 1118–1129. DOI: 10.1056/NEJMra031087.
- Gao, B., Z. Duan, W. Xu und S. Xiong (2009). „Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain“. In: *Hepatology* 50(2), S. 424–433. DOI: 10.1002/hep.23011.
- Gaudieri, S., A. Rauch, L. P. Park, E. Freitas, S. Herrmann, G. Jeffrey, W. Cheng, K. Pfafferoth, K. Naidoo, R. Chapman, M. Battagay, R. Weber, A. Telenti, H. Furrer et al. (2006). „Evidence of viral adaptation to HLA Class I-restricted immune pressure in chronic hepatitis C virus infection“. In: *Journal of Virology* 80(22), S. 11094–11104. DOI: 10.1128/jvi.00912-06.
- Gehring, A. J., S. Koh, A. Chia, K. Paramasivam, V. S. P. Chew, Z. Z. Ho, K. H. Lee, M. K. Maini, K. Madhavan, S. G. Lim und A. Bertoletti (Jan. 2011a). „Licensing virus-specific T cells to secrete the neutrophil attracting chemokine CXCL-8 during hepatitis B virus infection.“ In: *PloS one* 6(8), e23330. DOI: 10.1371/journal.pone.0023330.
- Gehring, A. J., D. Sun, P. T. F. Kennedy, E. Nolte-’t Hoen, S. G. Lim, S. Wasser, C. Selden, M. K. Maini, D. M. Davis, M. Nassal und A. Bertoletti (2007). „The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function“. In: *Journal of Virology* 81(6), S. 2940–2949. DOI: 10.1128/jvi.02415-06.
- Gehring, A. J., S.-A. Xue, Z. Z. Ho, D. Teoh, C. Ruedl, A. Chia, S. Koh, S. G. Lim, M. K. Maini, H. Stauss und A. Bertoletti (Juli 2011b). „Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines“. In: *Journal of Hepatology* 55(1), S. 103–110. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.025.
- Gill, U. S., L. J. Pallett, N. Thomas, A. R. Burton, A. A. Patel, S. Yona, P. T. Kennedy und M. K. Maini (2019). „Fine needle aspirates comprehensively sample intrahepatic immunity“. In: *Gut*. DOI: 10.1136/gut.jnl-2018-317071.
- Giudicelli, V., P. Duroux, C. Ginestoux, G. Folch, J. Jabado-Michaloud, D. Chaume und M.-P. Lefranc (Jan. 2006). „IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences.“ In: *Nucleic acids research* 34, S. D781–4. DOI: 10.1093/nar/gkj088.
- Graber-Stiehl, I. (Dez. 2018). „The silent epidemic killing more people than HIV, malaria or TB“. In: *Nature* 564(7734), S. 24–26. DOI: 10.1038/d41586-018-07592-7.
- Gripon, P., C. Diot und C. Guguen-Guillouzo (1993). „Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration.“ In: *Virology* 192, S. 534–540. DOI: 10.1006/viro.1993.1069.
- Gripon, P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo und C. Guguen-Guillouzo (Nov. 2002). „Nonlinear partial differential equations and applications: Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(24), S. 15655–15660. DOI: 10.1073/pnas.232137699.

- Gross, G., T. Waks und Z. Eshhar (1989). „Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(24), S. 10024–10028. DOI: 10.1073/pnas.86.24.10024.
- Guidotti, L. G., B. Matzke, H. Schaller und F. V. Chisari (Okt. 1995). „High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice.“ In: *Journal of Virology* 69(10), S. 6158–69. DOI: 10.1128/JVI.69.10.6158-6169.1995.
- Guidotti, L. G., T. Ishikawa, M. V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber und F. V. Chisari (Jan. 1996). „Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes.“ In: *Immunity* 4(1), S. 25–36. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80295-2.
- Han, Q., N. Bagheri, E. M. Bradshaw, D. A. Hafler, D. A. Lauffenburger und J. C. Love (2012). *Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines*. DOI: 10.1073/pnas.1117194109.
- Harari, A., V. Dutoit, C. Celleraï, P.-A. Bart, R. A. Du Pasquier und G. Pantaleo (2006). „Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections.“ In: *Immunological reviews* 211(1), S. 236–254. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00395.x.
- Heermann, K. H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten und W. H. Gerlich (Nov. 1984). „Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence.“ In: *Journal of Virology* 52(2), S. 396–402. DOI: 10.1128/JVI.52.2.396-402.1984.
- Höhn, H., C. Neukirch, K. Freitag, A. Necker, W. Hitzler, B. Seliger und M. J. Maeurer (Aug. 2002). „Longitudinal analysis of the T-cell receptor (TCR)-VA and -VB repertoire in CD8⁺ T cells from individuals immunized with recombinant hepatitis B surface antigen.“ In: *Clinical & Experimental Immunology* 129(2), S. 309–317. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.01841.x.
- Hombrink, P., Y. Raz, M. G. D. Kester, R. De Boer, B. Weißbrich, P. a. Von dem Borne, D. H. Busch, T. N. M. Schumacher, J. H. F. Falkenburg und M. H. M. Heemskerk (2013). „Mixed functional characteristics correlating with TCR-ligand koff-rate of MHC-tetramer reactive T cells within the naive T-cell repertoire.“ In: *European Journal of Immunology* 43(11), S. 3038–3050. DOI: 10.1002/eji.201343397.
- Hoofnagle, J. H. (1990). „alpha-Interferon therapy of chronic hepatitis B. Current status and recommendations.“ In: *Journal of Hepatology* 11(SUPPL. 1), S100–7. DOI: 10.1016/0168-8278(90)90173-0.
- Hoogeveen, R. C., M. P. Robidoux, T. Schwarz, L. Heydmann, J. A. Cheney, D. Kvistad, J. Aneja, J. G. Melgaço, C. A. Fernandes, R. T. Chung, A. Boonstra, A. Y. Kim, T. F. Baumert, J. Timm et al. (Mai 2019). „Phenotype and function of HBV-specific T cells is determined by the targeted epitope in addition to the stage of infection.“ In: *Gut* 68(5), S. 893–904. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316644.
- Hosken, N. A. und M. J. Bevan (1990). „Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules.“ In: *Science* 248(4953), S. 367–370. DOI: 10.1126/science.2326647.
- Huang, L.-R., Y. A. Gäbel, S. Graf, S. Arzberger, C. Kurts, M. Heikenwalder, P. A. Knolle und U. Protzer (Juni 2012). „Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to

- persistent infection in immune competent mice“. In: *Gastroenterology* 142(7), 1447–1450.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.03.006.
- Huang, Y. H., H. H. Hung, C. C. Chan, C. R. Lai, C. J. Chu, T. I. Huo, P. C. Lee, C. W. Su, K. H. Lan, H. C. Huang, I. C. Lee, H. C. Lin und S. D. Lee (2010). „Core antigen expression is associated with hepatic necroinflammation in e antigen-negative chronic hepatitis B patients with low DNA loads“. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 17(6), S. 1048–1053. DOI: 10.1128/CVI.00460-09.
- Hui, C.-K., A. Lie, W.-Y. Au, Y.-H. Leung, S.-Y. Ma, W. W. W. Cheung, H.-Y. Zhang, C.-S. Chim, Y.-L. Kwong, R. Liang und G. K. K. Lau (2005). „A long-term follow-up study on hepatitis B surface antigen-positive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.“ In: *Blood* 106, S. 464–469. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0698.
- Hunder, N. N., H. Wallen, J. Cao, D. W. Hendricks, J. Z. Reilly, R. Rodmyre, A. Jungbluth, S. Gnjatic, J. a. Thompson und C. Yee (2008). „Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4⁺ T cells against NY-ESO-1.“ In: *The New England journal of medicine* 358(25), S. 2698–2703. DOI: 10.1056/NEJMoa0800251.Treatment.
- IEDB (2020). *Epitop Analysis Tool: Population coverage*. URL: <http://tools.iedb.org/population/> (besucht am 07.07.2020).
- Ilan, Y., A. Nagler, E. Zeira, R. Adler, S. Slavin und D. Shouval (2000). „Maintenance of immune memory to the hepatitis B envelope protein following adoptive transfer of immunity in bone marrow transplant recipients.“ In: *Bone marrow transplantation* 26(6), S. 633–638. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702571.
- Ilan, Y., A. Nagler, R. Adler, E. Naparstek, R. Or, S. Slavin, C. Brautba und D. Shouva (Aug. 1993). „Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation“. In: *Hepatology* 18(2), S. 246–252. DOI: 10.1002/hep.1840180204.
- Inuzuka, T., K. Takahashi, T. Chiba und H. Marusawa (Jan. 2014). „Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host-virus immunologic interactions.“ In: *Pathogens (Basel, Switzerland)* 3(2), S. 377–89. DOI: 10.3390/pathogens3020377.
- Isogawa, M., M. Robek, Y. Furuichi und F. Chisari (2005). „Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo“. In: *Journal of virology* 79(11), S. 7269. DOI: 10.1128/JVI.79.11.7269.
- Janssen, H. L. a., M. Van Zonneveld, H. Senturk, S. Zeuzem, U. S. Akarca, Y. Cakaloglu, C. Simon, T. M. K. So, G. Gerken, R. a. De Man, H. G. M. Niesters, P. Zondervan, B. Hansen und S. W. Schalm (2005). „Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomised trial“. In: *Lancet* 365(9454), S. 123–129. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17701-0.
- Johnson, L. a., R. a. Morgan, M. E. Dudley, L. Cassard, J. C. Yang, M. S. Hughes, U. S. Kammula, R. E. Royal, R. M. Sherry, J. R. Wunderlich, C. C. R. Lee, N. P. Restifo, S. L. Schwarz, A. P. Cogdill et al. (2009). „Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen“. In: *Blood* 114(3), S. 535–546. DOI: 10.1182/blood-2009-03-211714.
- Kah, J., S. Koh, T. Volz, E. Ceccarello, L. Allweiss, M. Lütgehetmann, A. Bertoletti und M. Dandri (Juli 2017). „Lymphocytes transiently expressing virus-specific T cell receptors reduce

- hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Clinical Investigation* 127(8), S. 3177–3188. DOI: 10.1172/JCI93024.
- Kahn, M., H. Sugawara, P. McGowan, K. Okuno, S. Nagoya, K. E. Hellström, I. Hellström und P. Greenberg (Mai 1991). „CD4⁺ T cell clones specific for the human p97 melanoma-associated antigen can eradicate pulmonary metastases from a murine tumor expressing the p97 antigen.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 146(9), S. 3235–41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707934>.
- Kamphorst, A. O. und R. Ahmed (2013). „CD4 T-cell immunotherapy for chronic viral infections and cancer.“ In: *Immunotherapy* 5(9), S. 975–87. DOI: 10.2217/imt.13.91.
- Kann, M. und W. H. Gerlich (2005). „Hepatitis B“. In: *Topley & Wilson's microbiology & microbial infections: Virology*. Hrsg. von B. W. Mahy und V. ter Meulen. 10th. Kap. ´.
- Karttunen, J., S. Sanderson und N. Shastri (1992). „Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(13), S. 6020–6024. DOI: 10.1073/pnas.89.13.6020.
- Kefalakes, H., B. Budeus, A. Walker, C. Jochum, G. Hilgard, A. Heinold, F. M. Heinemann, G. Gerken, D. Hoffmann und J. Timm (2015). „Adaptation of the hepatitis B virus core protein to CD8⁺ T-cell selection pressure“. In: *Hepatology* 62(1), S. 47–56. DOI: 10.1002/hep.27771.
- Khakpoor, A., Y. Ni, A. Chen, Z. Z. Ho, V. Oei, N. Yang, R. Giri, J. X. Chow, A. T. Tan, P. T. Kennedy, M. Maini, S. Urban und A. Bertoletti (2018). „Spatiotemporal differences in presentation of CD8 T cell epitopes during hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Virology* 93(4), S. 1–18. DOI: 10.1128/jvi.01457-18.
- Kitazono, T., T. Okazaki, N. Araya, Y. Yamano, Y. Yamada, T. Nakamura, Y. Tanaka, M. Inoue und S. Ozaki (2011). „Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1 infected cells and tumors“. In: *Cellular Immunology* 272(1), S. 11–17. DOI: 10.1016/j.cellimm.2011.10.002.
- Kløverpris, H. N., A. Leslie und P. Goulder (Jan. 2016). „Role of HLA adaptation in HIV evolution“. In: *Frontiers in Immunology* 6, S. 1. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00665.
- Ko, C., A. Chakraborty, W.-M. Chou, J. Hasreiter, J. M. Wettengel, D. Stadler, R. Bester, T. Asen, K. Zhang, K. Wisskirchen, J. A. McKeating, W.-S. Ryu und U. Protzer (Dez. 2018). „Hepatitis B virus genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels“. In: *Journal of Hepatology* 69(6), S. 1231–1241. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.08.012.
- Ko, C., T. Michler und U. Protzer (2017). „Novel viral and host targets to cure hepatitis B“. In: *Current Opinion in Virology* 24(Figure 1), S. 38–45. DOI: 10.1016/j.coviro.2017.03.019.
- Koenig, S., A. J. Conley, Y. A. Brewah, G. M. Jones, S. Leath, L. J. Boots, V. Davey, G. Pantaleo, J. F. Demarest, C. Carter, C. Wannebo, J. R. Yannelli, S. A. Rosenberg und H. C. Lane (Apr. 1995). „Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression“. In: *Nature Medicine* 1(4), S. 330–336. DOI: 10.1038/nm0495-330.
- Koh, S., J. Kah, C. Y. Tham, N. Yang, E. Ceccarello, A. Chia, M. Chen, A. Khakpoor, A. Pavesi, A. T. Tan, M. Dandri und A. Bertoletti (2018). „Nonlytic lymphocytes engineered to express

- virus-specific T-cell receptors limit HBV infection by activating APOBEC3“. In: *Gastroenterology* 155(1), 180–193.e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.03.027.
- Koh, S., N. Shimasaki, R. Suwanarusk, Z. Z. Ho, A. Chia, N. Banu, S. W. Howland, A. S. M. Ong, A. J. Gehring, H. Stauss, L. Renia, M. Sällberg, D. Campana und A. Bertoletti (2013). „A practical approach to immunotherapy of hepatocellular carcinoma using T cells redirected against hepatitis B virus“. In: *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2(AUG), e114. DOI: 10.1038/mtna.2013.43.
- Krebs, K., N. Böttinger, L.-R. Huang, M. Chmielewski, S. Arzberger, G. Gasteiger, C. Jäger, E. Schmitt, F. Bohne, M. Aichler, W. Uckert, H. Abken, M. Heikenwalder, P. Knolle und U. Protzer (2013). „T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice.“ In: *Gastroenterology* 145(2), S. 456–65. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.047.
- Krebs, K. M. (2011). „Adoptive T-Zelltherapie der chronischen Hepatitis B“. Dissertation. Technische Universität München.
- Krogsgaard, M., N. Prado, E. J. Adams, X. L. He, D. C. Chow, D. B. Wilson, K. C. Garcia und M. M. Davis (2003). „Evidence that structural rearrangements and/or flexibility during TCR binding can contribute to T cell activation“. In: *Molecular Cell* 12(6), S. 1367–1378. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00474-X.
- Krugman, S., J. P. Giles und J. Hammond (Mai 1967). „Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection“. In: *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 200(5), S. 365–373. DOI: 10.1001/jama.200.5.365.
- Kurktschiev, P. D., B. Raziorrouh, W. Schraut, M. Backmund, M. Wächtler, C.-M. Wendtner, B. Bengsch, R. Thimme, G. Denk, R. Zachoval, A. Dick, M. Spannagl, J. Haas, H. M. Diepolder et al. (Sep. 2014). „Dysfunctional CD8⁺ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction“. In: *Journal of Experimental Medicine* 211(10), S. 2047–2059. DOI: 10.1084/jem.20131333.
- Lamontagne, R. J., S. Bagga und M. J. Bouchard (2016). „Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis“. In: *Hepatoma Research* 2(7), S. 163. DOI: 10.20517/2394-5079.2016.05.
- Lampertico, P., K. Agarwal, T. Berg, M. Buti, H. L. Janssen, G. Papatheodoridis, F. Zoulim und F. Tacke (Aug. 2017). „EASL 2017 Clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Hepatology* 67(2), S. 370–398. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.021.
- Lau, G. K., R. Liang, C. K. Lee, S. T. Yuen, J. Hou, W. L. Lim und R. Williams (Dez. 1998). „Clearance of persistent hepatitis B virus infection in Chinese bone marrow transplant recipients whose donors were anti-hepatitis B core- and anti-hepatitis B surface antibody-positive.“ In: *The Journal of Infectious Diseases* 178(6), S. 1585–91. DOI: 10.1086/314497.
- Lau, G. K. K., A. S. F. Lok, R. H. S. Liang, C. L. Lai, E. K. W. Chiu, L. Y. Lau und S. K. Lam (1997). „Clearance of hepatitis B surface antigen after bone marrow transplantation: Role of adoptive immunity transfer“. In: *Hepatology* 25(6), S. 1497–1501. DOI: 10.1002/hep.510250631.
- Lau, G. K. K., D. Suri, R. Liang, E. I. Rigopoulou, M. G. Thomas, I. Mullerova, A. Nanji, S.-T. Yuen, R. Williams und N. V. Naoumov (2002). „Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen.“ In: *Gastroenterology* 122(3), S. 614–624. DOI: 10.1053/gast.2002.31887.

