

Zum Einfluss der Interaktion von HLA-E und NKG2A auf Phänotyp und Funktion
CD8 positiver T-Lymphozyten bei chronischer Hepatitis C

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ina Maria Niederle
aus Essen

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Spengler
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Oldenburg

Tag der Mündlichen Prüfung: 2.3.2009

Medizinische Klinik und Poliklinik I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität, Bonn
Prof. Dr. T. Sauerbruch

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

I. INHALTSVERZEICHNIS**II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS** **6****1. EINLEITUNG** **8**

1.1 DAS HEPATITIS C VIRUS	8
1.2. GRUNDLAGEN DER IMMUNANTWORT	9
1.2.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM	9
1.2.1.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	10
1.2.1.2 Zytokine	13
1.2.2.1 Die zelluläre Immunantwort	15
1.2.2.2 Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)	16
1.3 MHC-MOLEKÜLE	17
1.3.1 MHC-KLASSE-I-MOLEKÜLE	17
1.3.2 HLA-E UND WEITERE NICHT-KLASSISCHE MHC-I-MOLEKÜLE	20
1.5 FRAGESTELLUNG	21

2. MATERIALIEN **23**

2.1 ALLGEMEINE REAGENZIEN	23
2.2 REAGENZIEN FÜR DIE SEPARATION PERIPHERER BLUTLYMPHOZYTEN UND ZELLKULTUR	23
2.3 PEPTIDE	24
2.4 REAGENZ ZUR ZELLZAHLBESTIMMUNG	24
2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	24
2.5.1 REAGENZIEN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	24
2.5.2 ANTIKÖRPER FÜR DIE FACS-ANALYSE	24
2.6 REAGENZIEN FÜR ⁵¹CHROM FREISETZUNGSASSAY	25
2.7 KITS FÜR DIE ELISAS	25
2.8 SONSTIGE LABORMATERIALIEN	26
2.9 LABORGERÄTE	27

3. METHODEN **29**

3.1 PROBENGEWINNUNG	29
3.2 ZELLISOLIERUNG	30
3.2.1 ISOLIERUNG PERIPHERER BLUTLYMPHOZYTEN	30
3.2.2 ISOLIERUNG VERSCHIEDENER ZELLPOPULATIONEN MITTELS MAGNETISCHER BEADS	31
3.3 KULTIVIERUNG VON B5-ZIELZELLEN	33
3.4 BESTIMMUNG DER ANZAHL VITALER ZELLEN	33
3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	34
3.5.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	34
3.5.2 UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON NKG2A AUF CD8 POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN	35
3.5.3 INTRAZELLULÄRE ZYTOKIN-ANALYSE	36
3.5.4 EINFLUSS DER HLA-E/NKG2A VERMITTELTEN ZYTOKINSEKRETION AUF CD8+ LYMPHOZYTEN	38

3.6 CD107A ZYTOTOXIZITÄTSASSAY	39
3.7 ⁵¹CHROM-FREISETZUNGS-ASSAYS ZUR ZYTOTOXIZITÄTSBESTIMMUNG	41
3.8 HUMAN-IL-6-, HUMAN-IL-10-, HUMAN-TNF-A-ELISA	44
3.9 STATISTIK	46
4. ERGEBNISSE	47
<hr/>	
4.1 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DES NKG2A-REZEPTORS AUF CD8 POSITIVEN LYMPHOZYTEN	47
4.1.1 EXPRESSION VON NKG2A AUF CD8 POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN	47
4.1.2 FUNKTIONELLE RELEVANZ DER ERHÖHTEN NKG2A-EXPRESSION	47
4.1.3 FUNKTIONELLE RELEVANZ DER STIMULIERUNG MIT P18	48
4.2 VERÄNDERUNG DES CROSS-TALKS ZWISCHEN NK-ZELLEN UND CD8 POSITIVEN T-ZELLEN DURCH DIE HLA-E/NKG2A INTERAKTION	49
4.2.1 P18 INDUZIERT VERÄNDERUNG DER ZYTOKINSEKRETION	50
4.2.1.1 TNF- α	50
4.2.1.2 IL-10	52
4.2.1.3 IL-6	55
4.2.2 EINFLUSS DER HLA-E INDUZIERTEN VERÄNDERUNG DER ZYTOKIN-SEKRETION AUF PHÄNOTYP UND FUNKTION CD8 POSITIVER LYMPHOZYTEN	56
4.2.2.1 Einfluss auf den Phänotyp	56
4.2.2.1.1 CCR7	56
4.2.2.1.2 CCR5	57
4.2.2.1.3 CD80	58
4.2.2.2. Einfluss auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69	59
4.3 EINFLUSS DER HLA-E INDUZIERTEN VERÄNDERUNG DER ZYTOKINSEKRETION AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT CD8 POSITIVER LYMPHOZYTEN	61
4.3.1 VERÄNDERUNG DER ZYTOTOXIZITÄT ALLER CD8 POSITIVEN T-ZELLEN	61
4.3.2 VERÄNDERUNG DER ZYTOTOXIZITÄT IN DER STARK CD8 POSITIVEN T-ZELL-SUBPOPULATION	63
4.3.3 VERÄNDERUNG DER ZYTOTOXIZITÄT IN DER NIEDRIG CD8 POSITIVEN T-ZELL-SUBPOPULATION	64
5. DISKUSSION	66
<hr/>	
5.1 EXPRESSION UND FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DES NKG2A-REZEPTORS AUF CD8 POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN BEI DER CHRONISCHEN HEPATITIS C	66
5.2 VERÄNDERUNG DES CROSS-TALKS ZWISCHEN NK-ZELLEN UND CD8 POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN DURCH DIE HLA-E/NKG2A-INTERAKTION	69
5.2.1 P18 INDUZIERT VERÄNDERUNG DER ZYTOKINSEKRETION	69
5.2.2 EINFLUSS DER HLA-E INDUZIERTEN VERÄNDERUNG DER ZYTOKINSEKRETION DER NK-ZELLEN AUF PHÄNOTYP UND FUNKTION CD8 POSITIVER LYMPHOZYTEN	72
5.2.2.1 Einfluss auf den Phänotyp	72
5.2.2.2 Einfluss auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69	74
5.3 EINFLUSS DER HLA-E INDUZIERTEN VERÄNDERUNG DER ZYTOKINSEKRETION AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT CD8 POSITIVER T-LYMPHOZYTEN	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	76
<hr/>	
7. ABBILDUNGSNACHWEIS	78
<hr/>	

8. LITERATURVERZEICHNIS	80
--------------------------------	-----------

9. DANKSAGUNG	97
----------------------	-----------

10. LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
-----------------------	---

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	<i>engl.</i> : antibody depending cytotoxicity
APC	<i>engl.</i> : antigen presenting cell
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintri-phosphat
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	<i>engl.</i> : chemokine ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>engl.</i> : cluster of differentiation
CLIP	<i>engl.</i> : class II invariant chain peptide
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>engl.</i> : enzyme-linked immunoadsorbent assay; Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionsassay
ER	Endoplasmatische Retikulum
FACS	<i>engl.</i> : fluorescence activated cell sorting
FCS	<i>engl.</i> : fetal calf serum
FITC	Fluoresceiniso-thiocyanat
FSC	<i>engl.</i> : forward light scatter
γ GT	Gammaglutamyltransferase
GM-CSF	<i>engl.</i> : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBV	Hepatitis B Virus
(H)CMV	(Humanes) Zytomegalievirus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	<i>engl.</i> : human leukocyte antigen
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILR	<i>engl.</i> : immunglobulin-like-transcript
IVDA	intravenös Drogenabhängige
KIR	<i>engl.</i> : killer immunglobulin-like Rezeptoren
MHC	<i>engl.</i> : major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKR	NK-Zell-Rezeptoren
p	statistische Wahrscheinlichkeit
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
PBS	<i>engl.</i> : phosphate buffered saline
RNA	<i>engl.</i> : ribonucleic acid
SSC	<i>engl.</i> : side scatter
TAP	<i>engl.</i> : transporter associated with antigen processing
TCR	<i>engl.</i> : T cell receptor
T _H 0/T _H 1/T _H 2	T-Helferzelle Typ 0/1/2
TGF-β	<i>engl.</i> : transforming growth factor β
TLR	<i>engl.</i> : toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U/min	Umdrehungen/Minute
vs.	<i>lat.</i> : versus

1. Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV), ein einzelsträngiges RNA-Virus aus der Familie der Flaviviridae, ist der häufigste Erreger der Non-A, Non-B Hepatitiden. Schon Mitte der siebziger Jahre zeichnete sich anhand von klinischen und epidemiologischen Befunden ab, dass es neben dem Hepatitis A- und dem Hepatitis B-Virus noch eine weitere Form der Virushepatitis geben musste. Diese parenteral, vor allem durch Bluttransfusionen, erworbene Erkrankung wurde zunächst als Posttransfusionshepatitis, bzw. Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichnet (Dienstag, 1983). Erst 1989 gelang es, aus dem Serum künstlich infizierter Schimpansen die Virus-RNA des sogenannten Hepatitis C Virus (HCV) zu isolieren (Choo et al., 1989).

Die Prävalenz der chronischen HCV-Infektion liegt mit weltweit etwa 130 Millionen Patienten bei ca. 3%, wobei jährlich etwa 3 bis 4 Millionen Neuinfektionen hinzukommen (WHO, 2000; Lauer et al., 2001). In Deutschland beträgt der Anteil der HCV-infizierten Personen an der Gesamtbevölkerung laut einer Erhebung des Robert-Koch-Instituts 0,4-0,7%, entsprechend etwa 400.000 bis 500.000 Virusträgern (Robert-Koch-Institut, 2005).

Das Hepatitis C Virus wird parenteral besonders über kontaminierte Blutprodukte, Nadelstichverletzungen im medizinischen Bereich oder Austausch von gebrauchten Nadeln bei Drogenabhängigen übertragen. Aufgrund dieser Transmissionswege steigt in Risikogruppen wie Hämophilen das Risiko einer Infektion auf 60-70%, bzw. bei i.v.-Drogenabhängigen (IVDA) sogar auf 80-95% (Conry-Cantilena, 1996; Heintges et al., 1997). Die Anzahl der sich infizierenden Hämophiliepatienten hat aber aufgrund der seit 1990 bestehenden Untersuchung der Blutprodukte auf HCV deutlich abgenommen (Busch, 2005). Zusätzlich kann das Virus auch über Sexualkontakte (Alter, 1989; Alter, 2002) und direkt von der Mutter auf das Kind übertragen werden (Zeuzem et al., 1995; Roberts und Yeung, 2002; Terrault, 2002; Mast et al., 2005).

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus verläuft sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase meist inapparent (Racanelli et al., 2003). Nur bei 10-20% der Patienten kommt es nach einer Inkubationszeit von ca. 8 (2-26) Wochen zu einem signifikanten Anstieg der Leberenzyme oder einem Ikterus. Auch im weiteren Krankheitsverlauf steigen die Transaminasen nur selten über das Zwei- bis Dreifache der Norm. Häufig liegen sie sogar im Normbereich (EASL International Consensus Conference on Hepatitis C, 1999).

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus führt bei 50-80% der infizierten Patienten zu einer chronischen Hepatitis (Choo et al., 1989) mit einem hieraus resultierendem deutlich erhöhten Risiko, eine Leberzirrhose und in der Folge ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (Tsukama et al., 1993; Hoofnagle et al., 1997).

Die geschätzte Anzahl Neuerkrankungen an HCV-assoziiertem hepatozellulärem Karzinom liegt derzeit bei etwa 100.000 Patienten pro Jahr (Poynard et al., 2003), wobei nach neueren Studien 27% der Leberzirrhosen und 25% der Erkrankungen an hepatozellulärem Karzinom weltweit auf eine Hepatitis C Virus-Infektion zurückzuführen sind (Perz et al., 2006). Zudem stellt die HCV-assoziierte Leberzirrhose die weltweit führende Indikation für eine Lebertransplantation dar (Shepard et al., 2005; Chander et al., 2002).

Seit 2001 besteht die Standardtherapie der Hepatitis C aus einer Kombination von Ribavirin und pegyliertem Interferon α -2b oder -2a. Die Erfolgsraten dieser Therapie liegen mittlerweile bei etwa 60%, bei Patienten mit den Genotypen 2 und 3 des Virus sogar bei 90%. Dagegen wird bei Patienten mit der in Deutschland am häufigsten vorkommenden Genotyp 1-Infektion, sowie bei Infektionen mit dem HCV Genotyp 4 nur bei etwa 50% ein dauerhaftes virologisches Ansprechen erzielt. Abgesehen vom Genotyp gibt es weitere, voneinander unabhängige Parameter, die den Therapieerfolg positiv beeinflussen. Dies sind niedriges Lebensalter (<40 Jahre), weibliches Geschlecht, niedriger Fibrosegrad und eine HCV-Viruslast von unter 2 Millionen Kopien pro ml (Polynard et al., 1998).

Die Mechanismen, die zur Viruspersistenz und somit zur Chronifizierung führen, sind zurzeit nur teilweise verstanden. Trotz nachweisbarer spezifischer Antikörper und HCV-spezifischer T-Lymphozyten legen zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Immunantwort und dem klinischen Verlauf der Infektion nahe. Dies lässt vermuten, dass das Virus mit den Mechanismen einer erfolgreichen Immunantwort interferiert. In diesem Zusammenhang wurde wiederholt von einer gestörten Funktion der Natürlichen Killerzellen berichtet (Corado et al., 1997; Tseng et al., 2002; Crotta et al., 2002).

1.2. Grundlagen der Immunantwort

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das humane Immunsystem umfasst die sogenannte angeborene und die erworbene (= adaptive) Immunität. Hierbei ist die effektive Interaktion beider Bestandteile der Immunantwort für eine suffiziente antivirale Aktivität von entscheidender Bedeutung.

Das angeborene Immunsystem ist für die schnelle, unspezifische Sofortreaktion bei Infektionen zuständig. Dabei kommt es zur Erkennung häufig vorkommender Oberflächenmoleküle auf Pathogenen durch die phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten). Diese Zellen nehmen das jeweilige Pathogen auf und bauen es mittels hydrolytischer Enzyme in den Lysosomen ab.

Ein weiterer zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die sogenannten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die nicht antigenspezifisch sind und ebenfalls in erster Linie für die Abwehr intrazellulärer Erreger Bedeutung haben.

1.2.1.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine heterogene Subpopulation der Lymphozyten. Charakterisiert sind sie durch das Fehlen des CD3-Moleküls sowie die Expression von CD56 und/oder CD16. Sie stellen etwa 5-15% der mononukleären Zellen im peripheren Blut und bis zu 45% in einigen Organen wie beispielsweise der Leber dar (Trinchieri et al., 1989; Hata et al., 1991; Whiteside und Herberman, 1994). NK-Zellen haben die charakteristische Fähigkeit, virusinfizierte oder transformierte Zellen ohne vorherige antigen-spezifische Aktivierung erkennen und lysieren zu können (Cooper et al., 2001).

Diese Erkennung und anschließende Lyse durch die NK-Zellen verläuft auf zwei verschiedene Arten. Beim ersten Mechanismus handelt es sich um die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC = antibody depending cytotoxicity). Dabei bindet der Fc-Rezeptor auf der NK-Zelle (= CD16) an einen Antikörper, der an die Zielzelle gebunden ist. Hierdurch erfolgt die Freisetzung von Perforin und Granzym aus zytotoxischen Granula, wodurch die Lysierung der Antikörper-beladenen Zelle induziert wird (siehe auch Abschnitt 2.2.2).

Der zweite Mechanismus, die natürliche Zytotoxizität, wird über eine Vielzahl von Rezeptoren reguliert (Moretta et al., 2000; Biassoni et al., 2001), die in ihrer Gesamtheit als NK-Zell-Rezeptoren (NKR) bezeichnet werden. Diese können allgemein in aktivierende und hemmende NK-Zell-Rezeptoren eingeteilt werden.

Die Liganden, welche durch die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren erkannt werden, sind auch auf „normalen“ Zellen vorhanden. Um die unspezifische Zerstörung gesunder Zellen zu verhindern, exprimieren NK-Zellen ein großes Repertoire hemmender Rezeptoren. Diese Rezeptoren binden Major Histocompatibility Complex- (MHC-) Klasse-I-Moleküle auf der Zielzelle. Zu diesen Rezeptoren zählen NKG2A und die „killer cell immunoglobulin-like“-

Rezeptoren (KIR). Mit Ausnahme der NK-Zellneoplasien exprimiert jede NK-Zelle normalerweise zumindest einen NK-Rezeptor, der durch Bindung von MHC-Klasse-I-Molekülen die NK-Zelle inhibiert (Valiante et al., 1997). Dies verhindert, dass NK-Zellen gesunde, körpereigene Zellen zerstören, die MHC-Moleküle in normaler Menge exprimieren (Selbsttoleranz). Dagegen lysieren NK-Zellen spontan Zellen mit fremden MHC-Molekülen oder einer verminderten MHC-Expression (siehe Abb. 1). Eine solche verminderte Expression von MHC I ist ein typisches Merkmal transformierter oder virus-infizierter Zellen (Ploegh, 1998; Algarra et al., 2000). Diese Beobachtungen führten Mitte der achtziger Jahre zur „missing self“-Hypothese (Ljunggren und Karre, 1990).

Bisher wurden auf NK-Zellen drei verschiedene Familien inhibitorischer Rezeptoren beschrieben:

Die erste dieser drei Gruppen ist die Familie der sogenannten killer immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR), die hemmende, aber auch aktivierende Rezeptoren umfasst. Diese Rezeptoren interagieren mit den klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen HLA-A, -B und -C (Lanier, 1998; Biassoni et al, 1995; Gumperz et al., 1997; Winter et al., 1998; Allan DS et al., 1999), sowie mit dem nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Molekül HLA-G (Rajagopalan und Long, 1999). Inhibitorische KIRs wirken über eine Hemmung der Zytokinproduktion der Zielzelle (Moretta et al., 1995), sowie über eine gestörte Lyse durch die NK-Zelle aufgrund der Interaktion mit dem MHC-Molekül auf der Oberfläche der Zielzelle (Moretta und Moretta, 1997).

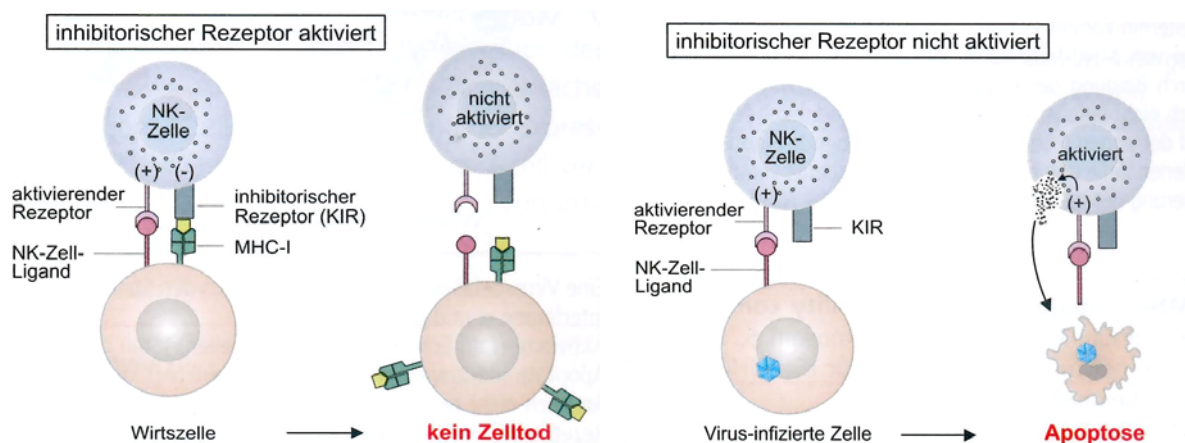


Abbildung 1: links: Ein inhibitorischer Rezeptor (KIR) erkennt MHC-I-Moleküle und gewährleistet durch seine Aktivierung, dass die NK-Zelle sich nicht gegen die körpereigene Zelle richtet. rechts: NK-Zellen werden durch infizierte Zellen mit verringerter MHC-I-Expression aktiviert (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

Die zweite Gruppe der inhibierenden NKRs sind die sogenannten immunglobulin-like-Transkripte (ILT), von denen nur eins, ILT2, auf NK-Zellen nachzuweisen ist (Colonna et al., 1997; Cosman et al., 1997). Auch diese Rezeptoren binden an MHC-Klasse-I-Moleküle (Colonna et al., 1997, Cosman et al., 1997). Interessanterweise ist das Zytomegalievirus (CMV) in der Lage, ein dem MHC-Klasse-I-Molekül homologes Protein zu synthetisieren (Cosman et al., 1997), das mit ILT2 interagiert (Cosman et al., 1997; Vitale et al., 1999) und so den Angriff durch NK-Zellen verhindert.