- Laugel, B., H. A. Van Den Berg, E. Gostick, D. K. Cole, L. Wooldridge, J. Boulter, A. Milicic, D. A. Price und A. K. Sewell (2007). „Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties“. In: *Journal of Biological Chemistry* 282(33), S. 23799–23810. DOI: 10.1074/jbc.M700976200.
- Lauret, E., M. L. González-Diéguez, M. Rodríguez, M. González, S. Melón, L. Rodrigo und M. Rodríguez (Jan. 2015). „Long-term outcome in caucasian patients with chronic hepatitis B virus infection after HBsAg seroclearance“. In: *Liver International* 35(1), S. 140–147. DOI: 10.1111/liv.12461.
- Lee, H. G., J. S. Lim, K. Y. Lee, Y. K. Choi, I. S. Choe, T. W. Chung und K. Kim (1997). „Peptide-specific CTL induction in HBV-seropositive PBMC by stimulation with peptides in vitro: Novel epitopes identified from chronic carriers“. In: *Virus Research* 50(2), S. 185–194. DOI: 10.1016/S0168-1702(97)00068-3.
- Lehner, P. J., E. C. Wang, P. A. Moss, S. Williams, K. Platt, S. M. Friedman, J. I. Bell und L. K. Borysiewicz (Jan. 1995). „Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment.“ In: *Journal of Experimental Medicine* 181(1), S. 79–91. DOI: 10.1084/jem.181.1.79.
- Leisegang, M., B. Engels, P. Meyerhuber, E. Kieback, D. Sommermeyer, S.-A. Xue, S. Reuß, H. Stauss und W. Uckert (Mai 2008). „Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette“. In: *Journal of Molecular Medicine* 86(5), S. 573–583. DOI: 10.1007/s00109-008-0317-3.
- Li, M., R. Sun, L. Xu, W. Yin, Y. Chen, X. Zheng, Z. Lian, H. Wei und Z. Tian (2015). „Kupffer cells support hepatitis B virus-mediated CD8⁺ T cell exhaustion via hepatitis B core antigen-TLR2 interactions in mice“. In: *The Journal of Immunology* 195(7), S. 3100–3109. DOI: 10.4049/jimmunol.1500839.
- Liaw, Y.-F., N. W. Leung, T.-T. Chang, R. Guan, D.-I. Tai, K.-Y. Ng, R.-N. Chien, J. Dent, L. Roman, S. Edmundson und C.-L. Lai (Juli 2000). „Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B“. In: *Gastroenterology* 119(1), S. 172–180. DOI: 10.1053/gast.2000.8559.
- Lichterfeld, M., D. E. Kaufmann, X. G. Yu, S. K. Mui, M. M. Addo, M. N. Johnston, D. Cohen, G. K. Robbins, E. Pae, G. Alter, A. Wurcel, D. Stone, E. S. Rosenberg, B. D. Walker und M. Altfeld (Sep. 2004). „Loss of HIV-1-specific CD8⁺ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4⁺ T cells“. In: *Journal of Experimental Medicine* 200(6), S. 701–712. DOI: 10.1084/jem.20041270.
- Lim, A., L. Trautmann, M.-A. Peyrat, C. Couedel, F. Davodeau, F. Romagné, P. Kourilsky und M. Bonneville (2000). „Frequent contribution of T cell clonotypes with public TCR features to the chronic response against a dominant EBV-derived epitope: Application to direct detection of their molecular imprint on the human peripheral T cell repertoire“. In: *The Journal of Immunology* 165(4), S. 2001–2011. DOI: 10.4049/jimmunol.165.4.2001.
- Limmer, A., J. Ohl, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold und P. a. Knolle (2000). „Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to

- CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance.“ In: *Nature medicine* 6(12), S. 1348–1354. DOI: 10.1038/82161.
- Linette, G. P., E. A. Stadtmauer, M. V. Maus, A. P. Rapoport, B. L. Levine, L. Emery, L. Litzky, A. Bagg, B. M. Carreno, P. J. Cimino, G. K. Binder-Scholl, D. P. Smethurst, A. B. Gerry, N. J. Pumphrey et al. (2013). „Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma“. In: *Blood*. DOI: 10.1182/blood-2013-03-490565.
- Liu, F., M. Campagna, Y. Qi, X. Zhao, F. Guo, C. Xu, S. Li, W. Li, T. M. Block, J. Chang und J.-T. Guo (Sep. 2013). „Alpha-Interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes“. In: *PLoS Pathogens* 9(9). Hrsg. von A. Siddiqui, e1003613. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003613.
- Liu, J., K. Y. Chen und E. C. Ren (2011). „Structural insights into the binding of hepatitis B virus core peptide to HLA-A2 alleles: Towards designing better vaccines“. In: *European Journal of Immunology* 41(7), S. 2097–2106. DOI: 10.1002/eji.201041370.
- Locke, F. L., A. Ghobadi, C. A. Jacobson, D. B. Miklos, L. J. Lekakis, O. O. Oluwole, Y. Lin, I. Braunschweig, B. T. Hill, J. M. Timmerman, A. Deol, P. M. Reagan, P. Stiff, I. W. Flinn et al. (Jan. 2019). „Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial“. In: *The Lancet Oncology* 20(1), S. 31–42. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7.
- Loenen, M. M. van, R. de Boer, A. L. Amir, R. S. Hagedoorn, G. L. Volbeda, R. Willemze, J. J. van Rood, J. H. F. Falkenburg und M. H. M. Heemskerk (2010). „Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(24), S. 10972–10977. DOI: 10.1073/pnas.1005802107.
- Loirat, D., M. Mancini-Bourguine, J.-P. Abastado und M.-L. Michel (Okt. 2003). „HBsAg/HLA-A2 transgenic mice: a model for T cell tolerance to hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B virus infection.“ In: *International Immunology* 15(10), S. 1125–36. DOI: 10.1093/intimm/dxg117.
- Lopes, A. R., P. Kellam, A. Das, C. Dunn, A. Kwan, J. Turner, D. Peppas, R. J. Gilson, A. Gehring, A. Bertoletti und M. K. Maini (Mai 2008). „Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8⁺ T cells in patients unable to control HBV infection“. In: *Journal of Clinical Investigation* 118(5), S. 1835–1845. DOI: 10.1172/JCI33402.
- Lucifora, J., S. Arzberger, D. Durantel, L. Belloni, M. Strubin, M. Levrero, F. Zoulim, O. Hantz und U. Protzer (Nov. 2011). „Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection“. In: *Journal of Hepatology* 55(5), S. 996–1003. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.015.
- Lucifora, J., Y. Xia, F. Reisinger, K. Zhang, D. Stadler, X. Cheng, M. F. Sprinzl, H. Koppensteiner, Z. Makowska, T. Volz, C. Remouchamps, W.-M. Chou, W. E. Thasler, N. Huser et al. (März 2014). „Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA“. In: *Science* 343(6176), S. 1221–1228. DOI: 10.1126/science.1243462.
- Lumley, S. F., A. L. McNaughton, P. Klenerman, K. A. Lythgoe und P. C. Matthews (Juli 2018). „Hepatitis B virus adaptation to the CD8⁺ T cell response: Consequences for host and pathogen“. In: *Frontiers in Immunology* 9(JUL), S. 1–14. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01561.

- Maini, M. K., C. Boni, G. S. Ogg, a. S. King, S. Reignat, C. K. Lee, J. R. Larrubia, G. J. Webster, a. J. McMichael, C. Ferrari, R. Williams, D. Vergani und A. Bertolotti (1999). „Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8⁺ T cells associated with the control of infection.“ In: *Gastroenterology* 117(6), S. 1386–1396. DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70289-1.
- Maini, M. K. und A. J. Gehring (Apr. 2016). „The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection“. In: *Journal of Hepatology* 64(1), S. 60–70. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.01.028.
- Maini, M. K., C. Boni, C. K. Lee, J. R. Larrubia, S. Reignat, G. S. Ogg, A. S. King, J. Herberg, R. Gilson, A. Alisa, R. Williams, D. Vergani, N. V. Naoumov, C. Ferrari und A. Bertolotti (Apr. 2000). „The role of virus-specific CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Experimental Medicine* 191(8), S. 1269–1280. DOI: 10.1084/jem.191.8.1269.
- Malissen, M., J. Trucy, F. Letourneur, N. Rebai, D. E. Dunn, F. W. Fitch, L. Hood und B. Malissen (Okt. 1988). „A T cell clone expresses two T cell receptor α genes but uses one $\alpha\beta$ heterodimer for allorecognition and self MHC-restricted antigen recognition“. In: *Cell* 55(1), S. 49–59. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90008-6.
- Mao, R., J. Zhang, D. Jiang, D. Cai, J. M. Levy, A. Cuconati, T. M. Block, J.-T. Guo und H. Guo (2011). „Indoleamine 2,3-Dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells“. In: *Journal of Virology* 85(2), S. 1048–1057. DOI: 10.1128/jvi.01998-10.
- Mason, W. S., G. Seal und J. Summers (Dez. 1980). „Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.“ In: *Journal of Virology* 36(3), S. 829–836. DOI: 10.1128/JVI.36.3.829-836.1980.
- Mason, W., C. Burrell, J. Casey, W. Gerlich, C. Howard, M. Kann, J. Newbold, S. Schaefer, J. Taylor und H. Will (2005). „Hepadnaviridae“. In: *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Hrsg. von C. Fauquet, M. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger und L. Ball. Amsterdam: Elsevier. Kap. Hepadnavir, S. 1162.
- Maude, S. L., T. W. Laetsch, J. Buechner, S. Rives, M. Boyer, H. Bittencourt, P. Bader, M. R. Verneris, H. E. Stefanski, G. D. Myers, M. Qayed, B. De Moerloose, H. Hiramatsu, K. Schlis et al. (Feb. 2018). „Tisagenlecleucel in children and young adults with B-Cell lymphoblastic leukemia“. In: *New England Journal of Medicine* 378(5), S. 439–448. DOI: 10.1056/NEJMoa1709866.
- McClary, H., R. Koch, F. V. Chisari und L. G. Guidotti (2000). „Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines.“ In: *Journal of Virology* 74(5), S. 2255–2264. DOI: 10.1128/JVI.74.5.2255-2264.2000.
- McMahon, B. J. (Mai 2009). „The natural history of chronic hepatitis B virus infection“. In: *Hepatology* 49(5), S. 45–55. DOI: 10.1002/hep.22898.
- Merican, I., R. Guan, D. Amarapuka, M. Alexander, A. Chutaputti, R. Chien, S. Hasnian, N. Leung, L. Lesmana, P. Phiet, H. Sjalfoellah Noer, J. Sollano, H. Sun und D. Xu (2000). „Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries“. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15(12), S. 1356–1361. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2000.0150121356.x.

- Michler, T., A. D. Kosinska, J. Festag, T. Bunse, J. Su, M. Ringelhan, H. Imhof, D. Grimm, K. Steiger, C. Mogler, M. Heikenwalder, M.-L. Michel, C. A. Guzman, S. Milstein et al. (Mai 2020). „Knockdown of virus antigen expression increases therapeutic vaccine efficacy in high-titer hepatitis B virus carrier mice“. In: *Gastroenterology* 158(6), S. 1762–1775. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.01.032.
- Milich, D. R., F. Schödel, J. L. Hughes, J. E. Jones und D. L. Peterson (1997). „The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype.“ In: *Journal of Virology* 71(3), S. 2192–2201. DOI: 10.1128/JVI.71.3.2192-2201.1997.
- Modrow, S., D. Falke, U. Truyen und H. Schätzl (2010). „19.1 Hepadnaviren“. In: *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, S. 461–483.
- Moraleda, G., J. Saputelli, C. E. Aldrich, D. Averett, L. Condreay und W. S. Mason (1997). „Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus.“ In: *Journal of Virology* 71(12), S. 9392–9399.
- Morgan, R. A., M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, M. S. Hughes, J. C. Yang, R. M. Sherry, R. E. Royal, S. L. Topalian, U. S. Kammula, N. P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C. R. de Vries, L. J. Rogers-Freezer et al. (Okt. 2006). „Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes“. In: *Science* 314(5796), S. 126–129. DOI: 10.1126/science.1129003.
- Morita, S., T. Kojima und T. Kitamura (Juni 2000). „Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses“. In: *Gene Therapy* 7(12), S. 1063–1066. DOI: 10.1038/sj.gt.3301206.
- Muranski, P. und N. P. Restifo (Apr. 2009). „Adoptive immunotherapy of cancer using CD4⁺ T cells“. In: *Current Opinion in Immunology* 21(2), S. 200–208. DOI: 10.1016/j.coi.2009.02.004.
- Murphy, K., P. Travers und M. Walport (2005). *Janeways Immunobiology*. 6. Garland Science Publishin, Taylor und Francis Group, LLC.
- Murphy, K., P. Travers und M. Walport (2009). *Janeway Immunologie*. 7. Spektrum Akademischer Verlag.
- Naoumov, N. V., B. C. Portmann, R. S. Tedder, B. Ferns, A. L. Eddleston, G. J. Alexander und R. Williams (Okt. 1990). „Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection“. In: *Gastroenterology* 99(4), S. 1248–1253. DOI: 10.1016/0016-5085(90)90811-E.
- Nauerth, M., B. Weissbrich, R. Knall, T. Franz, G. Dossinger, J. Bet, P. J. Paszkiewicz, L. Pfeifer, M. Bunse, W. Uckert, R. Holtappels, D. Gillert-Marien, M. Neuenhahn, A. Krackhardt et al. (Juli 2013). „TCR-Ligand koff rate correlates with the protective capacity of antigen-specific CD8⁺ T cells for adoptive transfer“. In: *Science Translational Medicine* 5(192ra87), S. 1–10. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005958. eprint: NIHMS150003.
- Nayersina, R., P. Fowler, S. Guilhot, G. Missale, A. Cerny, H. J. Schlicht, A. Vitiello, R. Chesnut, J. L. Person, a. G. Redeker und F. V. Chisari (Mai 1993). „HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150(10), S. 4659–71. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683326>.

- Ohta, A., M. Sekimoto, M. Sato, T. Koda, S.-i. Nishimura, Y. Iwakura, K. Sekikawa und T. Nishimura (2000). „Indispensable role for TNF- α and IFN- γ at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen“. In: *The Journal of Immunology* 165(2), S. 956–961. DOI: 10.4049/jimmunol.165.2.956.
- Pascolo, S., N. Bervas, J. M. Ure, a. G. Smith, F. a. Lemonnier und B. Pérarnau (Juni 1997). „HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8+ T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice.“ In: *The Journal of Experimental Medicine* 185(12), S. 2043–51. DOI: 10.1084/jem.185.12.2043.
- Pasquetto, V., S. F. Wieland, S. L. Uprichard, M. Tripodi und F. V. Chisari (Juni 2002). „Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures“. In: *Journal of Virology* 76(11), S. 5646–5653. DOI: 10.1128/JVI.76.11.5646-5653.2002.
- Penna, A., F. V. Chisari, A. Bertoletti, G. Missale, P. Fowler, T. Giuberti, F. Fiaccadori und C. Ferrari (Dez. 1991). „Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen.“ In: *The Journal of Experimental Medicine* 174(6), S. 1565–70. DOI: 10.1084/jem.174.6.1565.
- Penna, A., G. Del Prete, A. Cavalli, A. Bertoletti, M. M. D’Elios, R. Sorrentino, M. D’Amato, C. Boni, M. Pilli, F. Fiaccadori und C. Ferrari (Apr. 1997). „Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B“. In: *Hepatology* 25(4), S. 1022–1027. DOI: 10.1002/hep.510250438.
- Peppas, D., L. Micco, A. Javaid, P. T. F. Kennedy, A. Schurich, C. Dunn, C. Pallant, G. Ellis, P. Khanna, G. Dusheiko, R. J. Gilson und M. K. Maini (Jan. 2010). „Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection.“ In: *PLoS pathogens* 6(12), e1001227. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001227.
- Perz, J. F., G. L. Armstrong, L. a. Farrington, Y. J. Hutin und B. P. Bell (2006). „The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide“. In: *Journal of Hepatology* 45(4), S. 529–538. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.05.013.
- Phillips, S., S. Chokshi, A. Riva, A. Evans, R. Williams und N. V. Naoumov (Jan. 2010). „CD8+ T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions“. In: *The Journal of Immunology* 184(1), S. 287–295. DOI: 10.4049/jimmunol.0902761.
- Porter, D. L., M. S. Roth, C. McGarigle, J. Ferrara und J. H. Antin (Jan. 1994). „Induction of Graft-versus-Host Disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia“. In: *New England Journal of Medicine* 330(2), S. 100–106. DOI: 10.1056/NEJM199401133300204.
- Prasad, V. K. und S. Yang (1996). „Allele assignment for HLA-A, -B, and -C genes to the Tenth International Histocompatibility Workshop cell lines.“ In: *Tissue Antigens* 47(6), S. 538–46. DOI: 10.1111/j.1399-0039.1996.tb02596.x.
- Prince, A. M. (Juli 1968a). „An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 60(3), S. 814–821. DOI: 10.1073/pnas.60.3.814.
- Prince, A. M. (Aug. 1968b). „Relation of Australia and SH antigens.“ In: *Lancet* 2(7565), S. 462–463. DOI: 10.1016/S0140-6736(68)90512-6.