Die dritte Gruppe, die C-Typ-Lektin-Rezeptoren, ist für die vorliegende Doktorarbeit von besonderem Interesse. Auch in dieser Gruppe finden sich aktivierende (NKG2C, NKG2D) und inhibierende (NKG2A) Rezeptoren. Bis auf NKG2D sind alle bisher bekannten Mitglieder dieser Rezeptorfamilie kovalent mit CD94 assoziiert (Lazetic et al., 1996; Brooks et al., 1997; Carretero et al., 1997; Bellon et al., 1999). Sowohl der inhibierende Rezeptor NKG2A, als auch der aktivierende Rezeptor NKG2C erkennen spezifisch das nicht-klassische MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E (Borrego et al., 1998; Braud et al., 1998; Lee et al., 1998).

Rezeptoren, die NK-Zellen aktivieren, sind besonders die „natural cytotoxicity“ Rezeptoren NKp46, NKp30 und NKp44 (Moretta et al., 2000). Der Ligand dieser NK-Zell-Rezeptoren konnte bisher noch nicht identifiziert werden (Moretta et al., 2001). Es konnte aber gezeigt werden, dass die zytolytische Aktivität der NK-Zellen mit der Dichte an NKRs auf der Zelloberfläche korreliert (Sivori et al., 1999; Biron et al., 1999).

Interessanterweise finden sich NK-Zell-Rezeptoren auch auf CD8⁺ T-Lymphozyten. Auf diesen Zellen haben sie die Aufgabe einer Regulation der T-Zell-Antwort. Neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Komplex aus Peptid und MHC-Klasse-I-Molekül benötigen Zytotoxische T-Lymphozyten zur Aktivierung auch ein Signal von NK-Zell-Rezeptoren wie CD94/NKG2A/C und NKG2D (Lanier et al., 2001; Jabri et al., 2002; Moser et al., 2002; Braud et al., 2003).

Das Hepatitis C-Virus hat vielfältige Mechanismen entwickelt, um der NK-Zell-vermittelten Immunantwort zu entgehen. So konnte gezeigt werden, dass die Kreuzvernetzung des Tetraspanins CD81 auf NK-Zellen durch Bindung des HCV-Hüllproteins HCV E2 zu einer Hemmung der Zytotoxizität sowie einer Veränderung der Zytokinsekretion führt (Nattermann et al., 2005a).

Zudem ist die chronische Hepatitis C mit einer gestörten Expression von NK-Zell-Rezeptoren assoziiert, wobei eine Hochregulation des hemmenden NKG2A-Rezeptors bei gleichzeitiger

Verminderung aktivierender Rezeptoren (NKG2C, NKp30 und NKp46) beobachtet wurde (Nattermann et al., 2006). Diese veränderte Expression von Rezeptoren korrelierte mit verminderter zytotoxischer Aktivität in funktionellen Assays. Bezüglich des NKG2A-Rezeptors ist hierbei noch anzumerken, dass auch der korrespondierende Ligand, das nicht-klassische MHC-I-Molekül HLA-E, in Lebern von HCV-infizierten Patienten verstärkt exprimiert wird (Nattermann et al., 2005a). Funktionelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass dabei nicht nur die zytolytische Aktivität der NK-Zellen gehemmt wird, sondern auch ein verändertes Zytokinprofil mit einer deutlich erhöhten Sekretion von IL-10 und TGF- β zu beobachten ist. Zudem war der "Cross-Talk" zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen gestört, was zu einer verminderten Generierung T_H1-polarisierter CD4⁺ T-Zellen führte.

Neben ihrer zytotoxischen Aktivität haben NK-Zellen auch eine wichtige immunmodulierende Funktion, wodurch sie ein zentrales Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen. Sie produzieren verschiedene Zytokine, die von großer Bedeutung sind, da sie einen Einfluss auf das Verhalten anderer Immunzellen haben können (siehe Abschnitt 1.2.1.2).

1.2.1.2 Zytokine

Zytokine sind Proteine, die von immunologischen Zellen gebildet werden und dem Immunsystem als Botenstoffe dienen. Durch sie wird die Abwehr von Krankheitserregern koordiniert. Sie wirken als Wachstumsfaktoren, aktivieren oder deaktivieren Zellen und dienen als Schutz vor Gewebeschädigung.

Die Produktion von Zytokinen durch NK-Zellen ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Sowohl im Falle von bakteriellen, als auch im Falle von viralen Infektionen hat die Produktion von IFN- γ für die suffiziente Infektionsbekämpfung eine zentrale Bedeutung (Byrne et al., 2004; Orange et al., 1995; Orange und Biron, 1996a). Für diese Reaktion ist eine frühzeitig im Rahmen der Infektion eintretende IL-12-Bildung durch andere Immunzellen entscheidend. Auch die für die Entwicklung einer Immunantwort wichtigen Zytokine TNF- α und TGF- β werden von NK-Zellen gebildet (Perussia, 1996). Darüber hinaus kommt es auch zur Bildung anderer Zytokine, die für die vorliegende Arbeit von geringerem Interesse sind, wie etwa den hämatopoetischen Wachstumsfaktor GM-CSF und IL-3.

Von T-Zellen gebildete Zytokine entscheiden über den weiteren Verlauf einer Immunantwort und somit auch über den Verlauf einer Infektionserkrankung. CD4 positive T-Helferzellen werden durch Antigenkontakt dazu angeregt, Zytokine zu bilden, die eine Immunantwort unterstützen.

Sie werden aufgrund ihrer Produktion unterschiedlicher Zytokine in T-Helferzellen der Klassen 0, 1 und 2 (T_H0 -, T_H1 - und T_H2 - Zellen) unterteilt (siehe Abb. 2). Dies ist von Interesse, da die Produktion der T_H1 - bzw. T_H2 -typischen Zytokine für eine unterschiedliche Ausprägung der Immunantwort spricht. T-Helferzellen der Klasse 1 (T_H1 -Zellen) produzieren Zytokine, die Entzündungsreaktionen und die zelluläre Immunantwort unterstützen. Sie aktivieren Makrophagen und vermitteln so eine Reaktion gegen intrazelluläre Krankheitserreger. Sie unterstützen außerdem CD8 positive Zytotoxische T-Lymphozyten. Bei den von T_H1 -Zellen freigesetzten Zytokinen handelt es sich hauptsächlich um Interleukin 2 (IL-2), Interferon γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α), wobei vor allem IFN- γ für die Aktivierung der Makrophagen zuständig ist (Kanto, Hayashi, 2006; Allan PM et al., 1997). Reduzierte Nachweisbarkeit dieser Zytokine weist also auf eine reduzierte T_H1 -Antwort hin. Interferon γ kann außerdem die T_H2 -Antwort inhibieren.

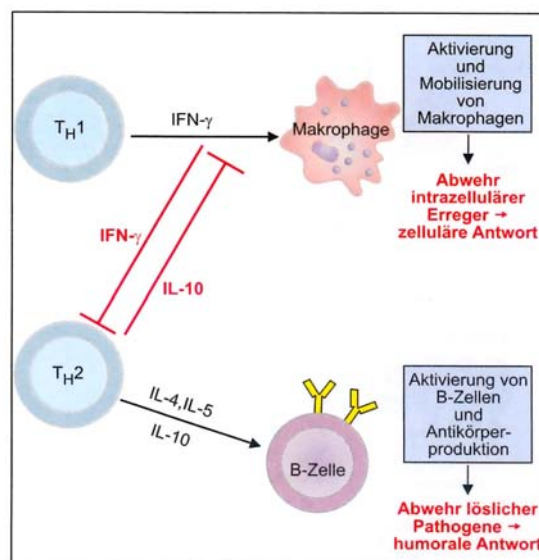


Abbildung 2: Untergruppen der CD4-positiven T-Zellen und deren Funktionen (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

T_H2 -Zellen produzieren, analog zu T_H1 -Zellen, ebenfalls Zytokine. Grundsätzlich sind diese Zytokine eher entzündungshemmend, wirken also unter Umständen gewebeschonend, da sie den sogenannten „bystander killing“-Effekt (siehe Kapitel 1.2.2.2) verhindern, andererseits können sie auch die Chronifizierung einer Infektion unterstützen. Bei diesen Zytokinen handelt es sich besonders um IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Sie stimulieren außerdem die B-Zellproliferation und damit die Antikörperbildung (Kanto, Hayashi, 2006; Allan PM et al., 1997). IL-10 ist außerdem in der Lage, die T_H1 -Antwort zu inhibieren.

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Die spezifische oder adaptive Immunabwehr, früher auch „erworbenes Immunsystem“ genannt, zeichnet sich durch ihre Anpassungsfähigkeit gegenüber Krankheitserregern aus. Im Rahmen dieser Anpassung sind die Zellen der adaptiven Immunabwehr in der Lage, spezifische pathogene Antigene zu erkennen und gezielt zelluläre und molekulare Abwehrmechanismen zu bilden. Neben Antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Dendritischen Zellen, stellen die Lymphozyten die wesentlichen Effektorzellen der adaptiven Immunität dar. Hierbei gewährleisten die T-Lymphozyten die zellvermittelte Immunantwort und unterstützen die B-Lymphozyten, die für die Bildung Antigen-spezifischer Antikörper (humorale Immunität) verantwortlich sind. Nach der Infektion bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, um bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger binnen kurzer Zeit eine angemessene Abwehrreaktion zu ermöglichen.

1.2.2.1 Die zelluläre Immunantwort

Virus-spezifische T-Lymphozyten sind ein wesentlicher Teil der antiviralen Immunreaktion. Dabei sind MHC-I-restringierte CD8⁺ T-Zellen für die Zerstörung virusinfizierter Zellen zuständig, während MHC-II-restringierte CD4⁺ T-Lymphozyten immunregulatorische Funktionen ausüben. Eine schematische Darstellung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten findet sich in Abbildung 3.

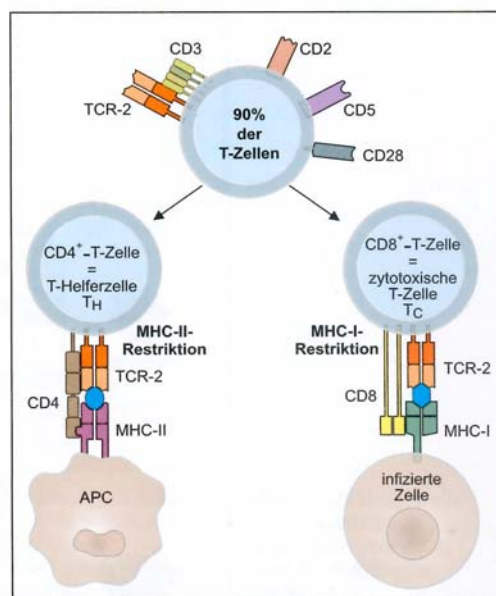


Abbildung 3: Unterteilung der T-Lymphozyten aufgrund von Oberflächenmarkern (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

1.2.2.2 Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)

T-Zellen erkennen kurze Peptide als Antigene, die ihnen in der Bindung an MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzelle dargeboten werden. CD8⁺ Zellen erkennen dabei Peptide, die durch Proteasomen aus dem ursprünglichen viralen Polyprotein geschnitten werden. Über spezifische Transporter gelangen diese Viruspeptide in der Bindung an MHC-Moleküle der Klasse I an die Zelloberfläche. Die Erkennung dieser MHC-Peptid-Komplexe durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) führt zur Aktivierung der CD8⁺ Zellen. Dies hat die Lyse der infizierten Zelle durch Apoptoseeinleitung zur Folge. Die Apoptose wird hierbei auf drei verschiedenen Wegen eingeleitet.

Das erste Prinzip beruht auf einer kalziumabhängigen, gerichteten Freisetzung zytotoxischer Mediatoren (Zytotoxine) aus in den CTL gespeicherten Granula. Es handelt sich dabei um Perforin, das Poren in der Zielzellmembran bildet, sowie um zytotoxische Serinproteasen wie Granzym A, welche die Apoptose einleiten.

Ein zweiter Weg der Apoptoseinduktion durch CTL beinhaltet das FAS-System. Hierbei wird ein Rezeptor stimuliert, der zur Aktivierung sogenannter Caspasen führt, die den Abbau zellulärer Strukturen einleiten (Nicholson et al., 1995).

Außerdem gibt es einen dritten Mechanismus zur Zerstörung infizierter Zellen, der für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist. Dabei werden zytotoxische Zytokine, insbesondere TNF- α , TNF- β und IFN- γ freigesetzt. IFN- γ kann dabei direkt die virale Replikation hemmen und eine gesteigerte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und Peptidtransportern auf der Oberfläche infizierter Zellen induzieren. So kann die Möglichkeit eines Angriffs durch CTL erhöht werden. Außerdem kann IFN- γ wie oben bereits erwähnt eine Makrophagenaktivierung induzieren. Die Sezernierung von TNF- α kann auch zu einer Gewebsschädigung in der Umgebung infizierter Zellen führen. Dieser sogenannte „bystander killing“-Effekt ist möglicherweise bei der HCV-Infektion von großer Bedeutung, da er vermutlich zur fortschreitenden Gewebsschädigung und der chronischen Leberzellentzündung beiträgt, die schließlich zur Leberzirrhose führen können (Ando et al., 1997).

Demnach spielen also CD8⁺ Zellen im Rahmen der adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle für die Elimination von Viren sowie für die Erkennung intrazellulärer Veränderungen. Durch einen Defekt der CD8⁺ Zellen könnte es auch zu einer Viruspersistenz im Organismus kommen, was bei der Hepatitis C Infektion bedingt durch eine Induktion von NKG2A auf CD8⁺ Zellen

eine entscheidende Rolle spielen könnte (Jabri et al., 2002; Moser et al., 2002). Darüber hinaus wäre auch denkbar, dass die über NKG2A vermittelte Veränderung der Zytokinausschüttung durch die NK-Zellen einen starken Einfluss auf die Funktion der CD8 positiven T-Zellen ausübt.

1.3 MHC-Moleküle

Bei den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) handelt es sich um Glykoproteine, die auch als HLA (Human Leukocyte Antigen) bezeichnet werden, da sie zuerst auf Leukozyten entdeckt wurden. Die Hauptaufgabe der MHC-Moleküle besteht darin, Peptidfragmente fremder Proteine an die Zelloberfläche zu transportieren. Dort können die Komplexe aus Peptidfragment und MHC-Molekül CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten präsentiert werden. Die Lymphozyten erkennen diese Komplexe ihrerseits über den T-Zell-Rezeptor. Der Komplex aus MHC-Molekül, Peptid und TCR vermittelt das zentrale Signal, das zur Aktivierung der T-Zelle nötig ist.

Man unterscheidet zwei verschiedene Klassen: MHC-Moleküle der Klasse I und MHC-Moleküle der Klasse II. Zur Klasse I gehören die klassischen HLA-Moleküle HLA-A, -B und -C, sowie die nicht klassischen HLA-Moleküle HLA-E, -F und -G. Die MHC-Moleküle der Klasse II werden eingeteilt in HLA-DP, -DQ und -DR (Bodmer et al., 1994). In ihrer Struktur sind sich beide Klassen der MHC-Moleküle sehr ähnlich. Beide sind mit dem C-terminalen Ende in der Zellmembran der exprimierenden Zelle verankert, während sie im N-terminalen Bereich eine peptidbindende Furche bilden, die die fremden Antigenfragmente bindet. Die beiden Klassen der MHC-Moleküle unterscheiden sich hauptsächlich in der Art der Peptide, die sie aufnehmen können und in der Weise, in der diese an die Zelloberfläche transportiert werden.

1.3.1 MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-Klasse-I-Moleküle sind hochpolymorph und bestehen aus zwei Ketten, einer schweren α -Kette mit drei Domänen (α_1 , α_2 und α_3) und dem leichten, nicht kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin (Klein, 1986). Der wichtigste Teil des Moleküls sind die α_1 - und die α_2 -Domäne, die an der Moleküloberfläche so zusammengelagert sind, dass sie die Peptidbindende Furche bilden (siehe Abb. 4). In dieser werden kleinere Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren (AS) gebunden (Schumacher et al, 1991; Rammensee et al., 1993), während die MHC-II-Moleküle Peptide mit einer von 10-30 AS variierenden Länge binden können (Rudensky et al., 1991; Brown et al., 1993).

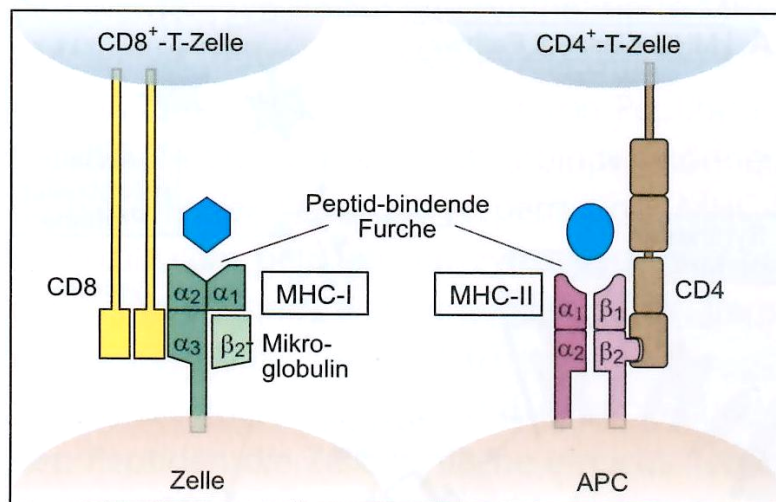


Abbildung 4: Struktur von MHC-I- und MHC-II-Molekülen (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

Im Gegensatz zu MHC-II-Molekülen, die nur von APCs (= antigenpräsentierende Zellen, besonders Makrophagen und B-Lymphozyten) exprimiert werden können, exprimieren alle kernhaltigen Zellen MHC-Moleküle der Klasse I. Dabei werden von den MHC-I-Molekülen Peptide von Proteinen gebunden, die im Zytosol der Zelle synthetisiert wurden (endogene Antigene). Bei diesen handelt es sich besonders um Fragmente viraler Proteine, aber auch um Peptide von Tumorproteinen und intrazellulären Bakterien.

Virale Proteine werden in den Proteasomen der Zelle in Peptide gespalten (Goldberg und Rock, 1992). Diese im Proteasom entstandenen Proteinfragmente werden mittels eines spezifischen, ATP-abhängigen Transportsystems, der sogenannten TAP-Moleküle (transporter associated with antigen processing) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert (Townsend et al., 1989; Shepherd et al., 1993). Im ER treffen die Proteinfragmente auf neu synthetisierte MHC-Moleküle, die mit dem Peptid beladen und in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert werden. An der Zelloberfläche kann der Komplex aus MHC-Molekül und Peptid von CD8 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden (Zinkernagel und Doherty 1979; Germain et al., 1986) (siehe Abb. 5). Dieser Erkennungsmechanismus versetzt die CTL in die Lage, theoretisch alle virusinfizierten Zellen erkennen und durch die weiter oben beschriebenen Mechanismen töten zu können.

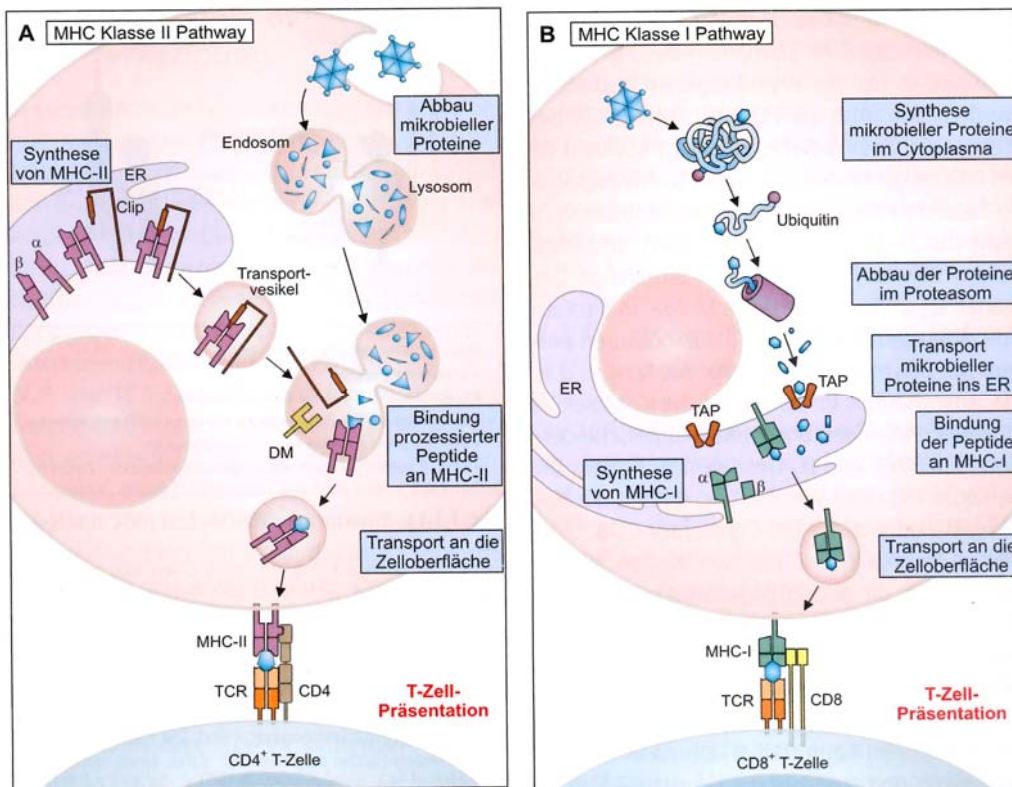


Abbildung 5: Prozessierung von Protein-Antigenen, MHC-I- und MHC-II-Pathway (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

Darüber hinaus spielen MHC-Klasse-I-Moleküle eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren. Wie bereits oben beschrieben, besagt die sogenannte „missing self“-Hypothese (Ljunggren und Karre, 1990), dass Zellen, die einen ausreichenden Besatz an MHC-I-Molekülen exprimieren, von NK-Zellen über hemmende Rezeptoren als autolog und gesund erkannt werden. Virusinfizierte Zellen exprimieren in der Regel weniger MHC-I-Moleküle, was zu einer Des-Inhibierung der NK-Zelle führt, die dann infizierte Zellen über die oben beschriebenen Mechanismen lysieren kann. Interessanterweise gelingt es manchen Viren, dieser Lyse durch die NK-Zellen zu entgehen. Für das humane Zytomegalievirus (HCMV) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es durch die Produkte zweier Gene (US2 und US11) zwar zu einer verminderten Expression mancher MHC-I-Moleküle kommt, dass aber die Expression von HLA-C nicht vermindert wird und die Zelle so vor der Lyse durch NK-Zellen geschützt wird.

Ein weiterer Mechanismus, durch den Viren der NK-Zell-abhängigen Lyse entgehen, wurde von Cosman und Mitarbeitern beschrieben. Dabei kodiert HCMV für das sogenannte gpUL18, ein MHC-I-Homolog, das über eine Bindung an den inhibierenden NK-Zell-Rezeptor ILT2 die Lyse

der infizierten Zelle verhindert (Cosman et al., 1997). Für die vorliegende Doktorarbeit ist diese Möglichkeit von besonderem Interesse, da ein ähnlicher Mechanismus auch beim Hepatitis C Virus vermutet wird.

1.3.2 HLA-E und weitere nicht-klassische MHC-I-Moleküle

Wie oben bereits erwähnt, besteht die Familie der MHC-I-Moleküle nicht nur aus den klassischen, sondern auch aus den nicht klassischen MHC-I-Molekülen. Bei diesen Molekülen handelt es sich um HLA-E, -F und -G, die im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen nur wenig polymorph sind. Die für diese Arbeit nicht relevanten Moleküle HLA-F und HLA-G werden hier nicht näher beschrieben. HLA-E und seine Bedeutung im Verlauf der Hepatitis C dagegen ist für diese Promotionsarbeit von besonderer Bedeutung und wird deswegen im Folgenden näher charakterisiert.

Die Oberflächenexpression von HLA-E ist abhängig von der Bindung spezifischer Peptide, die aus der Signalsequenz klassischer MHC-Klasse-I-Moleküle oder aber aus der Sequenz des nicht-klassischen HLA-G stammen (Braud et al., 1997). Der Beladung von HLA-E mit Peptiden erfolgt TAP-abhängig (Braud et al., 1998) wie oben allgemein für MHC-I-Moleküle beschrieben. Dann werden die beladenen MHC-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert. An der Zelloberfläche werden die durch Peptid stabilisierten Komplexe dann durch die hemmenden und aktivierenden NKG2-Rezeptoren von NK-Zellen erkannt. Auf diese Weise kann die Aktivität von NK-Zellen über HLA-E-gebundene Klasse-I-Peptide reguliert werden. CD94/NKG2A interagiert spezifisch mit HLA-E (Braud et al., 1998; Lee et al., 1998) und induziert die Hemmung der lytischen Funktion von NK-Zellen.

Eine Stabilisierung von HLA-E ist für verschiedene Krankheitserreger beschrieben worden. Dieser Mechanismus wurde erstmalig bei HCMV nachgewiesen. Das virale Peptid gpUL18 führt dabei zu einer verstärkten Expression von HLA-E an der Zelloberfläche, was zu einem Schutz der infizierten Zelle vor NK-Zell-vermittelter Lyse führt (Tomasec et al., 2000; Ulbrecht et al., 2000). Dieser Effekt wird über CD94/NKG2A vermittelt (Ulbrecht et al., 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Peptid des HI-Virus (HIV p24 aa14-22) die Oberflächenexpression von HLA-E stabilisieren kann (Nattermann et al., 2005b). Für die vorliegende Doktorarbeit besonders interessant ist, dass auch HCV ein Peptid (HCV Core_{aa35-44}) kodiert, welches zu einer verstärkten Oberflächenexpression von HLA-E führt und so die lytische Funktion der NK-Zellen hemmen kann (Nattermann et al., 2005a).

Darüber hinaus ist eine Interaktion von HLA-E mit NKR auf CD8 positiven Zytotoxischen T-Lymphozyten bekannt (Pietra et al., 2001; Garcia et al., 2002). Zusätzlich können CD8+ T-Lymphozyten HLA-E über den TCR erkennen (Pietra et al., 2001; Garcia et al., 2002; Barakonyi et al., 2002). Die Expression von NKG2A auf CTL könnte dabei die Schwelle für die Aktivierung der Zelle durch den TCR erhöhen (Le Drean et al., 1998) und als Mechanismus für Selbsttoleranz wirken (Braud et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde auch die Unfähigkeit von CTL, virusinduzierte Tumoren zu kontrollieren, auf die erhöhte Expression von CD94/NKG2A auf den T-Zellen zurückgeführt (Moser et al., 2002).

Eine vorzeitige Inhibition der antiviralen CTL-Antwort durch Induktion von NKG2A ist wahrscheinlich ein Mechanismus, der dazu führt, dass Viren vom Immunsystem nicht eliminiert werden können und es zu einer Viruspersistenz kommt (Jabri et al., 2002; Moser et al., 2002). Dieser Mechanismus könnte auch für die HCV-Infektion, die häufig chronisch verläuft, von Bedeutung sein.

1.5 Fragestellung

Für die vorliegende Doktorarbeit sollte untersucht werden, wie CD8 positive T-Lymphozyten durch die Interaktion von HLA-E mit NKG2A beeinflusst werden. Dabei stand die Frage im Mittelpunkt, ob es im Verlauf der Hepatitis C Infektion zu einer Hemmung der Immunantwort durch die CTL kommt. Hierfür waren prinzipiell zwei Szenarien denkbar: 1.) Im Laufe der chronischen Hepatitis C Infektion kommt es zu einer Stabilisierung des nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Moleküls HLA-E an der Oberfläche der virusinfizierten Zellen. In Verbindung mit einer verstärkten Expression des Komplexes aus CD94 und NKG2A an der Zelloberfläche könnte dies zu einer direkten Hemmung der CTL führen. 2.) Es wäre auch denkbar, dass die Hemmung der Immunantwort durch die CD8 positiven T-Lymphozyten nicht direkt über CD94/NKG2A, sondern indirekt über NK-Zellen gesteuert wird. NK-Zellen sezernieren Zytokine, die wiederum CTL aktivieren oder inhibieren können. Die Zytokine TNF- α und IFN- γ stimulieren dabei die Zytotoxischen T-Lymphozyten, während IL-6 und IL-10 die CTL hemmen. Eine durch eine chronische Hepatitis C Infektion hervorgerufene Interaktion von HLA-E mit CD94/NKG2A auf der Oberfläche der NK-Zellen könnte somit zu einer Änderung der Zytokinsekretion führen. Eine solche Änderung der Zytokinproduktion durch die NK-Zellen hätte damit auch Einfluss auf die Aktivierung oder Inhibition der Zytotoxischen T-Lymphozyten, analog des von Jinushi und Mitarbeitern gezeigten Mechanismus einer Verhinderung der Aktivierung Dendritischer Zellen,

die über die CD94/NKG2A-vermittelte veränderte Zytokinsekretion der NK-Zellen zustande kommt (Jinushi et al., 2004).

Zur Beantwortung der Frage, welcher dieser beiden Wege die Immunantwort durch die CTL hemmt, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, wobei nacheinander folgende Fragen beantwortet werden sollten:

1.) Gibt es einen Unterschied in der quantitativen Expression von NKG2A auf der Oberfläche von CD8 positiven T-Lymphozyten gesunder und HCV-positiver Patienten und welche funktionellen Auswirkungen hätte eine solche Expressionsänderung auf die Zytotoxizität der CD8+ Zellen? Diese Fragen sollten mittels durchflusszytometrischer Analyse und Re-directed Lysis Assay beantwortet werden.

2.) Welche funktionelle Auswirkung hat die Interaktion von HLA-E und NKG2A bei HCV-Infektion auf die NK-Zellen? Auch hier wurde der Re-directed Lysis Assay benutzt.

3.) Welche Konsequenz hat die P18-induzierten Stabilisierung der HLA-E Expression auf die Zytotoxizität von CD8 positiven T-Zellen? Zur Beantwortung dieser Frage wurde zur direkten Messung der Zytotoxizität der ⁵¹Chrom-Release-Assay benutzt.

4.) Um die durch die Hepatitis C Infektion veränderte Zytokinsekretion durch die NK-Zellen zu untersuchen, wurden die intrazelluläre Zytokinanalyse und der ELISA (*engl.*: Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay; Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionsassay) benutzt.

5.) Welchen Einfluss könnte eine derart veränderte Zytokinsekretion auf Phänotyp, Funktion und Zytotoxizität der CTL haben? Hierzu wurde die Expression der Migrationsmarker CCR5 und CCR7, sowie der Aktivierungsmarker CD69 und CD80 auf den CTL, sowie die Oberflächenaktivität des Zytotoxizitätsmarkers CD107a mittels FACS-Analyse untersucht.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen und ihre Bedeutung für die Hepatitis C Infektion sollen in den nun folgenden Abschnitten dargestellt werden.

2. Materialien

2.1 Allgemeine Reagenzien

- **Ampuwa**, steriles pyrogenfreies Aqua ad iniectabilia
Firma: Fresenius AG, Bad Homburg
- **Cell Fix Fixierungslösung**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **FCS**, fetales Kälberserum
Firma: Biochrom AG, Berlin
- **PBS (pH 7,4)**, Phosphatpuffer
Firma: Apotheke des Universitätsklinikums Bonn
- **Penicillin/Streptomycin**
Firma: PAA, Cölbe
- **RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin**
Firma: PAA, Cölbe
- **Cell Fix Fixierungslösung**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg

2.2 Reagenzien für die Separation peripherer Blutlymphozyten und Zellkultur

- **Ficolltrennlösung ($D=1,077\text{g/cm}^3$)**
Firma: PAA Laboratories, Pasching, Österreich
- **BSA**
Firma: Sigma, Deisenhofen
- **EDTA-Lösung (0,5 M)**
Firma: Sigma, Deisenhofen
- **CD8 Positiv Isolationskit**
Firma: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
- **NK-Zell Negativ Isolationskit**
Firma: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
- **MACS-Puffer:**
500ml PBS

50ml FCS

2,5g BSA

2ml EDTA 0,5M

→ über Sterilisationsfilter filtern

- **Lymphozyten-Medium:**

250ml RPMI-Medium (mit L-Glutamin)

25ml FCS (oder ohne FCS)

2,5ml Penicillin/Streptomycin

→ über Sterilisationsfilter filtern

2.3 Peptide

- **HCV Core_{aa35-44}**

Firma: EMC, Tübingen

- **Cw03**

Firma: EMC, Tübingen

2.4 Reagenz zur Zellzahlbestimmung

- **Tryptanblau-Lösung**

Firma: Merck, Darmstadt

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

- **Brefeldin A**

Firma: Sigma, Deisenhofen

- **FACS Permeabilization Solution II**

Firma: BD Biosciences, Heidelberg

- **OKT**

Firma: Janssen-Cilag, Neuss

2.5.2 Antikörper für die FACS-Analyse

- **Anti-human-CD3 PerCP**

Firma: BD Biosciences, Heidelberg

- **Anti-human-CD56 FITC**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-TNF- α APC**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-IL-10 PE**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-CD8 PerCP**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-CD3 APC**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-CD69 PE**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-CD107a FITC**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-CD80 PE**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-CCR5 APC**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-CCR7 FITC**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg
- **Anti-human-NKG2A PE**
Firma: BD Biosciences, Heidelberg

2.6 Reagenzien für ^{51}Cr Chrom Freisetzungssassay

- **Triton X-100**
Firma: Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- **$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$: 185 MBq**
Firma: Hartmann Analytic, Braunschweig

2.7 Kits für die ELISAs

- **Human TNF- α ELISA**

Firma: Diaclone, Besançon, Frankreich

- **Human IL-6 ELISA**

Firma: Diaclone, Besançon, Frankreich

- **Human IL-10 ELISA**

Firma: Diaclone, Besançon, Frankreich

2.8 Sonstige Labormaterialien

- **S-Monovette für EDTA-Blut (10ml)**

Firma: Sarstedt, Nümbrecht

- **S-Monovette für heparinisiertes Blut (10ml)**

Firma: Sarstedt, Nümbrecht

- **Polypropylen-Röhrchen, (15 und 50ml)**

Firma: BD Biosciences, Heidelberg

- **Polystyren-FACS-Röhrchen, 6ml**

Firma: Falcon / Becton Dickinson, Heidelberg

- **Mikrotiterplatten, 6- und 96-well**

Firma: Greiner bio-one, Frickenhausen

- **Auslaufpipetten, 5 und 10ml, wattiert, einzeln verpackt**

Firma: BD Biosciences, Heidelberg

- **Einweg-Pipettenspritzen, 10-200 µl, 200-1000 µl**

Firma: Greiner bio-one, Frickenhausen

- **Einweg-Pipettenspitzen, 10µl**

Firma: Greiner bio-one, Frickenhausen

- **Einmal-Pipetten für Multipipette, 100µl**

Firma: Eppendorf, Hamburg

- **Einweg-Handschuhe**

Firma: Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien

- **Eppendorf-Cups, 2ml**

Firma: Eppendorf, Hamburg

- **Einmalfiltrationsgeräte, 250ml, Nalgene**

Firma: Nalge Nunc International, Wiesbaden

- **Filterflaschen**, 250ml, Nalgene
Firma: Nalge Nunc International, Wiesbaden
- **Neubauer-Zählkammer**
Firma: Brand, Wertheim
- **Zellkulturflaschen**, 50ml, 250ml, mit Schräghals, strahlensterilisiert
Firma: Greiner bio-one, Frickenhausen
- **Pasteur-Absaugpipetten**, Glas, für Einmalgebrauch, Länge 150mm
Firma: Brand, Wertheim
- **MACS-Separationsröhrchen**, Größe MS, einzeln verpackt
Firma: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
- **MACS-Auffangröhrchen**
Firma: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.9 Laborgeräte

- **Durchflusszytometer FACS Calibur, mit Cell Quest Pro Software**
Firma: Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA
- **Sterilbank**: Typ BSB4A
Firma: Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
- **Brutschrank**, Modell 3111
Firma: Life Sciences Int., Frankfurt
- **Plattenschüttler**, Typ MTS 2
Firma: Janke und Kunkel IKA – Labortechnik, Staufen
- **Invers – Lichtmikroskop**, Typ DM IL
Firma: Leica, Wetzlar
- **Kühlzentrifuge**, GS-6KR
Firma: Beckman, München
- **ELISA-Reader**, Tecan Spectra Mini
Firma: TECAN/SLT, Crailheim
- **Vortex**, Vibrofix VF1
Firma: Janke und Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
- **Pipetten**, 0,5-10µl, 40-200µl, 200-1000µl

Firma: Eppendorf, Hamburg

- **Multipipette**, Multipette plus

Firma: Eppendorf, Hamburg

- **Pipettus**

Firma: Hirschmann

- **Feinwaage**, BP61

Firma: Sartorius, Göttingen

- **Kühlschrank**

Firma: Liebherr

- **MACS-Magnetplatte und Magneten**

Firma: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

- **Tiefkühlschrank**

Firma: Carrier

- **SPSS Software 12.0**

Firma: SPSS, Chicago, IL

3. Methoden

3.1 Probengewinnung

Insgesamt wurden 65 Patienten aus der Hepatologischen Spezialambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Bonn in die vorliegende Studie eingeschlossen.

Tabelle 1: Angaben zu den in die vorliegende Doktorarbeit einbezogenen Patienten und gesunden Probanden

	<u>HCV RNA positiv therapienaiv</u> (n = 21)	<u>HCV RNA positiv unter Therapie</u> (n = 40)	<u>Gesund (HCV RNA negativ)</u> (n = 15)
Alter	28 - 62 Jahre (Median: 42 Jahre)	23 – 67 Jahre (Median: 47 Jahre)	23 – 35 Jahre (Median: 27 Jahre)
Geschlecht	Weiblich: 6 Männlich: 15	Weiblich: 14 Männlich: 26	Weiblich: 6 Männlich: 9
<u>HCV-Daten</u>			-
HCV-Genotyp	Genotyp 1 : 1x Genotyp 1a: 5x Genotyp 1b: 5x Genotyp 2b: 2x Genotyp 3a: 4x Genotyp 2a/2c: 2x Genotyp 1/4e: 1x Genotyp 4c/4d: 1x	Genotyp 1: 2x Genotyp 1a: 7x Genotyp 1b: 17x Genotyp 2b: - Genotyp 3a: 10x Genotyp 2a/2c: 2x Genotyp 4: 1x Genotyp 1b/4a: 1x	-
Viruslast [Kopien/ml]	0 - >40.000.000 Median: 5.340.879	0 – 9.156.000 Median: 3499	-
γ GT [U/l]	12 - 415 Median: 53	20 - 595 Median: 38	-
GPT [U/l]	24 - 255 Median: 74	17 - 603 Median: 53	-
GOT [U/l]	20 - 137 Median: 47	18 - 597 Median: 34	-

Unter diesen Patienten befanden sich 21 therapienaive Patienten mit replikativer Hepatitis C Infektion. 40 Patienten befanden sich unter einer antiviralen Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon α und Ribavirin, bei 4 Patienten war der Behandlungsstatus nicht nachvollziehbar. Patienten wurden auch mehrfach untersucht, wenn sich ihre Viruslast, der Behandlungsstatus und die Werte der Leberenzyme verändert hatten. Die Viruslast in der Gruppe der Patienten unter Therapie variierte stark. Als Kontrollgruppe wurden 15 gesunde, Hepatitis C negative Personen untersucht (siehe Tabelle 1).