- Protzer, U., M. K. Maini und P. a. Knolle (März 2012). „Living in the liver: hepatic infections“. In: *Nature Reviews Immunology* 12(3), S. 201–213. DOI: 10.1038/nri3169.
- Qasim, W., M. Brunetto, A. J. Gehring, S.-A. Xue, A. Schurich, A. Khakpoor, H. Zhan, P. Ciccorossi, K. Gilmour, D. Cavallone, F. Moriconi, F. Farzhenah, A. Mazzoni, L. Chan et al. (2015). „Immunotherapy of HCC metastases with autologous T cell receptor redirected T cells, targeting HBsAg in a liver transplant patient.“ In: *Journal of Hepatology* 62(2), S. 486–91. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.001.
- Qasim, W., H. Zhan, S. Samarasinghe, S. Adams, P. Amroliya, S. Stafford, K. Butler, C. Rivat, G. Wright, K. Somana, S. Ghorashian, D. Pinner, G. Ahsan, K. Gilmour et al. (Jan. 2017). „Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells“. In: *Science Translational Medicine* 9(374), eaaj2013. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.
- Rabe, B., M. Delaleau, A. Bischof, M. Foss, I. Sominskaya, P. Pumpens, C. Cazenave, M. Castroviejo und M. Kann (2009). „Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids“. In: *PLoS Pathogens* 5(8), e1000563. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000563.
- Rabe, B., A. Vlachou, N. Panté, A. Helenius und M. Kann (2003). „Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(17), S. 9849–9854. DOI: 10.1073/pnas.1730940100.
- Rehermann, B., C. Ferrari, C. Pasquinelli und F. V. Chisari (1996). „The hepatitis B virus persists for decades after patients’ recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response.“ In: *Nature medicine* 2, S. 1104–1108. DOI: 10.1038/nm1096-1104.
- Rehermann, B., P. Fowler, J. Sidney, J. Person, A. Redeker, M. Brown, B. Moss, A. Sette und F. V. Chisari (1995a). „The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis“. In: *Journal of Experimental Medicine* 181, S. 1047–1058. DOI: 10.1084/jem.181.3.1047.
- Rehermann, B., C. Pasquinelli, S. M. Mosier und F. V. Chisari (1995b). „Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection.“ In: *The Journal of Clinical Investigation* 96(3), S. 1527–1534. DOI: 10.1172/JCI118191.
- Rehermann, B. (Juli 2013). „Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells“. In: *Nature Medicine* 19(7), S. 859–868. DOI: 10.1038/nm.3251.
- Rehermann, B. und M. Nascimbeni (2005). „Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection.“ In: *Nature reviews. Immunology* 5(March), S. 215–229. DOI: 10.1038/nri1573.
- Restifo, N. P., M. E. Dudley und S. a. Rosenberg (2012). „Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response“. In: *Nature Reviews Immunology* 12(4), S. 269–281. DOI: 10.1038/nri3191.
- Reuß, S., Z. Sebestyén, N. Heinz, R. Loew, C. Baum, R. Debets und W. Uckert (2014). „TCR-engineered T cells: A model of inducible TCR expression to dissect the interrelationship between two TCRs“. In: *European Journal of Immunology* 44(1), S. 265–274. DOI: 10.1002/eji.201343591.

- Robbins, P. F., R. a. Morgan, S. a. Feldman, J. C. Yang, R. M. Sherry, M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, A. V. Nahvi, L. J. Helman, C. L. Mackall, U. S. Kammula, M. S. Hughes, N. P. Restifo, M. Raffeld et al. (2011). „Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1“. In: *Journal of Clinical Oncology* 29(7), S. 917–924. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.2537.
- Rosenberg, S. a. (Okt. 2010). „Of Mice, not men: No evidence for Graft-versus-Host Disease in humans receiving T-cell receptor–transduced autologous T cells“. In: *Molecular Therapy* 18(10), S. 1744–1745. DOI: 10.1038/mt.2010.195.
- Rosenberg, S. a., J. C. Yang, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, G. Q. Phan, D. E. Citrin, N. P. Restifo, P. F. Robbins, J. R. Wunderlich, K. E. Morton, C. M. Laurencot, S. M. Steinberg, D. E. White und M. E. Dudley (2011). „Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy“. In: *Clinical Cancer Research* 17(13), S. 4550–4557. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
- Roth, T. L., C. Puig-Saus, R. Yu, E. Shifrut, J. Carnevale, P. J. Li, J. Hiatt, J. Saco, P. Krystofinski, H. Li, V. Tobin, D. N. Nguyen, M. R. Lee, A. L. Putnam et al. (2018). „Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting“. In: *Nature*. DOI: 10.1038/s41586-018-0326-5.
- Schaefer, S. (Jan. 2007). „Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes“. In: *World Journal of Gastroenterology* 13(1), S. 14. DOI: 10.3748/wjg.v13.i1.14.
- Scholler, J., T. L. Brady, G. Binder-Scholl, W.-T. Hwang, G. Plesa, K. M. Hege, A. N. Vogel, M. Kalos, J. L. Riley, S. G. Deeks, R. T. Mitsuyasu, W. B. Bernstein, N. E. Aronson, B. L. Levine et al. (Mai 2012). „Decade-Long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells“. In: *Science Translational Medicine* 4(132), 132ra53–132ra53. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003761.
- Scholten, K. B., D. Kramer, E. W. Kueter, M. Graf, T. Schoedl, C. J. Meijer, M. W. Schreurs und E. Hooijberg (Mai 2006). „Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells“. In: *Clinical Immunology* 119(2), S. 135–145. DOI: 10.1016/j.clim.2005.12.009.
- Schuch, A., E. Salimi Alizei, K. Heim, D. Wieland, M. M. Kiraithe, J. Kemming, S. Llewellyn-Lacey, Ö. Sogukpinar, Y. Ni, S. Urban, P. Zimmermann, M. Nassal, F. Emmerich, D. A. Price et al. (2018). „Phenotypic and functional differences of HBV core-specific versus HBV polymerase-specific CD8⁺ T cells in chronically HBV-infected patients with low viral load“. In: *Gut*, S. 905–915. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316641.
- Schuster, I. (2008). „Identifikation, Klonierung und retroviraler Transfer allorestingierter FMNL1-peptidspezifischer T-Zellrezeptoren für die Entwicklung adoptiver Immuntherapien gegen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome“. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Seeger, C. und W. S. Mason (Mai 2015). „Molecular biology of hepatitis B virus infection“. In: *Virology* 479-480(9-10), S. 672–686. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.031. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004268221500077X>.