3.2 Zellisolierung

3.2.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten

Nach der Methode der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden periphere mononukleäre Blutzellen aus heparinisiertem Vollblut separiert (Böyum, 1968). Bei dieser Methode erfolgt die Trennung aufgrund der unterschiedlichen Größe, Dichte und Aggregationsfähigkeit der einzelnen Blutbestandteile. Ficoll ist ein synthetisches, stark verzweigtes Polymer aus Kohlenhydraten und Epichlorohydrin. Nach Überschichtung mit Vollblut und Zentrifugation kommt es zu einer Trennung der verschiedenen Blutbestandteile. Erythrozyten und Granulozyten bilden durch Ficoll Aggregate, die sich am Boden des Zentrifugenröhrchens absetzen. Lymphozyten und Monozyten können aufgrund ihres spezifischen Gewichts nicht in die Ficolltrennlösung eindringen. Sie setzen sich an der Phasengrenze zwischen Blut und Ficolltrennlösung als schmaler, milchiger Ring ab. Im Überstand sammeln sich Plasma und Thrombozyten. Die Separation der Lymphozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen (siehe Abb. 6).

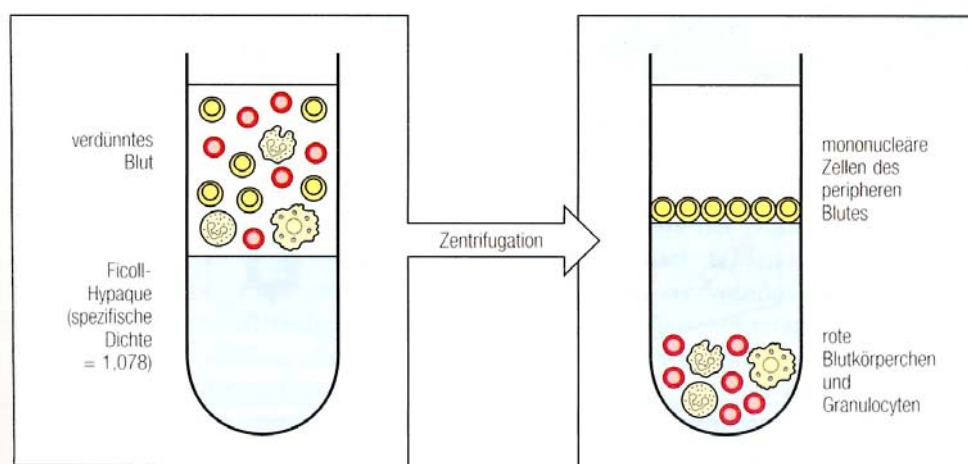


Abbildung 6: Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (nach Janeway und Travers, 1997)

Protokoll:

- 10 ml Ficolltrennlösung (D=1,077) in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen vorlegen
- vorsichtig mit verdünntem Vollblut überschichten
- zentrifugieren (20min, 2400U/min, ohne Bremse, bei Raumtemperatur)
- Lymphozytenring vorsichtig mit einer Pipette abnehmen, in neues Zentrifugenröhrchen überführen und mit PBS auffüllen
- zentrifugieren (10min, 1800U/min, bei Raumtemperatur)
- Überstand verwerfen
- Sediment in 30ml PBS resuspendieren
- zentrifugieren (10min, 1200U/min, bei Raumtemperatur)
- Waschschrift 2x wiederholen

3.2.2 Isolierung verschiedener Zellpopulationen mittels magnetischer Beads

Durch monoklonale Antikörper lassen sich Zellen anhand unterschiedlicher Oberflächenmarker trennen. Bei der immunomagnetischen Zellisolierung werden bestimmte Zellen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe von Magnetpartikeln separiert. Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Separationsprinzipien: die Positiv- und die Negativseparation. In beiden Fällen werden in einem ersten Schritt spezifische Antikörper verwendet, die gegen Oberflächenantigene der Zellen gerichtet sind. Die Zellen werden mit diesen spezifischen Antikörpern inkubiert. Dann werden in einem zweiten Schritt Sekundärantikörper gegen diese spezifischen Antikörper hinzugegeben. Diese Sekundärantikörper sind an magnetische Kleinstpartikel gekoppelt. So können die markierten Zellen mit Hilfe eines Magneten von den restlichen Zellen getrennt werden. Im Falle der Positivseparation richten sich die verwendeten Antikörper gegen die zu isolierende Zellpopulation, im Falle der Negativseparation hingegen richten sich die Antikörper gegen alle unerwünschten Zellen, die auf diese Weise aus dem Zellgemisch entfernt werden können. Der Vorteil der Positivseparation liegt darin, dass die separierte Zellpopulation meist sauberer ist. Die Negativseparation hingegen hat den Vorteil, dass keine bei nachfolgenden Experimenten störenden Antikörper auf der Zelloberfläche der separierten Zellen gebunden sind. So kann eine unbeabsichtigte Aktivierung der aufgereinigten Zellen verhindert werden. In der vorliegenden Dissertation wurden Negativ- (für NK-Zellen) und Positivisolationkits (für CD8 positive Zellen) der Firma BD verwendet (siehe Abb. 7).

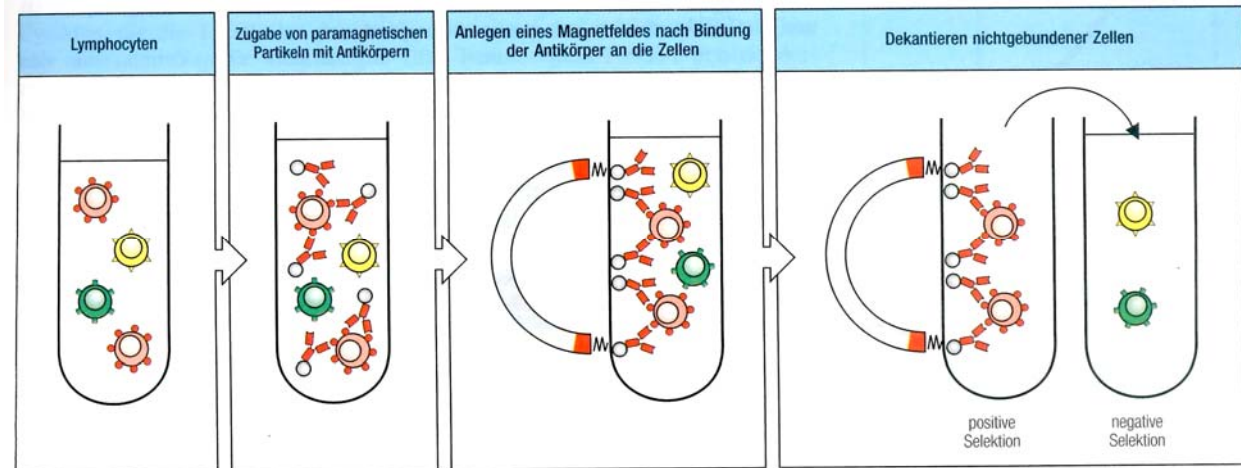


Abbildung 7: Prinzip der Isolation verschiedener Zellpopulationen mittels magnetischer Beads (nach Janeway und Travers, 1997)

Protokoll:

- Nach Isolierung peripherer Blutlymphozyten werden diese gezählt.
- 1×10^7 Zellen werden dann in $80 \mu\text{l}$ MACS-Puffer gelöst.
- dazu $10 \mu\text{l}$ pro 10^7 Zellen Biotin-Antikörper-Cocktail (für Negativseparation von NK-Zellen) bzw. $10 \mu\text{l}$ Biotin-Anti-CD8 pro 10^7 Zellen (für Positivseparation von CD8 positiven Lymphozyten)
- Gemisch 10min auf Eis inkubieren
- Dann $30 \mu\text{l}$ MACS-Puffer und $20 \mu\text{l}$ Anti-Biotin Microbeads (magnetische Kügelchen) pro 10^7 Zellen hinzugeben
- 15min auf Eis inkubieren
- 10-20fach mit MACS-Puffer waschen
- Zentrifugieren (10min, 1200U/min, bei Raumtemperatur)
- Überstand verwerfen
- In $50 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendieren
- MACS-Trennungsröhrchen (Größe MS) an Magnetfeld anbringen, 3x $300 \mu\text{l}$ MACS-Puffer durchlaufen lassen
- Zellen auf Röhrchen aufbringen (maximal 10^7 Zellen) und durchlaufen lassen
- 3x mit $300 \mu\text{l}$ MACS-Puffer waschen

- Bei Negativseparation sind die durchgelaufenen Zellen die erwünschten Zellen; Bei Positivseparation Röhrchen vom Magneten trennen, nochmals 500µl MACS-Puffer aufschichten und mittels mitgeliefertem Stempel Zellen in ein Auffangröhrchen befördern

3.3 Kultivierung von B5-Zielzellen

Bei der K-562 HLA-E^G Zelllinie (im Weiteren als B5-Zelllinie bezeichnet) handelt es sich um eine MHC-Klasse-I-defiziente Zelllinie, die stabil mit HLA-E transfiziert ist. Diese wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert in RPMI Kulturmedium (mit L-Glutamin) mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und G418. Das Medium wurde vor Gebrauch durch einen Sterilisationsfilter sterilisiert und im Kühlschrank (5°C) aufbewahrt. Das Wachstum der B5-Zellkultur wurde täglich mikroskopisch überprüft. Etwa alle drei Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums.

Die Stabilisierung von HLA-E an der Oberfläche der K-562-Zellen erfolgte durch die Inkubation mit dem Peptid HCV Core_{aa35-44} (im weiteren Verlauf der Arbeit als P18 bezeichnet). Bei diesem Peptid handelt es sich um ein zehn Aminosäuren langes Epitop des HCV Genotyp 1 Virus. Für dieses Peptid wurde von Nattermann und Mitarbeitern gezeigt, dass es die HLA-E-Expression auf der Zelloberfläche stabilisieren kann (Nattermann et al., 2005a).

3.4 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Die Anzahl der vitalen Zellen in einer Zellsuspension wurde durch Anfärben und späteres Auszählen bestimmt. Die Zellen wurden hierfür mit 0,25%iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (1000fache Vergrößerung) ausgezählt. Hierbei war darauf zu achten, dass sich nur das Zytoplasma toter Zellen mit dem Farbstoff anfärbt, da eine intakte Zellmembran eine Diffusion von Trypanblau ins Zellinnere verhindert. Somit konnte unter dem Mikroskop klar zwischen lebenden und toten Zellen differenziert werden.

Ein Kästchen der Zählkammer besitzt eine Fläche von 0,0625 mm². Die Zählkammer selbst besitzt eine Tiefe von 0,1mm. Somit beläuft sich das Volumen eines Kästchens auf 0,00625 mm³. Das Volumen von 16 Kästchen beträgt also 0,1 mm³. Für die Ermittlung vitaler Zellen pro 1ml ergab sich also folgende Formel:

Anzahl der vitalen Zellen in 16 Kästchen x 2 (da Verdünnung 1:2) x 10⁴ (Multiplikationsfaktor für die Umrechnung auf einen ml) = Zellzahl pro ml

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Allgemeine Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting), ein Computer-unterstütztes laseroptisches Messsystem, basiert auf dem Prinzip der Messung und Analyse unterschiedlicher Eigenschaften einer fluoreszenzmarkierten Zelle. Diese Zelle passiert in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl. Jede Zelle interagiert dabei mit dem Laserlicht. Photodetektoren messen die so hervorgerufene Lichtstreuung. Die Streuung wird beeinflusst durch verschiedene zellbiologische Parameter wie Zellgröße, Faltung der Zellmembran, Zellkern und Granularität. Außerdem ist es möglich, zwischen lebenden und toten Zellen, sowie Zelltrümmern zu differenzieren. Tote Zellen erscheinen hierbei kleiner als vitale Zellen. So können Blutzellen aufgetrennt und quantifiziert werden. Es wird dadurch möglich, nur eine spezifische Zellpopulationen für eine Analyse zu benutzen.

Darüber hinaus können Zelloberflächenantigene und intrazelluläre Strukturen durch Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Die Lichtenergie des Laserstrahls wird von fluoreszierenden Verbindungen über einen für jedes Fluorochrom spezifischen Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum) absorbiert. Dabei werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben und emittieren beim Zurückfallen in den Grundzustand ein Photon. Diese Lichtemission nennt man Fluoreszenz. Sie kann im Durchflusszytometer als charakteristisches Emissionsspektrum des jeweiligen Farbstoffs gemessen werden. Häufig eingesetzte Farbstoffe sind dabei APC (Allophycocyanin), FITC (Fluorescein Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und PerCP (Peridin-Chlorophyll-a-Protein). Alle vier Farbstoffe wurden in der vorliegenden Dissertation verwendet.

Man unterscheidet zwischen direkter und indirekter Fluoreszenzfärbung. Bei der direkten Fluoreszenzfärbung ist der gegen die Oberflächenmoleküle gerichtete Antikörper direkt mit einem Fluorophor konjugiert. Bei der indirekten Fluoreszenzfärbung bindet ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper an den ersten, spezifischen Antikörper. Für die vorliegende Dissertation wurde die direkte Fluoreszenzfärbung verwendet.

Die mit Fluorochromen gefärbte Zellsuspension wird aus dem Trägerröhrchen mit Überdruck durch eine Düse in die Messküvette überführt. Die Zellen werden durch die umgebende Flüssigkeit beschleunigt und zum Analysepunkt transportiert. Dies bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung. Lichtquelle ist ein luftgekühlter Argonlaser mit einer

Anregungswellenlänge von 488 nm. Die gleichzeitige Messung folgender optischer Parameter ist möglich:

- 1.) Vorwärtstreulicht (FSC = „forward light scatter“) im Kleinwinkelbereich ($0-10^\circ$) des einfallenden Lichts. Dies ermöglicht die oben erwähnte Aufteilung der Zellen nach Größe und Vitalität.
- 2.) Seitwärtstreulicht (SSC = „side scatter“) im Bereich der 90° -Streuung. Dieses Seitwärtstreulicht wird von der Granularität, der Membranfaltung und der äußeren Form der Zelle bestimmt.
- 3.) Fluoreszenz: über verschiedene Filter und Spiegel wird das für jedes Fluorochrom spezifische emittierte Licht getrennt und auf Detektoren geleitet. Das in dieser Dissertation verwendete Durchflusszytometer Facscalibur besitzt vier verschiedene Fluoreszenzdetektoren und ermöglicht somit die gleichzeitige Messung von vier Farbstoffen.

Die optischen Signale werden mittels der Software Cell Quest Pro graphisch als Histogramm oder Dot Plot dargestellt und können auf diese Weise ausgewertet werden (siehe Abb. 8).

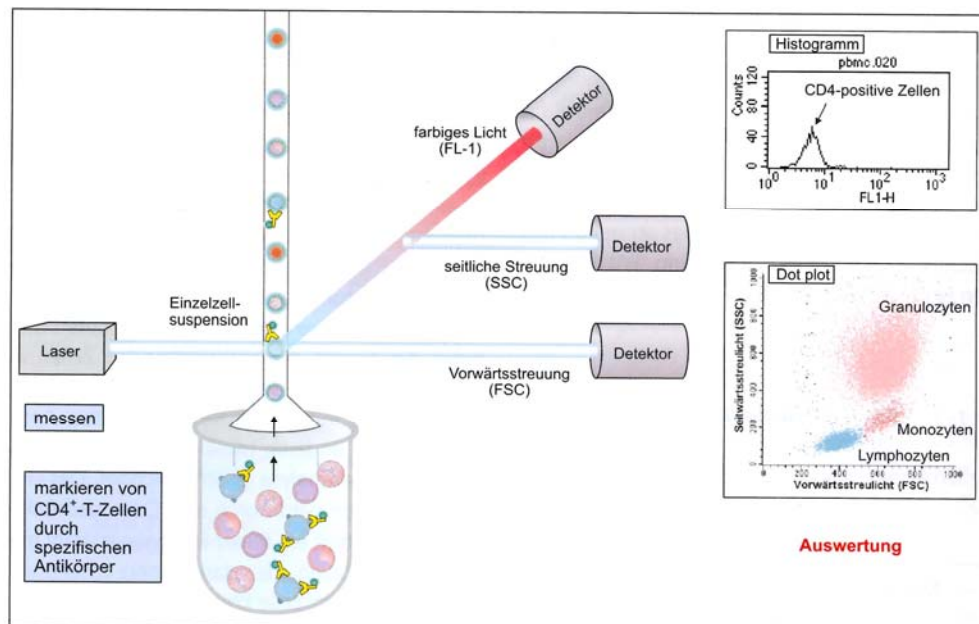


Abbildung 8: Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS) am Beispiel CD4 positiver Lymphozyten (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

3.5.2 Untersuchung der Expression von NKG2A auf CD8 positiven T-Lymphozyten

Um feststellen zu können, ob grundsätzliche Unterschiede in der Expression von NKG2A auf CD8 positiven T-Lymphozyten HCV infizierter Patienten und gesunder Probanden bestehen,

wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden die nach oben beschriebenen Protokoll separierten CD8 positiven T-Lymphozyten mit 10µl eines Anti-NKG2A-PE-Antikörpers inkubiert und dann im FACS analysiert.

Protokoll:

- Isolierung von CD8 positiven T-Lymphozyten mittels Ficoll und MACS laut obigem Protokoll.
- Zugabe von 10µl Anti- NKG2A-PE
- 20min Inkubation
- Waschen mit 3ml PBS (mit 2% FCS) pro Ansatz
- Zentrifugieren (10 Minuten, 1200U/min, Raumtemperatur)
- Zellpellet lösen in 150µl Cell Fix Fixierungslösung
- FACS-Analyse

3.5.3 Intrazelluläre Zytokin-Analyse

Die Bildung der Zytokine TNF- α und IL-10 wurde durchflusszytometrisch analysiert. Hierfür wurden HLA-E transfizierte K-562-Zellen (B5) mit den bzw. ohne das HLA-E stabilisierende Peptid HCV Core_{aa35-44} (im weiteren Verlauf als P18 bezeichnet) über Nacht inkubiert (Nattermann et al., 2005a).

Anschließend wurden immunomagnetisch isolierte NK-Zellen von Patienten mit replikativer HCV-Infektion, Patienten unter Kombinationstherapie und gesunden Probanden in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben. Nach einer Stunde wurde Brefeldin A (BFA) zugesetzt, um die Sekretion der Zytokine in den Überstand zu verhindern und so die durchflusszytometrische Analyse der Zytokine zu ermöglichen. BFA führt hierbei zur Inhibition des intrazytoplasmatischen Proteintransports zum Golgi-Apparat und zu einer Proteinakkumulation im endoplasmatischen Retikulum. Um die Zytokine später auch intrazellulär anfärben zu können, wurde vor der Färbung der Zellen FACS-Permeabilisationslösung hinzu gegeben. Diese bewirkt eine Porenbildung, also Permeabilisierung der Zelle, die es dem Farbstoff-gekoppelten Antikörper ermöglicht, auch intrazellulär Zytokine anzufärben.

Protokoll:

Tag 1:

- Inkubation von B5-Zellen mit P18 in einer 6-well-Mikrotiterplatte; zusätzlich ein Ansatz von B5-Zellen ohne P18

- NK-Zell-Separation mittels Ficoll und MACS laut obigem Protokoll; Zellen über Nacht in Medium (mit L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, ohne FCS) im Brutschrank bei 37°C aufbewahren

Tag 2:

- Zählung und Verdünnung der NK-Zell-Konzentration und der B5-Konzentration auf eine Millionen Zellen pro ml in RPMI-Medium (mit L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, ohne FCS)
- 100µl NK-Zell-Suspension (entspricht 100.000 Zellen) und 100µl B5-Zell-Suspension (für jede Probe jeweils ein Ansatz mit P18 und ein Ansatz ohne P18) in einer 96-well-Mikrotiterplatte zusammen pipettieren
- Zentrifugieren (1min bei 300U/min und Raumtemperatur)
- eine Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37°C
- Zusetzen von 4µl BFA pro Well (BFA 1: 10 verdünnt mit PBS)
- Inkubation für weitere 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C
- Überführen der einzelnen Ansätze in jeweils ein FACS-Röhrchen
- Zentrifugieren (1200U/min, bei Raumtemperatur) und Überstand verwerfen
- FACS Permeabilization Solution II 1:10 mit Ampuwa verdünnen
- Jeweils 500µl der verdünnten Lösung auf jedes Zellpellet geben
- Kurz vortexen
- 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- Waschen mit jeweils 3ml PBS (mit 2% FCS)
- Zentrifugieren (10 Minuten, 1200U/min, Raumtemperatur) und Überstand verwerfen
- 50µl PBS (mit 2% FCS) auf jedes Zellpellet geben
- Färben mit 6µl Anti-CD3-PerCP, 8µl Anti-CD56-FITC, 8µl Anti-TNF- α -APC und 6µl Anti-IL-10-PE pro Ansatz
- 30min Inkubation im Dunklen bei 2-5°C (Kühlschrank)
- Waschen mit 3ml PBS (mit 2% FCS) pro Ansatz
- Zentrifugieren (10 Minuten, 1200U/min, Raumtemperatur)
- Zellpellet lösen in 150µl Cell Fix Fixierungslösung
- FACS-Analyse: mittels FSC und SSC wird die Lymphozyten-Population abgegrenzt; Die CD-56-positiven Zellen (=NK-Zellen) werden in einem zweiten Schritt abgegrenzt. Nur

diese CD-56 positiven Lymphozyten werden im Weiteren für die Bestimmung der Anzahl an TNF- α - und IL-10-positiven Zellen benutzt.

3.5.4 Einfluss der HLA-E/NKG2A vermittelten Zytokinsekretion auf CD8+ Lymphozyten

Um den Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokinsekretion auf Funktion und Phänotyp CD8 positiver Lymphozyten zu untersuchen, wurden CD8 positive T-Zellpopulationen gesunder, HCV-negativer Personen mit den Überständen der Stimulationsexperimente inkubiert. Diese Überstände wurden vorab gesammelt und bei -20°C bis zur Verwendung tiefgefroren. BFA wurde bei diesen Experimenten zur Gewinnung der Überstände nicht zugesetzt, damit die Zytokine in den Überstand gelangen konnten.

Analog zu den oben aufgeführten Untersuchungen wurden NK-Zellen mit B5-Zellen inkubiert, die vorher mit oder ohne Peptid HCV Core_{aa35-44} (P18) kultiviert worden waren. Nach vier Stunden Inkubation der CD8 positiven Zellen mit den Überständen wurde die Oberflächenexpression der Moleküle CCR5 und CCR7, sowie CD69 und CD80 auf den CD8 positiven Zellen bestimmt. Bei CCR5 und CCR7 handelt es sich um Chemokinrezeptoren, die für die Zellmigration eine wichtige Rolle spielen. CD69 und CD80 dagegen sind Aktivierungsmarker. Die Quantifizierung der Oberflächenexpression dieser Marker erfolgte wiederum mittels Durchflusszytometrie, wobei nur die Zellen betrachtet wurden, die auch mit Anti-CD8 angefärbt waren, bei denen es sich also wirklich um CD8 positive Zellen handelte.

Protokoll:

Materialgewinnung vorab:

- Ficoll, Separation, Inkubation wie in obigem Protokoll (für jede Patientenprobe also zwei Ansätze: einmal Inkubation mit B5-Zellen und P18 über Nacht, einmal ohne P18); dabei kein Zusatz von BFA
- Einfrieren der Proben bei -20°C in Eppendorf-Cups

Tag 1:

- Gewinnung CD8 positiver Lymphozyten mittels Ficoll und CD8-Isolationskit
- Aufbewahrung der CD8 positiven Lymphozyten für 18-24 Stunden im Brutschrank bei 37°C in Medium (mit L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin)

Tag 2:

- Verdünnung der CD8 positiven Lymphozyten auf 1 Million Zellen pro ml

- Für jeden Patienten sechsmal 100µl in 96-well-Mikrotiterplatte pipettieren; auf jeweils zwei dieser Ansätze 1.) nur RPMI-Medium mit L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zur Kontrolle, 2.) Überstand aus der Inkubation mit P18-inkubierten Zellen, 3.) Überstand aus der Inkubation ohne P18.
- Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 4 Stunden
- Überführung der Proben in FACS-Röhrchen
- Zentrifugieren (10 Minuten, 1200U/min, Raumtemperatur) und Verwerfen des Überstands
- 50µl PBS (mit 2% FCS) in jedes Röhrchen
- Färbung: 2 Ansätze: jeweils 8 µl jeden Antikörpers:

Tabelle 2: Antikörper für Ansatz 1 und 2

<i>Ansatz 1</i>	<i>Ansatz 2</i>
Anti-human-CD8 PerCP	Anti-human-CD8 PerCP
Anti-human-CD3 APC	Anti-human-CCR5 APC
Anti-human-CCR7 FITC	Anti-human-CD80 PE
Anti-human-CD69 PE	

- Inkubation für 20 Minuten im Dunklen bei 2-5°C (Kühlschrank)
- Waschen mit jeweils 3ml PBS (mit 2% FCS)
- Zentrifugieren (10 Minuten, 1200U/min, Raumtemperatur), Überstand verwerfen
- 150µl Cell Fix auf jeden Ansatz geben
- Messung am FACS-Gerät

3.6 CD107a Zytotoxizitätsassay

Bei dem von Betts et al. beschriebenen CD107a Zytotoxizitätsassay wird das zytotoxische Potential CD8 positiver Lymphozyten mittels Messung der Expression von CD107a an der Oberfläche dieser Zellen bestimmt. CD107a wird auf der Membran zytotoxischer, Granzym B und Perforin enthaltender Granula exprimiert. Nach Verschmelzung dieser Granula mit der Zellmembran und Degranulation mit Freisetzung von Perforin und Granzym B (zytotoxische Aktivität und Lyse von Zielzellen) kann die Expression von CD107a auf der Zelloberfläche bestimmt werden. Sie ist damit ein indirekter Marker für die Zytotoxizität einer CD8 positiven T-Zelle (Betts et al., 2003).

Um die Expression von CD107a an der Oberfläche von NK-Zellen zu messen, wurde wiederum die FACS-Analyse benutzt. Auch hierzu konnten die tiefgefrorenen Überstände aus der Inkubation von B5-Zellen (mit oder ohne P18) und NK-Zellen gesunder und HCV-positiver Probanden benutzt werden. Als Kontrollen wurden parallel Ansätze mit nur Medium statt Überständen untersucht. Als erste Kontrolle wurde nur Medium (mit FCS) auf die separierten Zellen gegeben. Um sicher zu gehen, dass die Kontrollen tatsächlich wie die eigentlichen Proben behandelt wurden, wurde eine zweite Kontrolle gemacht. Für diese wurde Medium (ohne FCS) über Nacht bei -20°C tiefgefroren und dann mit den Proben zusammen wieder aufgetaut und als zweite Negativkontrolle verarbeitet. Zur Stimulierung der TCR-Bindung wurde in einem zweiten Ansatz OKT (Anti-CD3-Antikörper) benutzt, das an den Komplex aus TCR und CD3 bindet. Die Ergebnisse wurden sowohl für alle CD8 Lymphozyten, als auch getrennt nach CD8 Lymphozyten mit hoher (CD8-high Zellen) und niedriger (CD8-low Zellen) Oberflächenexpression von CD8 dargestellt, um gegebenenfalls einen Unterschied in der Änderung der Zytotoxizität in Abhängigkeit von der CD8 Expression feststellen zu können.

Protokoll:

- Lymphozyten mittels Ficoll separieren
- 24h Inkubation bei 37°C (RPMI-Medium, 1% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin)
- Verdünnung auf 1 Million Zellen pro ml in Überstand (für jeden Patienten jeweils zwei Ansätze mit Überstand mit T-Zellen mit P18, einmal mit T-Zellen ohne P18); jeweils 100µl in 96-well-Mikrotiterplatte
- Gleichzeitig werden die Negativkontrollen mit Medium statt Überstand parallel angesetzt.
- In beide Ansätze eines Patienten 3µl Anti-human-CD107a FITC geben
- Zu jeweils einem der beiden Ansätze 5µl OKT zugeben
- 1 Stunde Inkubation bei 37°C
- 2µl BFA in jedes Well
- 4 Stunden Inkubation bei 37°C
- Überführung in FACS-Röhrchen
- Färbung mit 8µl Anti-human-CD8 APC
- 15 Minuten Inkubation im Dunklen
- Waschen mit 3ml PBS (mit 2% FCS)
- Zentrifugieren (10 Minuten, 1200U/min, Raumtemperatur), Überstand verwerfen

- 100µl Cell Fix in jedes Röhrchen
- FACS-Analyse

3.7 ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assays zur Zytotoxizitätsbestimmung

Beim Zytotoxizitätsassay wird die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen an Zielzellen mittels der Freisetzung radioaktiven Chroms gemessen. Die Zielzellen werden durch ein Radioisotop, das sie ins Zytoplasma aufnehmen, markiert. Für die vorliegende Doktorarbeit wurde das Radioisotop ⁵¹Cr benutzt. Der direkte Zytotoxizitätsassay dient zur Quantifizierung der direkten zellvermittelten Lyse. Hierbei wurden als Effektorzellen CD8 positive Lymphozyten verwendet, als Zielzellen B5-Zellen (Zellreihe K-562, HLA-E transfiziert). Effektorzellen und Zielzellen wurden in einem Verhältnis von E:T = 10:1 untersucht. Nach Aufnahme des Radioisotops in die Zielzelle kann dieses durch Lyse anschließend wieder freigesetzt und im Überstand quantifiziert werden. Die Messung des Radioisotops im Überstand erlaubt eine direkte Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen. Diese wird als Anteil der maximal möglichen Lyse angegeben. Zur Bestimmung der maximal möglichen Lyse wurde eine Kontrolle angelegt, in der es durch ein Detergenz (Triton X-100, 0,5%) zu einer Lyse aller Zellen kam (siehe Abb. 9). Bei Triton X-100 handelt es sich um ein mildes Detergenz, das durch Bindung seiner hydrophoben Anteile an die Transmembrandomänen der Membranproteine zur Permeabilisierung der Zellmembran führt. Zur Bestimmung der prozentualen Lyse wurde die maximale Lyse mit der Spontanlyse eines Reaktionsansatzes in Beziehung gesetzt (Formel siehe im Protokoll auf S.41).

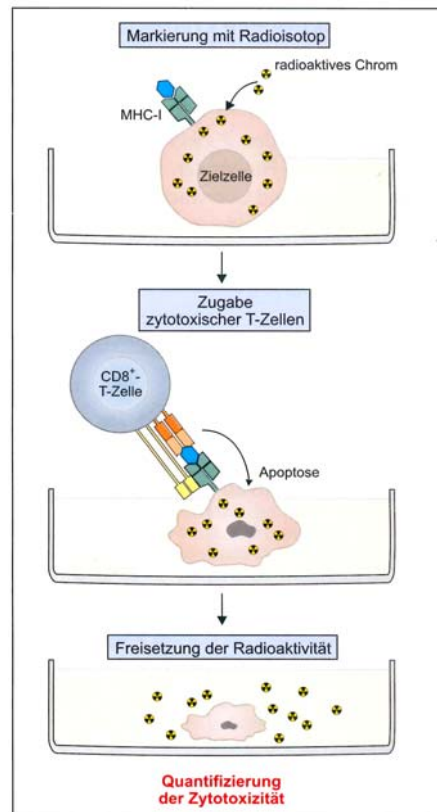


Abbildung 9: Bestimmung der Zytotoxizität von aktivierten CD8-positiven Zellen (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

Bei diesem Versuch muss beachtet werden, dass es auch zu einer Spontanlyse kommt, durch die ebenfalls radioaktives Chrom freigesetzt werden kann. Diese Spontan-Freisetzung muss von allen Messungen abgezogen werden, um die spezifische Lyse durch die Effektorzellen zu bestimmen. Hierfür wurde als Negativkontrolle die Spontanfreisetzung von $^{51}\text{Chrom}$ in den Überstand von nicht lysierten, ohne Effektorzellen inkubierten Zielzellen gemessen. Als zweite Negativkontrolle diente die Messung der Freisetzung nach Inkubation mit HLA-E transfizierten, aber nicht Peptid präsentierenden Zielzellen (Ansätze ohne Peptid).

Das Prinzip der redirigierten Lyse (redirected lysis assay) ist ähnlich. Allerdings werden hier die radioaktiv markierten Zielzellen mit Antikörpern beladen, die bestimmte Rezeptoren auf den Effektorzellen aktivieren oder inhibieren. Die Zielzellen selbst werden also nicht von den zytotoxischen Zellen erkannt. Für die vorliegende Doktorarbeit wurden dabei Anti-NKG2A-Antikörper, sowie Anti-CD3-Antikörper verwendet.

Es wurden Zytotoxizitätsassays für folgende Fragestellungen durchgeführt:

- a) CD8 positive T-Lymphozyten wurden mit Anti-CD3 und Anti-NKG2A inkubiert, um den Einfluss der NKG2A-Stimulation darstellen zu können.

b) Um die funktionelle Auswirkung auf die Interaktion von NKG2A mit HLA-E zu bestimmen, wurden zunächst NK-Zellen und K-562-Zellen (mit und ohne P18 zur Stabilisierung von HLA-E) über Nacht bei 26°C inkubiert. Diese Zellen wurden dann als Effektorzellen benutzt, um zu zeigen, dass die HLA-E-Stabilisierung einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Dabei wurde ein Anti-NKG2A-Antikörper benutzt, um herauszufinden, ob für diesen Einfluss tatsächlich die Interaktion von HLA-E mit NKG2A verantwortlich war.

c) Zur Untersuchung der funktionellen Konsequenz der P18-induzierten Stabilisierung der HLA-E Expression wurden ebenfalls K-562-Zellen mit bzw. ohne P18 inkubiert und als Zielzellen verwendet (genaues Protokoll im Folgenden). Es zeigte sich, dass Anti-CD3 stimulierte CD8 positive T-Zellen eine deutlich geringere zytotoxische Aktivität gegen Peptid-beladene K-562-Zellen aufwiesen. Hierbei wurden CD8 positive T-Zellen als Effektorzellen verwendet und mit einem Anti-CD3-Antikörper stimuliert.

Protokoll (beispielhaft, weitere Assays wurden nach ähnlichem Protokoll durchgeführt):

Tag 1:

- Stimulierung der Zielzellen mittels Zugabe von P18 und Cw03. Negativkontrolle: ein Ansatz ohne Peptid
- Inkubation der Zielzellen mit 5µl ⁵¹Chrom bei 26°C über Nacht

Tag 2:

- CD8 positive Zellen (Effektorzellen) mittels Ficoll und MACS separieren
- Zellen zählen und auf 5x10⁵ pro ml in Medium (mit FCS) verdünnen
- 20µl Anti-CD3-Antikörper dazugeben
- 10min Schüttler
- Für jeden Patienten in 9 wells einer 96-well-Mikrotiterplatte jeweils 100µl Zellsuspension pipettieren (entspricht 5x10⁴ Zellen pro well)
- Chrom-markierte B5-Zellen (Zielzellen) in Medium (mit FCS) auf 5x10⁶ pro ml verdünnen
- 100µl B5-Zellen zu jedem Ansatz dazu pipettieren (entspricht 5x10⁵ Zellen pro well, also E:T = 10:1), für jeweils 3 Wells B5-Zellen mit P18, mit Cw03 und ohne Peptid verwenden
- Negativkontrolle (Spontanfreisetzung): 100µl Medium statt Effektorzellsuspension benutzen

- Maximal Release: je 10µl 0,5%iges Triton X-100 zu Zielzellsuspension und Ansätzen mit Medium geben
- 4 Stunden Inkubation im Brutschrank
- Überstand abnehmen
- Messung des radioaktiven Chrms im Überstand mittels Szintillationszähler
- Bestimmung der spezifischen Lyse (%) = $(\text{Lyse im well-Spontanrelease}) / (\text{Maximale Lyse} - \text{Spontanrelease}) \times 100$

3.8 Human-IL-6-, Human-IL-10-, Human-TNF- α -ELISA

Der ELISA (Enzyme-Linked Immunoadsorbent Assay, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionsassay) dient zum spezifischen, quantitativen Nachweis von Proteinen mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen. Bei den für diese Dissertation verwendeten ELISA-Kits der Firma Diaclone handelt es sich um den sogenannten Sandwich-ELISA (oder capture-ELISA). Dabei werden antigenspezifische Antikörper gegen Zytokine (in den Versuchen für diese Dissertation Antikörper gegen die Antigene IL-6, IL-10, TNF- α) auf einer Mikrotitrierplatte immobilisiert. Darauf folgt eine Inkubation mit den Proben (in denen sich die Zytokine befinden) und einem biotinylierten Anti-Zytokin-Antikörper. Das Zytokin in der Probe bindet während dieser Inkubation an die immobilisierten Antikörper. Auch der biotinylierte Antikörper bindet an das Zytokin. In einem Waschschrift wird ungebundener biotinylierter Antikörper eliminiert. Danach wird Streptavidin-Meerrettichperoxidase hinzu gegeben, nochmals inkubiert und gewaschen. Um nun die Menge an gebundenem Antigen quantifizieren zu können, kommt ein mit dem Enzym Meerrettichperoxidase reagierendes Substrat (TMB-Lösung) hinzu und es wird nochmals inkubiert. Der Farbumschlag durch die Reaktion der Meerrettichperoxidase mit ihrem Substrat kann nach Addition von H₂SO₂-Stop-Lösung photometrisch bestimmt werden. Das farbige Produkt ist proportional zu der Menge an gebundenem Antigen auf der Mikrotitrierplatte. Durch Vergleich mit einer Standard-Verdünnungsreihe kann so die Menge an gebundenem Antigen quantifiziert werden (siehe Abb. 10).

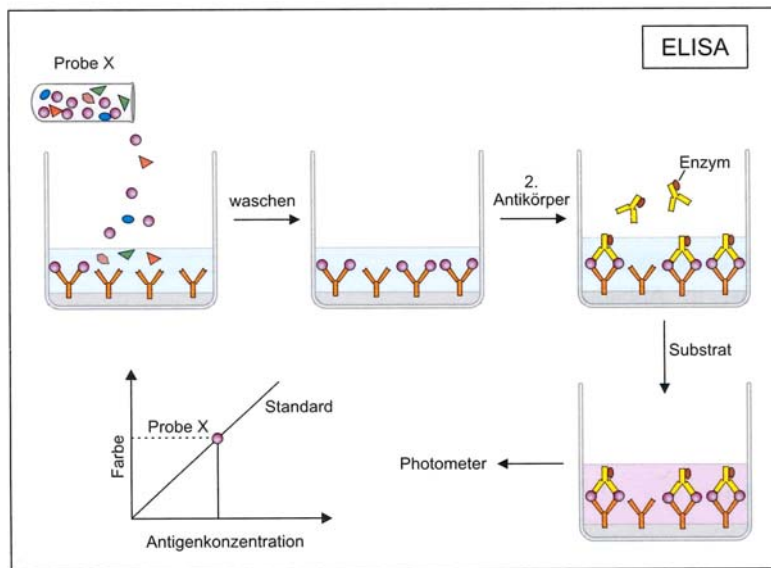


Abbildung 10: Prinzip des Sandwich-ELISA (nach Vollmar und Dingermann, 2005)

Bei den für diesen Versuch untersuchten Proben handelte es sich um die schon mehrfach erwähnten tiefgefroren Überstände aus der Inkubation von NK-Zellen mit der B5-Zelllinie (mit bzw. ohne Stabilisierung durch P18).