- Sells, M. A., M. L. Chen und G. Acs (Feb. 1987). „Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(4), S. 1005–9. DOI: 10.1073/pnas.84.4.1005.
- Sette, A., A. Vitiello, B. Reheman, P. Fowler, R. Nayarsina, W. M. Kast, C. J. Melief, C. Oseroff, L. Yuan, J. Ruppert, J. Sidney, M. F. del Guercio, S. Southwood, R. T. Kubo et al. (Dez. 1994). „The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes.“ In: *Journal of Immunology* 153(12), S. 5586–92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527444>.
- Shouval, D. und Y. Ilan (1995). „Transplantation of hepatitis B immune lymphocytes as means for adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus.“ In: *Journal of Hepatology* 23(1), S. 98–101. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80317-3.
- Sibener, L. V., R. A. Fernandes, E. M. Kolawole, C. B. Carbone, F. Liu, D. McAfee, M. E. Birnbaum, X. Yang, L. F. Su, W. Yu, S. Dong, M. H. Gee, K. M. Jude, M. M. Davis et al. (2018). „Isolation of a structural mechanism for uncoupling T cell receptor signaling from peptide-MHC binding.“ In: *Cell* 174(3), 672–687.e27. DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.017.
- Sijts, A. J., T. Ruppert, B. Rehermann, M. Schmidt, U. Koszinowski und P. M. Kloetzel (Feb. 2000). „Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes.“ In: *The Journal of Experimental Medicine* 191(3), S. 503–14. DOI: 10.1084/jem.191.3.503.
- Smyk-Pearson, S., I. a. Tester, J. Klarquist, B. E. Palmer, J.-M. Pawlotsky, L. Golden-Mason und H. R. Rosen (2008). „Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help.“ In: *Journal of virology* 82(4), S. 1827–1837. DOI: 10.1128/JVI.01581-07.
- Snyder, J., M. Alexander-Miller, J. Berzofsky und I. Belyakov (Juli 2003). „Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity.“ In: *Current HIV Research* 1(3), S. 287–294. DOI: 10.2174/1570162033485230.
- Sobao, Y., K. Sugi, H. Tomiyama, S. Saito, S. Fujiyama, M. Morimoto, S. Hasuike, H. Tsubouchi, K. Tanaka und M. Takiguchi (2001). „Identification of hepatitis B virus-specific CTL epitopes presented by HLA-A*2402, the most common HLA class I allele in East Asia.“ In: *Journal of Hepatology* 34(6), S. 922–929. DOI: 10.1016/S0168-8278(01)00048-4.
- Sobao, Y., H. Tomiyama, K. Sugi, M. Tokunaga, T. Ueno, S. Saito, S. Fujiyama, M. Morimoto, K. Tanaka und M. Takiguchi (2002). „The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication.“ In: *Journal of hepatology* 36(1), S. 105–115. DOI: 10.1016/S0168-8278(01)00264-1.
- Soto, C. M., J. D. Stone, A. S. Chervin, B. Engels, H. Schreiber, E. J. Roy und D. M. Kranz (Feb. 2013). „MHC-class I-restricted CD4 T cells: a nanomolar affinity TCR has improved anti-tumor efficacy in vivo compared to the micromolar wild-type TCR.“ In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62(2), S. 359–369. DOI: 10.1007/s00262-012-1336-z. arXiv: NIHMS150003.
- Sprinzi, M. F., H. Oberwinkler, H. Schaller und U. Protzer (Juni 2001). „Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice : Crossing the

- species barrier“. In: *Journal of Virology* 75(11), S. 5108–5118. DOI: 10.1128/JVI.75.11.5108-5118.2001.
- Stone, J. D. und D. M. Kranz (2013). „Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies“. In: *Frontiers in Immunology* 4(AUG), S. 1–16. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00244.
- Stoop, J. N., R. G. van der Molen, C. C. Baan, L. J. W. van der Laan, E. J. Kuipers, J. G. Kusters und H. L. a. Janssen (2005). „Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection.“ In: *Hepatology* 41(4), S. 771–778. DOI: 10.1002/hep.20649.
- Suerth, J. D., A. Schambach und C. Baum (2012). „Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors“. In: *Current Opinion in Immunology* 24(5), S. 598–608. DOI: 10.1016/j.coi.2012.08.007.
- Summers, J., J. M. Smolec und R. Snyder (Sep. 1978). „A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(9), S. 4533–4537. DOI: 10.1073/pnas.75.9.4533.
- Surman, D. R., M. E. Dudley, W. W. Overwijk und N. P. Restifo (Jan. 2000). „Cutting edge: CD4⁺ T cell control of CD8⁺ T cell reactivity to a model tumor antigen“. In: *The Journal of Immunology* 164(2), S. 562–565. DOI: 10.4049/jimmunol.164.2.562. arXiv: NIHMS150003.
- Szymczak, A. L., C. J. Workman, Y. Wang, K. M. Vignali, S. Dilioglou, E. F. Vanin und D. a. a. Vignali (Mai 2004). „Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector“. In: *Nature Biotechnology* 22(5), S. 589–594. DOI: 10.1038/nbt957.
- Tan, A. T., E. Loggi, C. Boni, A. Chia, A. J. Gehring, K. S. R. Sastry, V. Goh, P. Fisicaro, P. Andreone, C. Brander, S. G. Lim, C. Ferrari, F. Bihl und A. Bertoletti (Nov. 2008). „Host ethnicity and virus genotype shape the hepatitis B virus-specific T-cell repertoire.“ In: *Journal of Virology* 82(22), S. 10986–97. DOI: 10.1128/JVI.01124-08.
- Tenney, D. J., R. E. Rose, C. J. Baldick, K. a. Pokornowski, B. J. Eggers, J. Fang, M. J. Wichroski, D. Xu, J. Yang, R. B. Wilber und R. J. Colonna (Mai 2009). „Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy“. In: *Hepatology* 49(5), S. 1503–1514. DOI: 10.1002/hep.22841.
- Thimme, R., S. Wieland, C. Steiger, J. Ghayeb, K. a. Reimann, R. H. Purcell und F. V. Chisari (Jan. 2003). „CD8⁺ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Virology* 77(1), S. 68–76. DOI: 10.1128/JVI.77.1.68-76.2003.
- Thomas, S., H. J. Stauss und E. C. Morris (Feb. 2010). „Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer.“ In: *Immunology* 129(2), S. 170–7. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03227.x.
- Thomas, S., S.-a. Xue, M. Cesco-Gaspere, E. San José, D. P. Hart, V. Wong, R. Debets, B. Alarcon, E. Morris und H. J. Stauss (Nov. 2007). „Targeting the Wilms Tumor Antigen 1 by TCR Gene Transfer: TCR Variants Improve Tetramer Binding but Not the Function of Gene Modified Human T Cells“. In: *The Journal of Immunology* 179(9), S. 5803–5810. DOI: 10.4049/jimmunol.179.9.5803.

- Tong, S. und P. Revall (Apr. 2016). „Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability“. In: *Journal of Hepatology* 64(1), S4–S16. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.01.027.
- Trepo, C. (2014). „A brief history of hepatitis milestones“. In: *Liver International* 34(SUPPL1), S. 29–37. DOI: 10.1111/liv.12409.
- Trépo, C., H. L. Y. Chan und A. Lok (Dez. 2014). „Hepatitis B virus infection“. In: *The Lancet* 384(9959), S. 2053–2063. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60220-8.
- Tsui, L. V., L. G. Guidotti, T. Ishikawa und F. V. Chisari (1995). „Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(26), S. 12398–12402. DOI: 10.1073/pnas.92.26.12398.
- Turner, S. J., P. C. Doherty, J. McCluskey und J. Rossjohn (2006). „Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity“. In: *Nature Reviews Immunology* 6(12), S. 883–894. DOI: 10.1038/nri1977.
- Urbani, S., C. Boni, G. Missale, G. Elia, C. Cavallo, M. Massari, G. Raimondo und C. Ferrari (Dez. 2002). „Virus-specific CD8⁺ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C“. In: *Journal of Virology* 76(24), S. 12423–12434. DOI: 10.1128/JVI.76.24.12423-12434.2002.
- Velkov, S., J. J. Ott, U. Protzer und T. Michler (2018). „The global hepatitis B virus genotype distribution approximated from available genotyping data“. In: *Genes* 9(10). DOI: 10.3390/genes9100495.
- Venturi, V., D. a. Price, D. C. Douek und M. P. Davenport (2008). „The molecular basis for public T-cell responses?“ In: *Nature reviews. Immunology* 8(3), S. 231–238. DOI: 10.1038/nri2260.
- Viganò, S., D. T. Utzschneider, M. Perreau, G. Pantaleo, D. Zehn und A. Harari (2012). „Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells?“ In: *Clinical and Developmental Immunology* 2012, S. 1–14. DOI: 10.1155/2012/153863.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas und S. R. Riddell (Okt. 1995). „Reconstitution of Cellular Immunity against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor“. In: *New England Journal of Medicine* 333(16), S. 1038–1044. DOI: 10.1056/NEJM199510193331603.
- Walter, E., R. Keist, B. Niederöst, I. Pult und H. E. Blum (Juli 1996). „Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo“. In: *Hepatology* 24(1), S. 1–5. DOI: 10.1002/hep.510240101.
- Wang, H., H. Luo, X. Wan, X. Fu, Q. Mao, X. Xiang, Y. Zhou, W. He, J. Zhang, Y. Guo, W. Tan und G. Deng (2020). „TNF- α \ IFN- γ profile of HBV-specific CD4 T cells is associated with liver damage and viral clearance in chronic HBV infection“. In: *Journal of Hepatology* 72(1), S. 45–56. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.08.024.
- Wang, H., P. Men, Y. Xiao, P. Gao, M. Lv, Q. Yuan, W. Chen, S. Bai und J. Wu (2019). „Hepatitis B infection in the general population of China: A systematic review and meta-analysis“. In: *BMC Infectious Diseases* 19(1), S. 1–10. DOI: 10.1186/s12879-019-4428-y.
- Washburn, M. L., M. T. Bility, L. Zhang, G. I. Kovalev, A. Buntzman, J. A. Frelinger, W. Barry, A. Ploss, C. M. Rice und L. Su (Apr. 2011). „A humanized mouse model to study hepatitis C

- virus infection, immune response, and liver disease“. In: *Gastroenterology* 140(4), S. 1334–1344. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.001.
- Webster, G. J. M., S. Reignat, D. Brown, G. S. Ogg, L. Jones, S. L. Seneviratne, R. Williams, G. Dusheiko und A. Bertolotti (Juni 2004). „Longitudinal analysis of CD8⁺ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B : implications for immunotherapy“. In: *Journal of Virology* 78(11), S. 5707–5719. DOI: 10.1128/JVI.78.11.5707-5719.2004. URL: <https://jvi.asm.org/content/78/11/5707>.
- Wedemeyer, H., K. Schöneweis, P. O. Bogomolov, N. Voronkova, V. Chulanov, T. Stepanova, B. Bremer, L. Allweiss, M. Dandri, J. Burhenne, W.-E. Haefeli, S. Ciesek, U. Dittmer, A. Alexandrov und S. Urban (Apr. 2019). „GS-13-Final results of a multicenter, open-label phase 2 clinical trial (MYR203) to assess safety and efficacy of myreludex B in cwith PEG-interferon Alpha 2a in patients with chronic HBV/HDV co-infection“. In: *Journal of Hepatology* 70(1), e81. DOI: 10.1016/S0618-8278(19)30141-0.
- Wentworth, P. A., A. Vitiello, J. Sidney, E. Keogh, R. W. Chesnut, H. Grey und A. Sette (Jan. 1996). „Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice“. In: *European Journal of Immunology* 26(1), S. 97–101. DOI: 10.1002/eji.1830260115.
- Wherry, E. J. (2011). „T cell exhaustion.“ In: *Nature immunology* 12(6), S. 492–499. DOI: 10.1038/ni.2035.
- WHO (2017). „Epidemiological update: increasing mortality calls for action 03“. In: *Global hepatitis report, 2017*, S. 7–20.
- WHO (2018). *Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016*. Geneva. URL: https://www.who.int/healthinfo/global%7B%5C_%7Dburden%7B%5C_%7Ddisease/GHE2016%7B%5C_%7DDeaths%7B%5C_%7DGlobal%7B%5C_%7D2000%7B%5C_%7D2016.xls?ua=1.
- WHO - Fact sheets: Hepatitis B (2019). URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (besucht am 03.10.2019).
- Wieland, S. F., H. C. Spangenberg, R. Thimme, R. H. Purcell und F. V. Chisari (Feb. 2004). „Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(7), S. 2129–2134. DOI: 10.1073/pnas.0308478100.
- Wieland, S. F., A. Eustaquio, C. Whitten-Bauer, B. Boyd und F. V. Chisari (2005). „Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(28), S. 9913–9917. DOI: 10.1073/pnas.0504273102.
- Wisskirchen, K., J. Kah, A. Malo, T. Asen, T. Volz, L. Allweiss, J. M. Wettengel, M. Lütgehetmann, S. Urban, T. Bauer, M. Dandri und U. Protzer (2019). „T cell receptor grafting allows virological control of hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Clinical Investigation* 129(7), S. 2932–2945. DOI: 10.1172/JCI120228.
- Wisskirchen, K., K. Metzger, S. Schreiber, T. Asen, L. Weigand, C. Dargel, K. Witter, E. Kieback, M. F. Sprinzl, W. Uckert, M. Schiemann, D. H. Busch, A. M. Krackhardt und U. Protzer (Aug.

- 2017). „Isolation and functional characterization of hepatitis B virus-specific T-cell receptors as new tools for experimental and clinical use“. In: *PLOS ONE* 12(8), e0182936. DOI: 10.1371/journal.pone.0182936.
- Wong, W. W. L., P. Pechivanoglou, J. Wong, J. M. Bielecki, A. Haines, A. Erman, Y. Saeed, A. Phoon, M. Tadrous, M. Younis, N. Z. Rayad, V. Rac, H. L. A. Janssen und M. D. Krahn (2019). „Antiviral treatment for treatment-naïve chronic hepatitis B: systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials“. In: *Systematic Reviews* 8(1), S. 1–15. DOI: 10.1186/s13643-019-1126-1.
- Wooldridge, L., H. A. van den Berg, M. Glick, E. Gostick, B. Laugel, S. L. Hutchinson, A. Milicic, J. M. Brenchley, D. C. Douek, D. A. Price und A. K. Sewell (Juli 2005). „Interaction between the CD8 coreceptor and Major Histocompatibility Complex Class I stabilizes T cell receptor-antigen complexes at the cell surface“. In: *Journal of Biological Chemistry* 280(30), S. 27491–27501. DOI: 10.1074/jbc.M500555200.
- Wright, G. P., C. a. Notley, S.-A. Xue, G. M. Bendle, A. Holler, T. N. Schumacher, M. R. Ehrenstein und H. J. Stauss (Nov. 2009). „Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(45), S. 19078–83. DOI: 10.1073/pnas.0907396106.
- Wursthorn, K., M. Lutgehetmann, M. Dandri, T. Volz, P. Buggisch, B. Zollner, T. Longerich, P. Schirmacher, F. Metzler, M. Zankel, C. Fischer, G. Currie, C. Brosgart und J. Petersen (2006). „Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B“. In: *Hepatology* 44(3), S. 675–684. DOI: 10.1002/hep.21282.
- Xia, Y. und U. Protzer (2017). „Control of hepatitis B virus by cytokines“. In: *Viruses* 9(1), S. 1–12. DOI: 10.3390/v9010018.
- Xia, Y., D. Stadler, J. Lucifora, F. Reisinger, D. Webb, M. Hösel, T. Michler, K. Wisskirchen, X. Cheng, K. Zhang, W.-M. Chou, J. M. Wettengel, A. Malo, F. Bohne et al. (Jan. 2016). „Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α produced by T cells reduce the HBV persistence form, cccDNA, without cytolysis“. In: *Gastroenterology* 150(1), S. 194–205. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.09.026.
- Xu, C., H. Guo, X.-B. Pan, R. Mao, W. Yu, X. Xu, L. Wei, J. Chang, T. M. Block und J.-T. Guo (2010). „Interferons Accelerate Decay of Replication-Competent Nucleocapsids of Hepatitis B Virus“. In: *Journal of Virology* 84(18), S. 9332–9340. DOI: 10.1128/jvi.00918-10.
- Xue, S.-A., L. Gao, M. Ahmadi, S. Ghorashian, R. D. Barros, C. Pospori, A. Holler, G. P. Wright, S. Thomas, M. Topp, E. C. Morris und H. J. Stauss (2013). „Human MHC Class I-restricted high avidity CD4⁺ T cells generated by co-transfer of TCR and CD8 mediate efficient tumor rejection in vivo.“ In: *Oncoimmunology* 2(1), e22590. DOI: 10.4161/onci.22590.
- Yan, H., B. Peng, W. H. He, G. C. Zhong, Y. H. Qi, B. J. Ren, Z. C. Gao, Z. Y. Jing, M. Song, G. W. Xu, J. H. Sui und W. H. Li (2013). „Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide“. In: *Journal of Virology* 87(14), S. 7977–7991. DOI: Doi10.1128/Jvi.03540-12.