Protokoll: laut Anleitung der Firma Diaclone:

- Jeweils 100µl des Standardverdünnungspuffers (Verdünnung: 1:10 mit Ampuwa) in Vertiefungen B1 bis F1 der Mikrotiterplatte geben
- 200µl rekonstituierten Standard (gelöst in 1,35ml Standardverdünnungspuffer) in Vertiefung A1 pipettieren; Verdünnung der Standardreihe von 800 bis 25pg/ml (für TNF- α), von 400 bis 12,5pg/ml (für IL-10) und von 200 bis 6,25pg/ml (für IL-6), indem jeweils 100µl des Standards in die nächste Vertiefung transferiert wird. Von der letzten Vertiefung 100µl verwerfen
- 100µl Standard-Verdünnungspuffer in Doppelbestimmungen in Vertiefungen für den Hintergrund (Blank) geben
- 100µl Probe in Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Die Proben wurden vorher mit RPMI-Medium (+ 1% Penicillin/Streptomycin) verdünnt. Die Stärke der Verdünnung variierte. Bei erstem Auftauen der Proben wurden diese 1:30 verdünnt, bei zweitem Auftauen nur noch 1:20. Besondere Schwierigkeiten bereitete der IL-10-ELISA. Die

Proben wurden schließlich (bei 3. Auftauen) unverdünnt benutzt. Ebenso 100µl der Kontrollen (gelöst in 1ml Ampuwa) in Vertiefungen pipettieren.

- Biotinylierten Antikörper vorbereiten (Antikörper laut Anweisung in Antikörper-Puffer lösen)
- 50µl des verdünnten biotinylierten Antikörpers in alle Vertiefungen pipettieren
- Platte abdecken; Inkubation bei Raumtemperatur (18-25°C): 3 Stunden für TNF- α , 2 Stunden für IL-10, 1 Stunde für IL-6
- Vertiefungen entleeren, 3 x mit Waschpuffer (Konzentrat 1:200 mit Ampuwa verdünnt) waschen
- Streptavidin-Meerrettichperoxidase vorbereiten (Konzentrat mit Meerrettichperoxidasepuffer laut Anweisung verdünnen)
- 100µl der verdünnten Streptavidin-Meerrettichperoxidase in alle Vertiefungen geben
- Platte abdecken; Inkubation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 30 Minuten
- Vertiefungen entleeren und 3x mit Waschpuffer waschen
- 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Lösung in alle Vertiefungen, einschließlich Vertiefungen für den Hintergrund, geben
- Inkubation für 12-15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) im Dunkeln
- 100µl H₂SO₄-Stop-Lösung in alle Vertiefungen, einschließlich Vertiefungen für den Hintergrund, geben
- Farbintensität bei 450nm messen

3.9 Statistik

Für die Statistiken wurde ein gepaarter t-Test benutzt. Sämtliche Berechnungen der vorliegenden Dissertation wurden an einem PC mit SPSS 12.0 Software ausgeführt (SPSS, Chicago, IL).

4. Ergebnisse

4.1 Funktionelle Bedeutung des NKG2A-Rezeptors auf CD8 positiven Lymphozyten

4.1.1 Expression von NKG2A auf CD8 positiven T-Lymphozyten

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich auf den CD8 positiven Lymphozyten HCV RNA positiver Patienten eine signifikant höhere Oberflächenexpression von NKG2A als auf den CD8 positiven Lymphozyten gesunder Probanden (15,4 \pm 2,9% vs. 5,6 \pm 0,5%; p=0,003) (siehe Abb. 11). Die Oberflächenexpression auf den CD8 positiven Zellen der mit HCV infizierten Patienten war darüber hinaus signifikant höher als bei Patienten, bei denen unter antiviraler Kombinationstherapie keine HCV RNA mehr nachweisbar war. Diese Patientengruppe zeigte dabei eine Oberflächenexpression von NKG2A, die derjenigen der gesunden Probanden ähnlich war (6,7 \pm 1,9%).

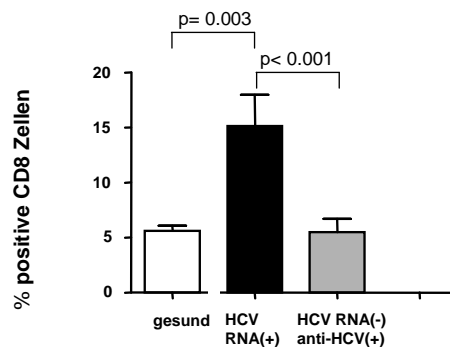


Abbildung 11: FACS-Analyse der NKG2A-Expression CD8 positive Lymphozyten gesunder (n=10), HCV-positiver (n=20) und unter Therapie wieder HCV-negativ gewordener (n=10) Probanden

4.1.2 Funktionelle Relevanz der erhöhten NKG2A-Expression

Um die funktionelle Relevanz der erhöhten NKG2A Expression bei chronischer Hepatitis C zu untersuchen, führten wir einen Re-directed Lysis Assay durch. Die Stimulation CD8 positiver T-Lymphozyten mit einem NKG2A-spezifischen Antikörper induzierte keine Lyse der Zielzellen (Daten nicht gezeigt). Dagegen führte die Ko-Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit einem Anti-CD3-Antikörper und des NKG2A-Rezeptors mit einem Anti-NKG2A-Antikörper zu einer signifikant reduzierten TCR-vermittelten Zytolyse im Vergleich zu CD8 positiven T-Zellen, die mit Anti-CD3 und einem IgG-Isotyp-Kontroll-Antikörper stimuliert wurden. Dies war jedoch nur dann der Fall, wenn T-Zellen von HCV-positiven Patienten verwendet wurden. Im Gegensatz

dazu fanden sich nur geringe Effekte, wenn T-Zellen von gesunden Probanden oder von Patienten verwendet wurden, die unter Therapie HCV-negativ geworden waren (siehe Abb. 12).

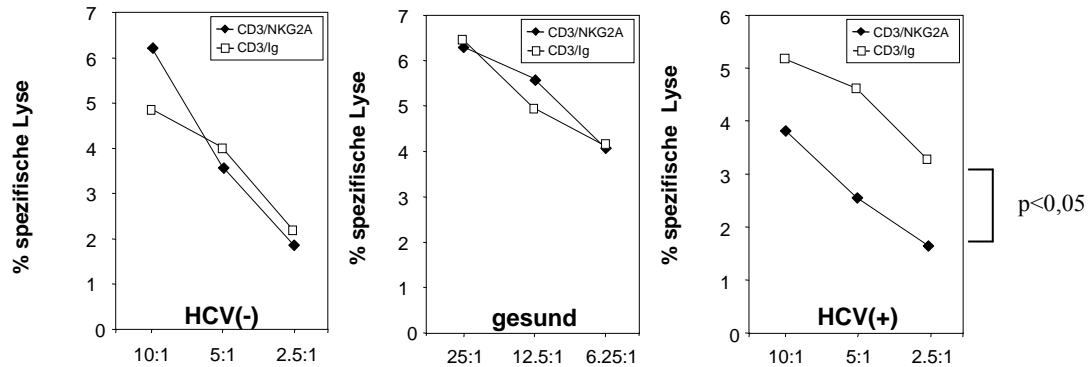


Abbildung 12: Re-directed Lysis Assay in Anwesenheit eines Anti-CD3- und eines Anti-NKG2A-Antikörpers. Untersuchung der Funktion von NKG2A auf CD8 positiven T-Zellen bei gesunden Probanden, HCV-positiven Patienten ohne Therapie und Patienten, die unter Therapie wieder HCV negativ wurden.

4.1.3 Funktionelle Relevanz der Stimulierung mit P18

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Peptid HCV Core_{aa35-44} (HCV P18) die HLA-E Expression auf HLA-E transfizierten K-562-Zellen (B5-Zellen) erhöht (Abb. 13). Zudem konnten wir zeigen, dass hierdurch die Zytolyse durch NK-Zellen gehemmt wird.

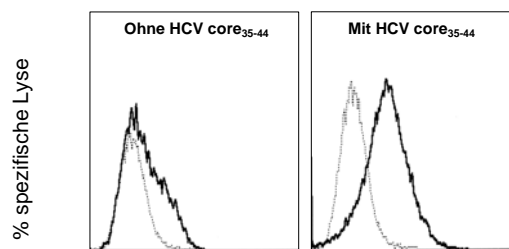


Abbildung 13: Lyse von HLA-E-transfizierten K-562-Zellen mit oder ohne HCV Core_{aa35-44} durch NK-Zellen bei gesunden Probanden (hell) und HCV positiven Patienten (dunkel), gemessen im Zytotoxizitätsassay, repräsentative Daten aus drei Experimenten

Daher untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit den Einfluss der P18-induzierten HLA-E-Expression auf die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen. Hierfür wurden HLA-E transfizierte K-562-Zellen mit bzw. ohne P18 inkubiert und als Zielzellen in einem Re-directed Lysis Assay verwendet. Es zeigte sich, dass Anti-CD3 stimulierte CD8 positive T-Zellen eine deutlich geringere zytotoxische Aktivität gegen Peptid-beladene K-562-Zellen aufwiesen.

(gesund: 77,84 \pm 19,86% vs. 18,00 \pm 1,04%; $p=0,0397$; HCV-positiv: 42,86 \pm 32,40% vs. 0,29 \pm 1,79%; $p=0,2544$) Dieser Effekt war bei Zellen HCV-infizierter Spender deutlicher ausgeprägt als bei HCV-negativen gesunden Personen (siehe Abb. 14).

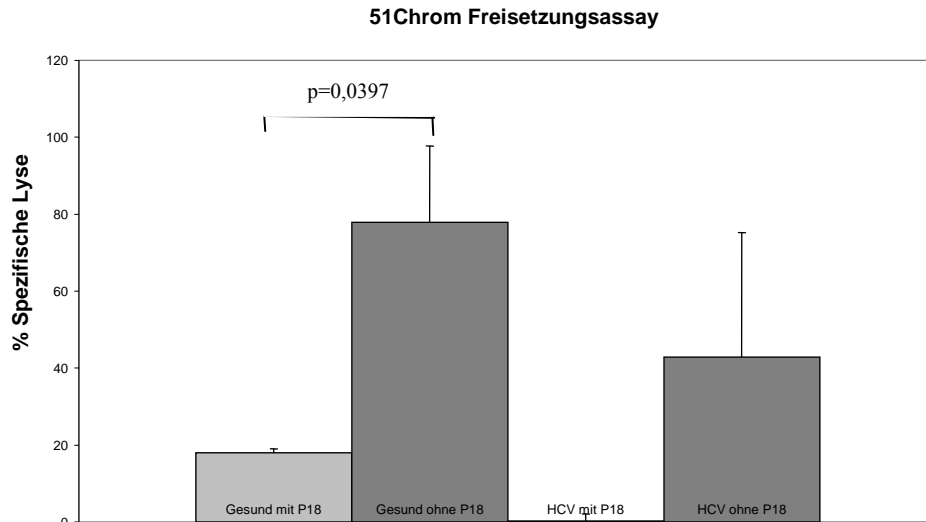


Abbildung 14: Messung der Zytotoxizität im Re-directed Lysis Assay mit K-562-Zellen als Zielzellen mit und ohne Stabilisierung von HLA-E durch HCV Core_{aa35-44}. CD8 positive Lymphozyten mit Anti-CD3 stimuliert (3 Experimente).

4.2 Veränderung des Cross-Talks zwischen NK-Zellen und CD8 positiven T-Zellen durch die HLA-E/NKG2A Interaktion

CD8 positive T-Zellen werden in ihrer funktionellen Aktivität auch durch ihre Interaktion mit anderen Zellen beeinflusst („Cross-Talk“). So können NK-Zellen durch die Sekretion von Zytokinen die T-Zell-Funktion modulieren. Daher wurde in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht, ob die P18-vermittelte HLA-E Expression zu einer Veränderung der Zytokinsekretion und damit zu einer Veränderung des „Cross-Talks“ zwischen NK-Zellen und CD8 positiven Lymphozyten führt.

4.2.1 P18 induzierte Veränderung der Zytokinsekretion

4.2.1.1 TNF- α

Zur Untersuchung der intrazellulären TNF- α -Bildung wurden acht therapie-naive Patienten mit 23 Patienten unter Kombinationstherapie und einer Vergleichsgruppe bestehend aus zehn gesunden Probanden verglichen.

Es zeigte sich, dass die Anzahl TNF- α -sezernierender Zellen bei gesunden Probanden ohne Stimulierung durch P18 nicht signifikant höher lag als in der Gruppe der Patienten unter Kombinationstherapie (4,23 \pm 1,86% vs. 2,32 \pm 1,55%; p=0,377) und in der Gruppe der therapienaiven Patienten (4,23 \pm 1,86% vs. 2,84 \pm 0,59%; p=0,486).

Vergleichbare Ergebnisse fanden sich nach Inkubation von NK-Zellen mit P18-beladenen B5-Zellen. Die Anzahl TNF- α -sezernierender Zellen zeigte in der Gruppe der gesunden Probanden (4,11 \pm 1,84%), in der Gruppe der Patienten unter Kombinationstherapie (1,37 \pm 0,30%; p=0,151) und in der Gruppe der therapie-naiven Patienten (2,07 \pm 0,51%; p=0,302) keine signifikanten Änderungen.

Es zeigte sich, dass sich in der Gruppe der gesunden Probanden durch die Inkubation mit P18 der Anteil an TNF- α -produzierenden Zellen nicht änderte (mit P18: 4,11 \pm 1,84% vs. ohne P18: 4,23 \pm 1,86%; p=0,964), ebenso zeigte sich in der Gruppe der Patienten unter Kombinationstherapie (mit P18: 1,37 \pm 0,30% vs. ohne P18: 2,32 \pm 1,55%; p=0,378) und in der Gruppe der therapie-naiven Patienten (mit P18: 2,07 \pm 0,51% vs. ohne P18: 2,84 \pm 0,59%; p=0,350) keine Änderung des Anteils an TNF- α -produzierenden Zellen (siehe Abb. 15).

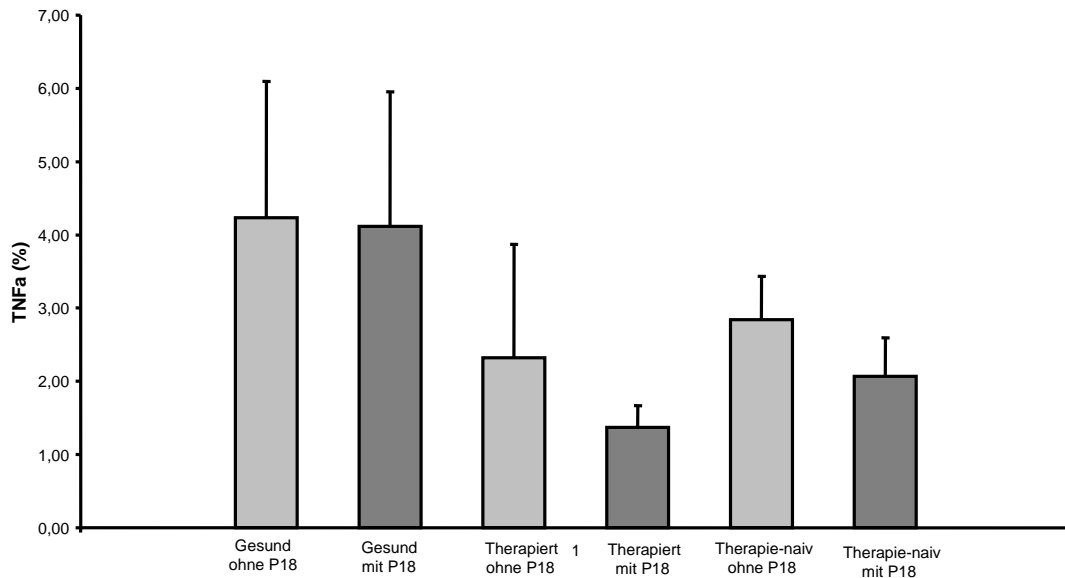


Abbildung 15 Intrazelluläre FACS-Analyse zur Bestimmung der TNF- α -Sekretion bei Inkubation von K-562-Zellen (ohne bzw. mit Stabilisierung von HLA-E durch P18) mit NK-Zellen (10 gesunde Probanden, 23 Patienten unter Kombinationstherapie, 8 therapie-naive Patienten)

In einer zweiten Versuchsreihe diente der ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay, Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionsassay) zum spezifischen, quantitativen Nachweis von TNF- α .

Bei den für diesen Versuch untersuchten Proben handelte es sich um die tiefgefrorenen Überstände aus der Inkubation von NK-Zellen mit der B5-Zelllinie (mit bzw. ohne vorherige Inkubation mit P18).

Zur Quantifizierung der Menge an produziertem TNF- α wurden Proben von fünf therapie-naiven und sechs Patienten unter Kombinationstherapie mit Proben von sieben gesunden Probanden verglichen.

Ohne P18 zeigten sich zwischen der TNF- α Produktion der gesunden Probanden und der Produktion der Patienten unter Therapie (2348 \pm 1269pg/ml vs. 585 \pm 129pg/ml; $p=0,194$), sowie zwischen der Produktion der gesunden Probanden und der Produktion der therapie-naiven Patienten (2348 \pm 1269pg/ml vs. 5525 \pm 3015pg/ml; $p=0,354$) keine Unterschiede.

Nach Inkubation durch P18 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Die TNF- α Produktion der gesunden Probanden lag nicht über der Produktion der Patienten unter Kombinationstherapie

(2519 \pm 1203pg/ml vs. 835 \pm 201pg/ml; $p=0,195$), ebenso zeigte sich im Vergleich zu den Proben der therapie-naiven Patienten kein Unterschied (2519 \pm 1203pg/ml vs. 2868 \pm 1447pg/ml; $p=0,857$).

Die Menge an sezerniertem TNF- α wurde durch die P18-vermittelte HLA-E-Expression in der Gruppe der gesunden Kontrollen (2519 \pm 1203pg/ml vs. 2348 \pm 1269pg/ml; $p=0,924$), sowie der behandelten HCV-Patienten (835 \pm 201pg/ml vs. 585 \pm 129pg/ml; $p=0,320$), und in der Gruppe der therapie-naiven Patienten (2868 \pm 1447pg/ml vs. 5525 \pm 3015pg/ml; $p=0,450$) nicht beeinflusst, siehe Abb. 16.

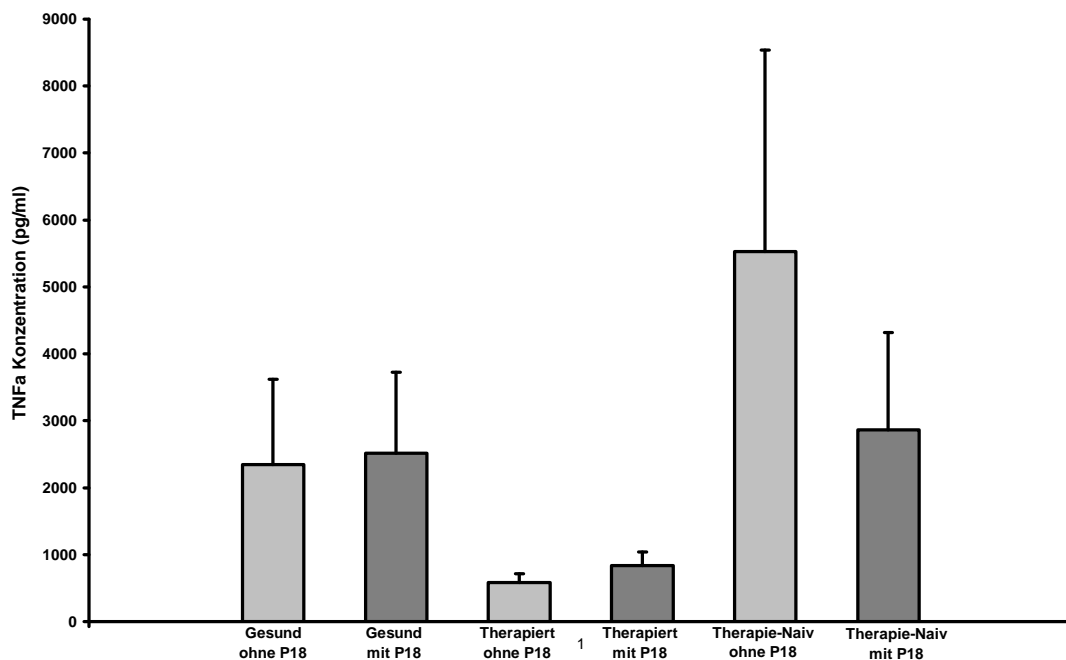


Abbildung 16: TNF- α -ELISA zur Bestimmung der Veränderung der Zytokinsekretion bei Inkubation von NK-Zellen und K-562-Zellen mit bzw. ohne vorherige Stabilisierung von HLA-E durch P18 (7 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 5 therapie-naive Patienten)

4.2.1.2 IL-10

Zur Untersuchung der intrazellulären IL-10-Produktion wurden ebenfalls acht therapienaive Patienten mit 23 Patienten unter Kombinationstherapie und einer Kontrollgruppe bestehend aus zehn gesunden Probanden verglichen.

Ohne vorherige Inkubation durch P18 zeigte sich, dass die Anzahl IL-10-produzierender Zellen in der Gruppe der gesunden Probanden signifikant niedriger lag als in den Gruppen der Patienten

unter Kombinationstherapie ($0,59\pm 0,17\%$ vs. $1,76\pm 0,29\%$; $p=0,002$) und der therapie-naiven Patienten ($0,59\pm 0,17\%$ vs. $2,48\pm 0,59\%$; $p=0,008$).

Nach Beladung der B5-Zellen mit P18 war die Anzahl IL-10-produzierender Zellen in der Gruppe der gesunden Patienten signifikant niedriger als die Anzahl in der Gruppe der Patienten unter Kombinationstherapie ($0,69\pm 0,12\%$ vs. $2,19\pm 0,71\%$; $p=0,045$), im Vergleich zur Zellzahl in der Gruppe der therapienaiven Patienten ($0,69\pm 0,12$ vs. $1,37\pm 0,34\%$; $p=0,081$) zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied.

Der Vergleich der IL-10 Sekretion von NK-Zellen, die mit P18-beladenen bzw. unbeladenen B5-Zellen inkubiert worden waren, zeigte, dass die Produktion an IL-10 in der Gruppe der gesunden Probanden ($0,69\pm 0,12\%$ vs. $0,59\pm 0,17\%$; $p=0,101$), in der Gruppe der Patienten unter Therapie ($2,19\pm 0,71\%$ vs. $1,76\pm 0,29\%$; $p=0,578$) und in der Gruppe der therapie-naiven Patienten ($1,37\pm 0,34\%$ vs. $2,48\pm 0,59\%$; $p=0,128$) nicht zunahm, siehe Abb. 17.

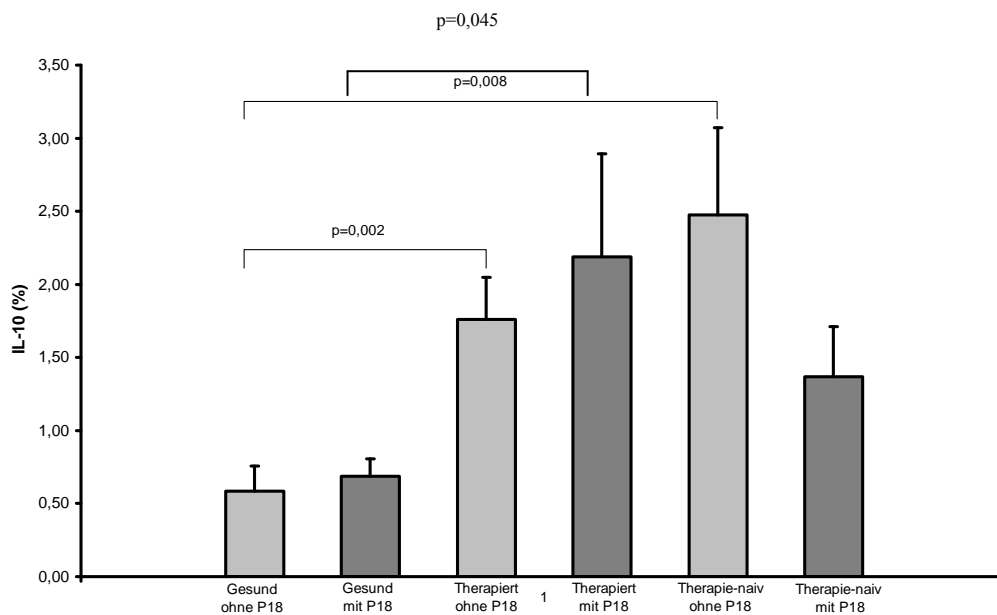


Abbildung 17: Intrazelluläre FACS-Analyse zur Bestimmung der IL-10-Sekretion bei Inkubation von K-562-Zellen (mit bzw. ohne Stabilisierung von HLA-E durch P18) mit NK-Zellen (10 gesunde Probanden, 23 Patienten unter Kombinationstherapie, 8 therapie-naive Patienten)

In einer zweiten Versuchsreihe diente der ELISA zum spezifischen, quantitativen Nachweis von IL-10.

Bei den für diesen Versuch untersuchten Proben handelte es sich um die tiefgefrorenen Überstände aus der Inkubation von NK-Zellen mit der B5-Zelllinie (mit bzw. ohne vorherige Inkubation mit P18).

Im IL-10 ELISA wurden Proben von jeweils fünf therapie-naiven Patienten und fünf Patienten unter Kombinationstherapie mit Proben von drei gesunden Probanden verglichen.

Ohne P18 lag die IL-10 Produktion der gesunden Probanden nicht über der Produktion der Patienten unter Therapie (15,73 \pm 8,70pg/ml vs. 5,96 \pm 2,28pg/ml; p=0,319) und der Produktion der therapie-naiven Patienten (15,73 \pm 8,70pg/ml vs. 6,82 \pm 1,64pg/ml; p=0,353).

Nach Inkubation mit P18 war die Situation ähnlich. Die IL-10 Produktion der gesunden Probanden zeigte keinen Unterschied im Vergleich zur Produktion der Patienten unter Kombinationstherapie (12,63 \pm 4,01pg/ml vs. 9,60 \pm 1,95pg/ml; p=0,522) und im Vergleich zur Produktion der therapie-naiven Patienten (12,63 \pm 4,01pg/ml vs. 6,84 \pm 1,96pg/ml; p=0,242).

In der Gruppe der gesunden Probanden konnte nach Inkubation mit P18 kein signifikanter Anstieg der IL-10 Konzentration (12,63 \pm 4,01pg/ml vs. 15,73 \pm 8,70pg/ml; p=0,763) beobachtet werden, ebenso änderte sich die Konzentration nach Stimulierung durch P18 bei den Patienten unter Therapie nicht signifikant (9,60 \pm 1,95pg/ml vs. 5,96 \pm 2,28pg/ml; p=0,260) und sie bei den therapie-naiven Patienten gleich blieb (6,84 \pm 1,96pg/ml vs. 6,82 \pm 1,64pg/ml; p=0,994), siehe Abb. 18.

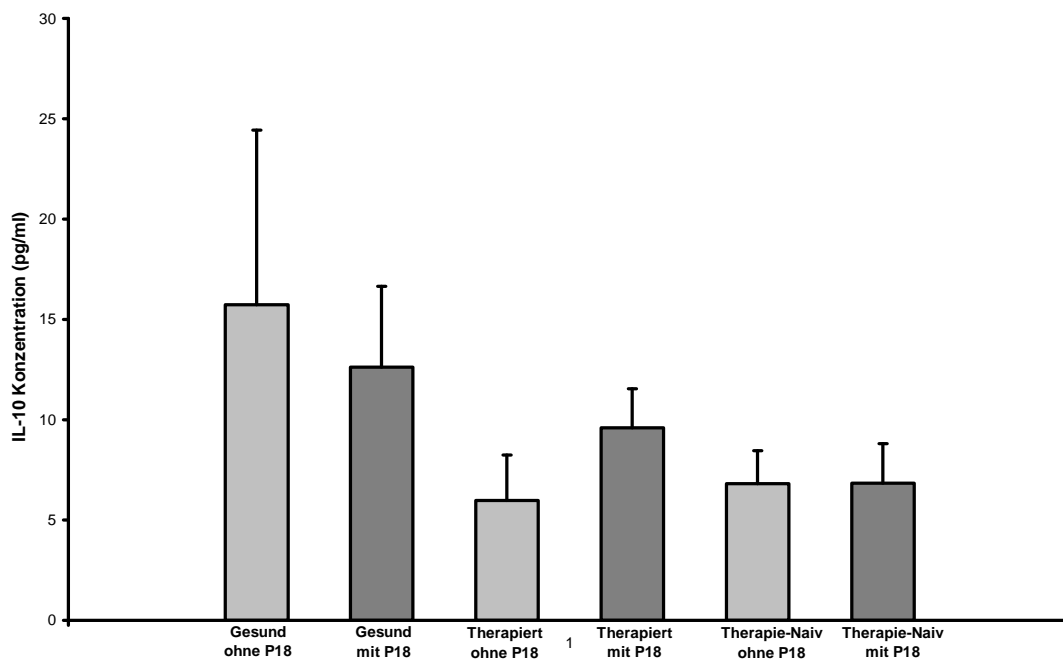


Abbildung 18: IL-10-ELISA zur Bestimmung der Veränderung der Zytokinsekretion bei Inkubation von NK-Zellen und K-562-Zellen mit bzw. ohne vorherige Stabilisierung von HLA-E durch P18 (3 gesunde Probanden, 5 Patienten unter Kombinationstherapie, 5 therapie-naive Patienten)

4.2.1.3 IL-6

Zum spezifischen, quantitativen Nachweis von IL-6 diente ebenfalls der ELISA. Bei den für diesen Versuch untersuchten Proben handelte es sich um die tiefgefrorenen Überstände aus der Inkubation von NK-Zellen mit der B5-Zelllinie (mit bzw. ohne vorherige Inkubation mit P18).

Für den IL-6 ELISA wurden acht therapie-naive Patienten und sechs Patienten unter Therapie mit sechs gesunden Probanden verglichen.

Ohne P18 lag die IL-6 Produktion der gesunden Probanden nicht unter der Produktion der Patienten unter Therapie (368 \pm 115pg/ml vs. 499 \pm 360pg/ml; $p=0,735$), und ebenfalls nicht signifikant unter der Produktion der therapie-naiven Patienten (368 \pm 115pg/ml vs. 1897 \pm 878pg/ml; $p=0,110$).

Die Verhältnisse nach Inkubation durch P18 waren ähnlich. Die IL-6 Produktion der gesunden Probanden lag nicht unter der Produktion der Patienten unter Kombinationstherapie (495 \pm 245pg/ml vs. 582 \pm 428pg/ml; $p=0,834$), und ebenfalls nicht signifikant unter der Produktion der therapie-naiven Patienten (495 \pm 245pg/ml vs. 2088 \pm 895pg/ml; $p=0,112$).

In allen drei Probandengruppen änderte sich die Konzentration von IL-6 in den Proben nach Stimulierung durch P18 nicht (für die gesunden Probanden: $p=0,648$; für die Patienten unter Kombinationstherapie: $p=0,886$; für die therapie-naiven Patienten: $p=0,881$), siehe Abb. 19.

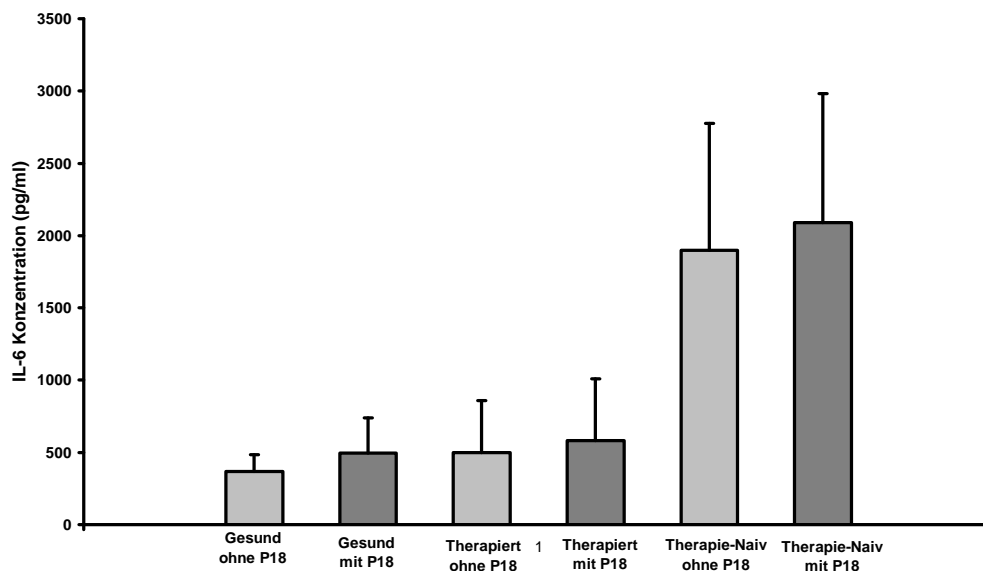


Abbildung 19: IL-6-ELISA zur Bestimmung der IL-6-Sekretion bei Inkubation von K-562-Zellen (ohne bzw. mit Stabilisierung von HLA-E durch P18) mit NK-Zellen (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 8 therapie-naive Patienten)

4.2.2 Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokin-Sekretion auf Phänotyp und Funktion CD8 positiver Lymphozyten

Um den Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokinsekretion auf den Phänotyp CD8 positiver Lymphozyten zu untersuchen, wurde die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 auf CD8 positiven Lymphozyten gesunder Probanden, sowie die Expression des Aktivierungsmarkers CD80 nach Inkubation der CD8+ T-Zellen mit den Überständen der NK-Zellen untersucht.

4.2.2.1 Einfluss auf den Phänotyp

4.2.2.1.1 CCR7

Um den möglichen Einfluss der HLA-E-induzierten Veränderung der Zytokinsekretion auf die Oberflächenexpression von CCR7 zu untersuchen, wurden CD8 positive T-Zellen gesunder Spender in NK-Zell-Überständen (mit bzw. ohne P18) von drei gesunden Probanden, vier Patienten unter Kombinationstherapie und sieben therapie-naiven Patienten inkubiert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die CCR7-Expression bestimmt.

Ohne vorherige Inkubation mit P18 war kein Unterschied in der Oberflächenexpression von CCR7 nach Inkubation mit den Überständen der gesunden Probanden im Vergleich zu den Proben mit den Überständen der Patienten unter Kombinationstherapie (7,86+/-4,94% vs. 13,17+/-0,75%; p=0,337) und den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten (7,86+/-4,94% vs. 12,60+/-2,12%; p=0,404) nachweisbar.

Nach vorheriger Inkubation mit P18 war kein Unterschied zwischen den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden und den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie (13,09+/-3,59% vs. 11,19+/-0,95%; p=0,629), sowie den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten (13,09+/-3,59% vs. 13,73+/-2,06%; p=0,881) erkennbar.

Insgesamt war in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden (13,09+/-3,59% vs. 13,62+/-4,94%; p=0,440) und in den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten keine Änderung der CCR7 Expression nach Inkubation mit P18 nachweisbar (13,73+/-2,06% vs. 12,60+/-2,12%; p=0,708), in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie war ebenfalls keine signifikante Änderung der CCR7-Oberflächenexpression erkennbar (11,19+/-0,95% vs. 13,17+/-0,75%; p=0,152), siehe Abb. 20.

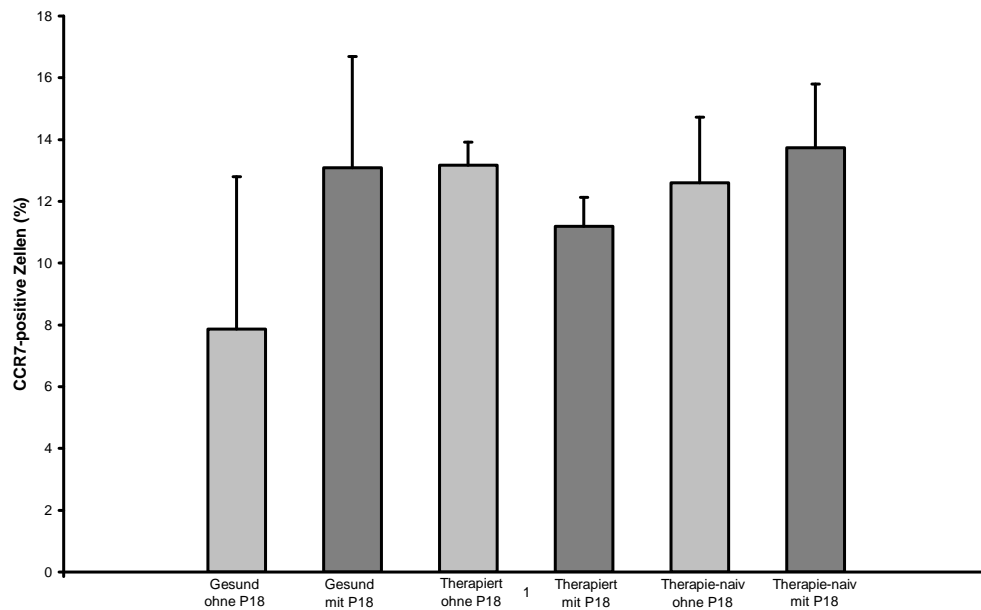


Abbildung 20: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CCR7 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapie-naiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen, mit und ohne vorherige Stabilisation von HLA-E durch P18); 3 gesunde Probanden, 4 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten

4.2.2.1.2 CCR5

Eine Veränderung der Oberflächenexpression von CCR5 durch die HLA-Stabilisierung sollte untersucht werden, indem der Einfluss des Überstandes aus den Stimulationsexperimenten (Vergleich zwischen Proben mit und ohne P18) von drei gesunden Probanden mit dem Einfluss des Überstandes von vier Patienten unter Kombinationstherapie und von sieben therapie-naiven Patienten verglichen wurde.

Ohne vorherige Inkubation mit P18 war kein Unterschied der Oberflächenexpression von CCR5 zwischen den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden und den Proben mit den Überständen der Patienten unter Kombinationstherapie ($1,75 \pm 0,81\%$ vs. $3,00 \pm 1,74\%$; $p=0,545$), sowie zwischen den Proben der gesunden Probanden und den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($1,75 \pm 0,81\%$ vs. $2,32 \pm 0,73\%$; $p=0,618$) erkennbar. Nach vorheriger Inkubation mit P18 war das Ergebnis ähnlich. In den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden zeigte sich keine Expressionsänderung im Vergleich zu den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie ($1,18 \pm 0,62\%$ vs. $1,86 \pm 1,19\%$; $p=0,635$) und ebenfalls keine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($1,18 \pm 0,62\%$ vs. $2,21 \pm 0,54\%$; $p=0,245$).

Insgesamt war in allen Proben nach vorheriger Inkubation mit P18 keine Änderung der CCR5 Oberflächenexpression sichtbar (für die Proben mit den Überständen der gesunden Probanden: $p=0,606$; unter Kombinationstherapie: $p=0,607$; therapie-naiv: $p=0,908$), siehe Abb. 21.