- Yan, H., G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao et al. (2012). „Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus.“ In: *eLife* 1, e00049. DOI: 10.7554/eLife.00049.
- Yang, H.-I., S.-N. Lu, Y.-F. Liaw, S.-L. You, C.-A. Sun, L.-Y. Wang, C. K. Hsiao, P.-J. Chen, D.-S. Chen und C.-J. Chen (Juli 2002). „Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma“. In: *New England Journal of Medicine* 347(3), S. 168–174. DOI: 10.1056/NEJMoa013215.
- Yang, J., J. Chen, J. He, Y. Xie, Y. Zhu, H. Cao und L. Li (Juli 2014). „Profiling the repertoire of T-cell receptor beta-chain variable genes in peripheral blood lymphocytes from subjects who have recovered from acute hepatitis B virus infection.“ In: *Cellular & molecular immunology* 11(4), S. 332–42. DOI: 10.1038/cmi.2014.22.
- Yee, C. (Jan. 2014). „The use of endogenous T cells for adoptive transfer“. In: *Immunological Reviews* 257(1), S. 250–263. DOI: 10.1111/imr.12134.
- Zhang, X., W. Lu, Y. Zheng, W. Wang, L. Bai, L. Chen, Y. Feng, Z. Zhang und Z. Yuan (2016). „In situ analysis of intrahepatic virological events in chronic hepatitis B virus infection“. In: *Journal of Clinical Investigation* 126(3), S. 1079–1082. DOI: 10.1172/JCI83339.
- Zhang, Y., Y. Wu, M. Deng, D. Xu, X. Li, Z. Xu, J. Hu, H. Zhang, K. Liu, Y. Zhao, F. Gao, S. Bi, G. F. Gao, J. Zhao et al. (Juni 2018). „CD8⁺ T-cell response-associated evolution of hepatitis B virus core protein and disease progress“. In: *Journal of Virology* 92(17). Hrsg. von J.-H. J. Ou, S. 1–18. DOI: 10.1128/JVI.02120-17.
- Zhou, D., R. Srivastava, V. Grummel, S. Cepok, H.-P. Hartung und B. Hemmer (März 2006). „High throughput analysis of TCR- β rearrangement and gene expression in single T cells“. In: *Laboratory Investigation* 86(3), S. 314–321. DOI: 10.1038/labinvest.3700381.
- Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono und T. J. Hope (Apr. 1999). „Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors“. In: *Journal of Virology* 73(4), S. 2886–2892. DOI: 10.1128/JVI.73.4.2886-2892.1999.

Abkürzungsverzeichnis

AG	<u>A</u> rbeits <u>g</u> ruppe
AHB	akute <u>H</u> epatitis <u>B</u>
Anti-HBs	Antikörper gegen das HBsAg
Anti-HBe	Antikörper gegen das HBeAg
Anti-HBc	Antikörper gegen das HBcAg
AS	<u>A</u> minosäure
AZT	<u>A</u> doptive T- <u>Z</u> ell- <u>T</u> herapie
CAR	<u>c</u> himärer <u>A</u> ntigen <u>r</u> ezeptor
cccDNA	<i><u>c</u>ovalently <u>c</u>losed <u>c</u>ircular <u>D</u>N<u>A</u></i>
CDR	<i><u>c</u>omplementarity <u>d</u>etermining <u>r</u>egion</i>
CHB	chronische <u>H</u> epatitis <u>B</u>
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>v</u> irus
DHBV	<i><u>d</u>uck <u>h</u>epatitis <u>B</u> <u>v</u>irus</i>
ELISA	<i><u>E</u>nzyme <u>l</u>inked <u>I</u>mmunosorbent <u>A</u>ssay</i>
ER	endoplasmatisches <u>R</u> etikulum
FACS	<i><u>f</u>luorescence-<u>a</u>ctivated <u>c</u>ell <u>s</u>orting</i>
GMP	<i><u>G</u>ood <u>M</u>anufacturing <u>P</u>ractice</i>
GSHV	<i><u>g</u>round <u>s</u>quirrel <u>h</u>epatitis <u>v</u>irus</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HBcAg	<i><u>H</u>B<u>V</u> <u>c</u>ore <u>a</u>ntigen</i>
HBeAg	<i><u>H</u>B<u>V</u> <u>e</u>nvelope <u>a</u>ntigen</i>
HBsAg	<i><u>H</u>B<u>V</u> <u>s</u>urface <u>a</u>ntigen</i>
HLA	<i><u>h</u>uman <u>l</u>eukocyte <u>a</u>ntigen</i>
HSZT	<i>allogenen <u>h</u>ämatopoetischen <u>S</u>tammzell<u>t</u>ransplantation</i>
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n
IMGT	the international <u>I</u> m <u>M</u> uno <u>G</u> ene <u>T</u> ics information system http://www.imgt.org (founder and director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France)
IRES	<u>i</u> nterne <u>r</u> ibosomale <u>E</u> intritts <u>s</u> telle

ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
LCMV	<i>L Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus</i>
LHBsAg	<i>large HBV surface antigen</i>
LT	<i>Lymphotoxin</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MACS	<i>„magnetic-activated cell sorting“</i>
MHBsAg	<i>middle HBV surface antigen</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPSV	<i>myeloproliferative sarcoma virus</i>
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T cells element</i>
NK-Zellen	<i>Natürliche Killerzellen</i>
NKT	<i>Natürliche Killer-T-Zellen</i>
NTCP	<i>Na⁺ taurocholate cotransporter polypeptide</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
ORFs	<i>open reading frames</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PC	<i>population coverage</i>
PD1	<i>programmed cell death protein</i>
PRE	<i>posttranscriptional regulatory element</i>
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
S	<i>Surface</i>
SHBsAg	<i>Small HBV surface antigen</i>
TAP	<i>Tumor-infiltrierende Lymphozyten</i>
TIL	<i>Tumor-infiltrierende Lymphozyten</i>
TRAC	<i>Konstante Regione der α-TZR-Kette</i>
TRBC	<i>Konstante Regione der β-TZR-Kette</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TZR	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
ÜS	<i>Überstand</i>
WHV	<i>woodchuck hepatitis virus</i>
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Ulrike Protzer, dass ich die Möglichkeit hatte meine medizinische Doktorarbeit über dieses sehr interessante Thema in einem hervorragenden Team absolvieren zu dürfen. Ich danke für die Ermöglichung eines Stipendiums und die Teilnahme am Graduiertenkolleg des Sonderforschungsbereichs TR 36 „Principles and Applications of Adoptive T Cell Therapy“ sowie der Teilnahme an verschiedenen Kongressen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Dr. Karin Wisskirchen für ihre langjährige engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit, ihre helfenden Hände bei der Durchführung der teils großen Versuchsansätze und ihre konstruktiven Ratschläge zur und um die Doktorarbeit herum. Danke für deine motivierenden Worte diese Arbeit abzuschließen.

Ich danke Prof. Dr. Angela Krackhardt und Luise Weigand aus ihrer Arbeitsgruppe für die hilfreichen Tipps und Protokolle zur Identifizierung der T-Zell-Rezeptor-Sequenzen und der Bereitstellung der LCL-Linien für die Testung der HLA-Restriktion.

Ich danke Prof. Dr. Dirk Busch und seinem Team für die Beisteuerung der Streptamere und die Hilfe bei der Isolierung und Identifizierung der T-Zell-Rezeptoren.

Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Uckert und seiner Arbeitsgruppe (insbesondere Elisa Kieback) für die Bereitstellung des retroviralen Vektors, der optimierten konstanten TCR Regionen (Arbeitsgruppe) und die hilfreichen Vorschläge zur Optimierung der T-Zell-Rezeptor-Konstrukte.

Ich danke Prof. Dr. Antonio Bertoletti und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der T-Zell-Rezeptoren C_{AB} und S_{AB} und einem Teil der LCL-Linien und den wissenschaftlichen Diskurs rund um das Thema adoptive T-Zell-Therapie der Hepatitis B.

Ich bedanke mich auch bei Theresa Asen. Ohne ihr Organisationstalent und ihre Hilfsbereitschaft wäre der Laboralltag um einiges beschwerlicher gewesen. Danke auch für die Hilfe an der Hood und im Tierstall.

Ich danke Nina Böttinger, Christina Dargel, Steffi Graf und PD Dr. Martin Sprinzel sowie allen anderen Kolleginnen und Kollegen für all die großen und kleinen hilfreichen Tricks zur Bewältigung des Laboralltags und die kollegialen Gespräche, ohne die das Gelingen der Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meinen Eltern dafür, dass sie mich stets unterstützten haben und hinter mir standen und danke für das Korrekturlesen der Arbeit.

Last but not least danke ich meiner Frau Judith, die mich immer unterstützt hat und seit Beginn der Arbeit an meiner Seite steht. Auch ihr sei Dank für das Korrekturlesen und ihre aufbauenden Gespräche, wenn es mal nicht so lief wie es sollte.