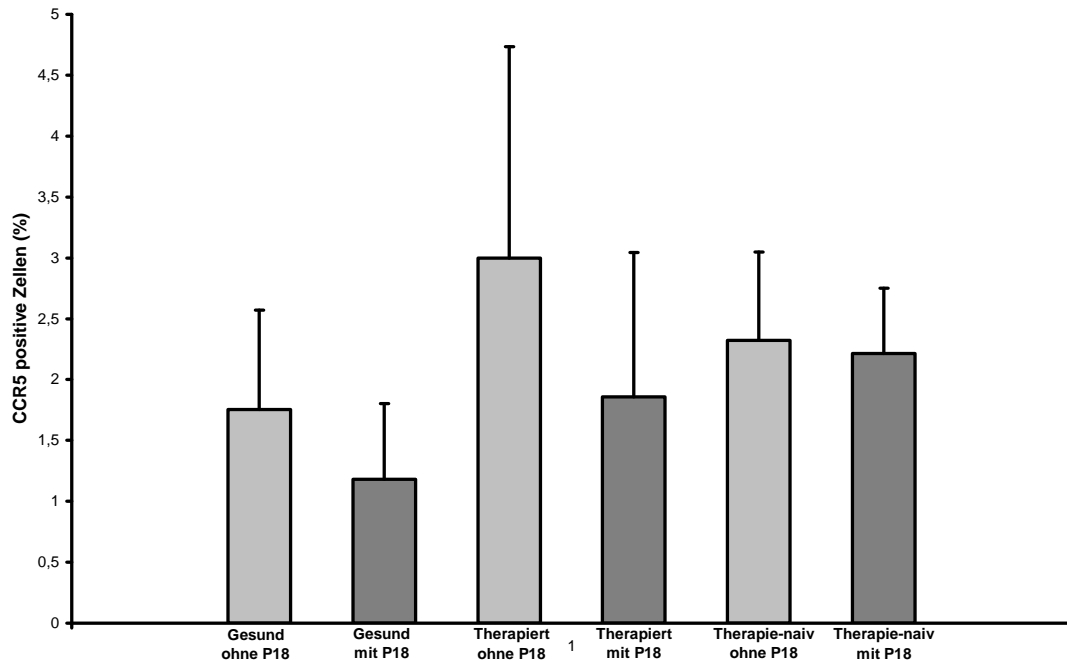


Abbildung 21: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CCR5 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapie-naiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen mit und ohne vorherige Inkubation mit P18); 3 gesunde Probanden, 4 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten

4.2.2.1.3 CD80

Wie bereits für CCR7 und CCR5 beschrieben, wurde im gleichen Verfahren auch die Oberflächensekretion von CD80 bestimmt.

Ohne vorherige Inkubation mit P18 lag die Oberflächenexpression von CD80 in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden nicht signifikant über der Expression in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Kombinationstherapie ($15,49\pm 7,14\%$ vs. $4,21\pm 1,85\%$; $p=0,187$), ebenso zeigte sich im Vergleich zur Expression in den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten kein signifikanter Unterschied ($15,49\pm 7,14\%$ vs. $5,39\pm 1,45\%$; $p=0,208$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 waren die Ergebnisse anders. In den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden zeigte sich keine veränderte Expression im Vergleich zu den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie ($17,29\pm 5,50\%$ vs. $5,23\pm 2,73\%$;

$p=0,107$), aber eine signifikant höhere Expression als in den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($17,29\pm 5,50\%$ vs. $4,16\pm 0,63\%$; $p=0,050$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 war kein Unterschied in den einzelnen Patientengruppen nachweisbar. Sowohl in der Gruppe der gesunden Probanden ($17,29\pm 5,50\%$ vs. $15,49\pm 7,14\%$; $p=0,852$), als auch in der Gruppe der Patienten unter Therapie ($5,23\pm 2,73\%$ vs. $4,21\pm 1,85\%$; $p=0,768$) und in der Gruppe der Therapienaiven ($4,16\pm 0,63\%$ vs. $5,39\pm 1,45\%$; $p=0,456$) konnte kein Unterschied durch die vorherige P18-Inkubation gezeigt werden, siehe Abb. 22.

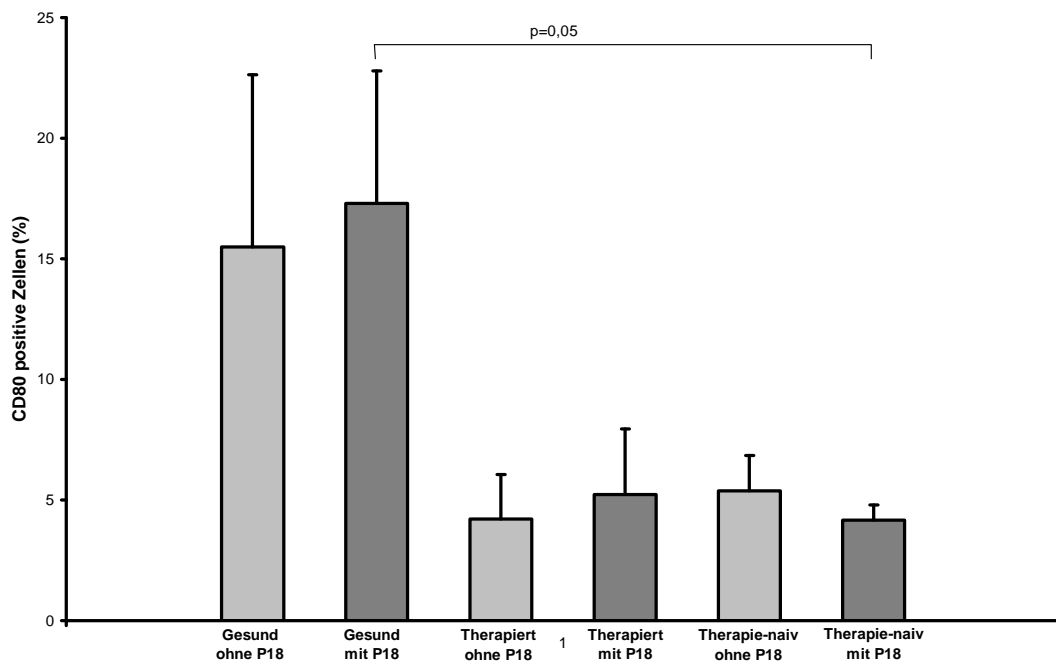


Abbildung 22: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CD80 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapienaiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen mit und ohne vorherige Inkubation mit P18); 3 gesunde Probanden, 4 Patienten unter Kombinationstherapie, 6 therapie-naive Patienten

4.2.2.2. Einfluss auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69

Um den Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokinsekretion auf die Funktion CD8 positiver Lymphozyten zu untersuchen, wurde die Oberflächenexpression des Aktivitätsmarkers CD69 auf CD8 positiven Lymphozyten gesunder Probanden untersucht.

Die Untersuchungen zur Oberflächenexpression von CD69 erfolgten wie oben für CCR7 beschrieben.

Nach Inkubation der CD8 positiven Zellen mit den NK-Zell-Überständen, die in Abwesenheit von P18 generiert worden waren, lag die Oberflächenexpression von CD69 in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden nicht über der Expression in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Kombinationstherapie ($31,04 \pm 12,97\%$ vs. $17,87 \pm 8,55\%$; $p=0,486$) und ebenfalls nicht über der Expression in den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($31,04 \pm 12,97\%$ vs. $26,07 \pm 4,88\%$; $p=0,797$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 zeigte sich in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden keine höhere Expression als in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie ($26,00 \pm 5,76\%$ vs. $16,59 \pm 10,15\%$; $p=0,504$) und ebenfalls keine Änderung im Vergleich zu den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($26,00 \pm 5,76\%$ vs. $29,80 \pm 4,46\%$; $p=0,606$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 war kein Unterschied innerhalb der einzelnen Patientengruppen nachweisbar. Es konnte weder ein Expressionsunterschied zwischen den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden ($26,00 \pm 5,76\%$ vs. $31,04 \pm 12,97\%$; $p=0,757$), noch zwischen den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie ($16,59 \pm 10,15\%$ vs. $17,87 \pm 8,55\%$; $p=0,932$) oder zwischen den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($29,80 \pm 4,46\%$ vs. $26,07 \pm 4,88\%$; $p=0,587$) wahrgenommen werden, siehe Abb. 23.

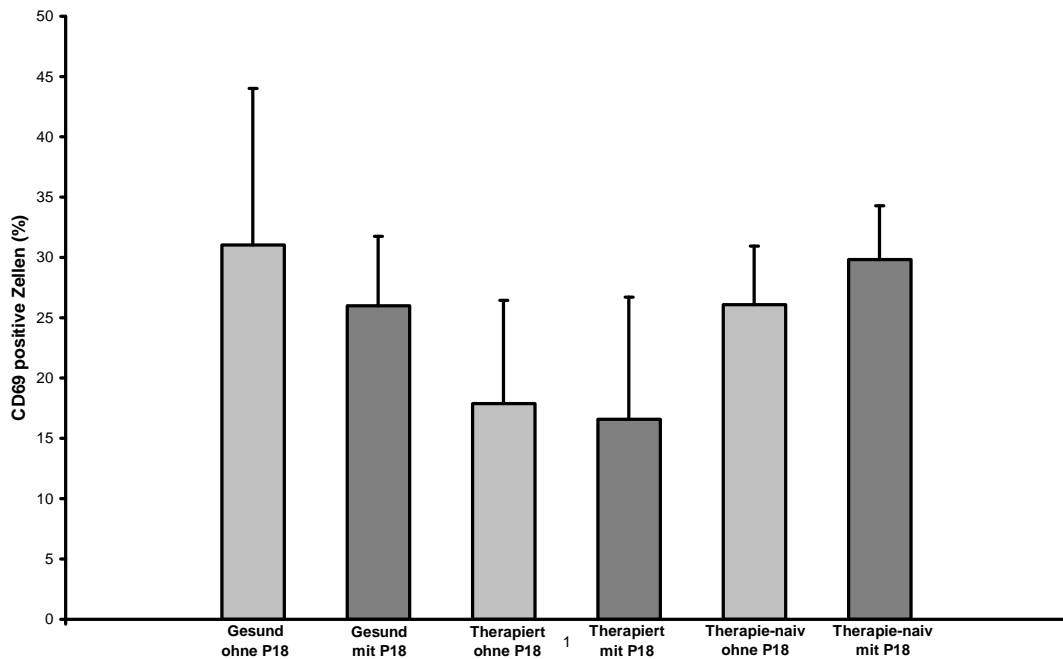


Abbildung 23: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CD69 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapienaiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen mit und ohne vorherige Inkubation mit P18); 2 gesunde Probanden, 2 Patienten unter Kombinationstherapie, 4 therapie-naive Patienten

4.3 Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokinsekretion auf die Zytotoxizität CD8 positiver Lymphozyten

Der Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokinsekretion auf die Zytotoxizität CD8 positiver Lymphozyten wurde durch die Messung der Oberflächenexpression von CD107a bestimmt.

Es wurde die Expression von CD107a an der Zelloberfläche von sechs gesunden Probanden mit der Expression von sechs Patienten unter Kombinationstherapie und sieben therapie-naiven Patienten verglichen.

Zunächst wurden alle CD8 positiven Lymphozyten zusammen analysiert, danach getrennt nach CD8 Zellen mit niedriger und hoher CD8 Oberflächenexpression. Alle Ergebnisse wurden jeweils mit und ohne Zugabe von OKT ausgewertet, die Ergebnisse ohne OKT werden hier nicht dargestellt.

4.3.1 Veränderung der Zytotoxizität aller CD8 positiven T-Zellen

Mit OKT lag ohne vorherige Inkubation mit P18 die Oberflächenexpression von CD107a in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden nicht über der Expression in den Proben

mit den Überständen der Patienten unter Kombinationstherapie (4,03+/-1,36% vs. 2,67+/-1,07%; $p=0,448$) und ebenso nicht über der Expression in den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten (4,03+/-1,36% vs. 1,92+/-0,66%; $p=0,190$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 waren diese Unterschiede aber hochsignifikant. Es zeigte sich in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden eine signifikant höhere Expression als in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie (1,94+/-0,21% vs. 0,87+/-0,06%; $p=0,001$). In den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden war kein Unterschied zu den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Probanden zu erkennen (1,94+/-0,21% vs. 1,95+/-0,30%; $p=0,984$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 war in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden keine Änderung der CD107a Expression nachweisbar (1,94+/-0,21% vs. 4,03+/-1,36%; $p=0,160$), in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie (0,87+/-0,06% vs. 2,67+/-1,07%; $p=0,129$) und in den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten zeigte sich nach vorheriger Inkubation mit P18 ebenfalls kein Unterschied (1,95+/-0,30% vs. 1,92+/-0,66%; $p=0,971$), siehe Abb. 24.

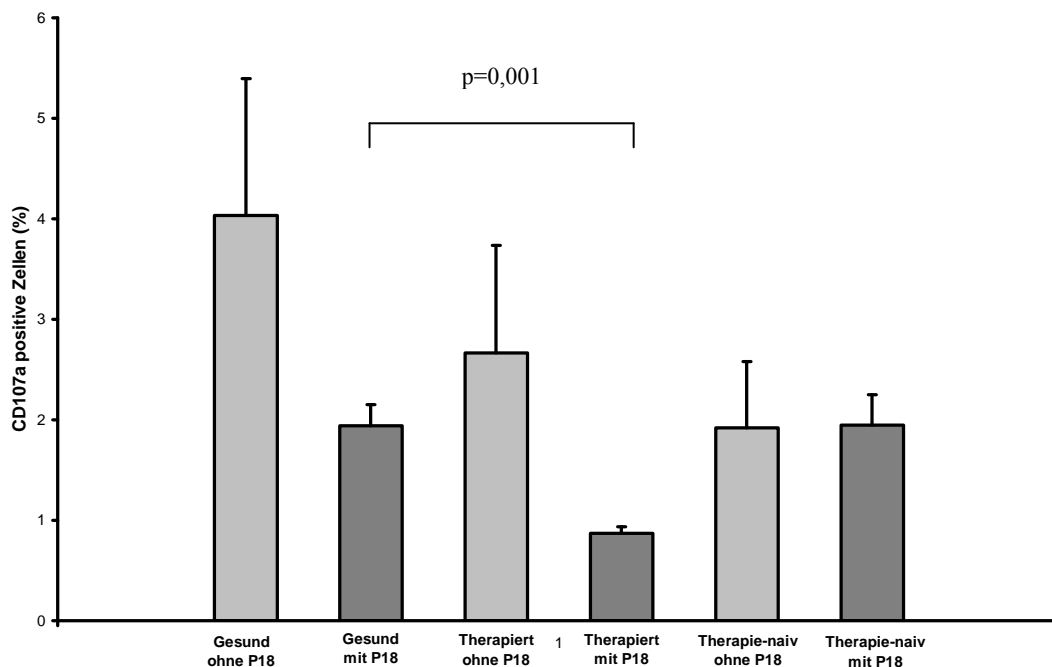


Abbildung 24: CD107a Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der Veränderung der Zytotoxizität der CD8 positiven T-Lymphozyten bei Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (mit und ohne vorherige Inkubation mit P18), vorherige Stimulation durch OKT. Alle CD8+ Lymphozyten (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten)

4.3.2 Veränderung der Zytotoxizität in der stark CD8 positiven T-Zell-Subpopulation

Bei den CD8 positiven Lymphozyten mit hoher Oberflächenexpression von CD8 (CD8 high Zellen) lag ohne vorherige Inkubation mit P18 die Oberflächenexpression von CD107a in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden nicht über der Expression in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Kombinationstherapie ($4,08 \pm 1,59\%$ vs. $2,49 \pm 1,12\%$; $p=0,434$). Gegenüber den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten zeigte sich ebenfalls kein Unterschied ($4,08 \pm 1,59\%$ vs. $1,25 \pm 0,40\%$; $p=0,113$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 waren die Ergebnisse ähnlich. In den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie ($1,58 \pm 0,16\%$ vs. $1,00 \pm 0,24\%$; $p=0,069$) und ebenfalls kein Unterschied gegenüber den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($1,58 \pm 0,16\%$ vs. $1,41 \pm 0,24\%$; $p=0,567$).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 war in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden ($1,58 \pm 0,16\%$ vs. $4,08 \pm 1,59\%$; $p=0,150$) keine signifikante Änderung der CD107a Expression nachweisbar, dasselbe galt für die Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie ($1,00 \pm 0,24\%$ vs. $2,49 \pm 1,12\%$; $p=0,221$) und die Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($1,41 \pm 0,24\%$ vs. $1,25 \pm 0,40\%$; $p=0,734$), siehe Abb. 25.

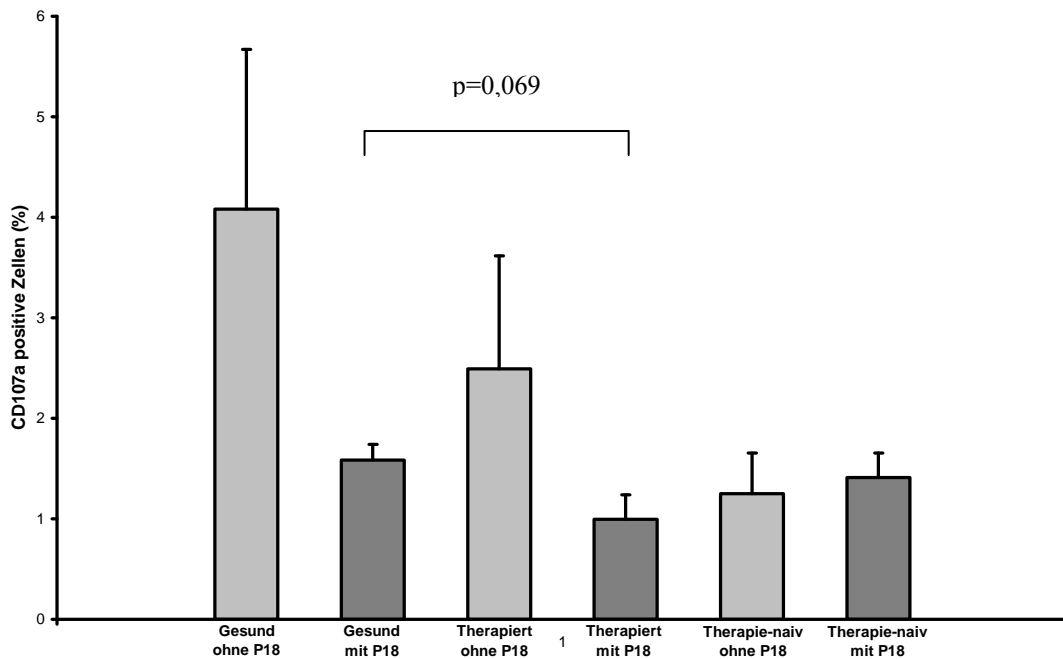


Abbildung 25: CD107a Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität der CD8 positiven T-Lymphozyten bei Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (ohne bzw. mit vorheriger Inkubation mit P18), vorherige Stimulation durch OKT. Nur CD8+ high Zellen (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten)

4.3.3 Veränderung der Zytotoxizität in der niedrig CD8 positiven T-Zell-Subpopulation

Bei den CD8 positiven Lymphozyten mit niedriger Oberflächenexpression von CD8 (CD8 low Zellen) zeigte sich ohne vorherige Inkubation mit P18, dass sich die Oberflächenexpression von CD107a in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden im Vergleich zu der Expression in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Kombinationstherapie (4,26+/-0,63% vs. 3,40+/-0,80%; p=0,416) nicht änderte. In den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden zeigte sich ebenfalls kein Unterschied im Vergleich zu den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie (4,26+/-0,63% vs. 5,05+/-1,63%; p=0,661).

Auch nach vorheriger Inkubation mit P18 war keine Änderung zwischen den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden und den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie (3,87+/-0,96% vs. 2,81+/-0,98%; p=0,461) erkennbar, sowie kein Unterschied zu den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten (3,87+/-0,96% vs. 4,14+/-0,64%; p=0,876).

Nach vorheriger Inkubation mit P18 war in allen drei Probandengruppen keine Änderung der CD107a Oberflächenexpression erkennbar: in den Proben mit den Überständen der gesunden

Probanden ($3,87 \pm 0,96\%$ vs. $4,26 \pm 0,63\%$; $p=0,738$) waren die Ergebnisse ähnlich wie in den Proben mit den Überständen der Patienten unter Therapie ($2,81 \pm 0,98\%$ vs. $3,40 \pm 0,80\%$; $p=0,655$) und in den Proben mit den Überständen der therapie-naiven Patienten ($4,14 \pm 0,64\%$ vs. $5,05 \pm 1,63\%$; $p=0,614$), siehe Abb. 26.

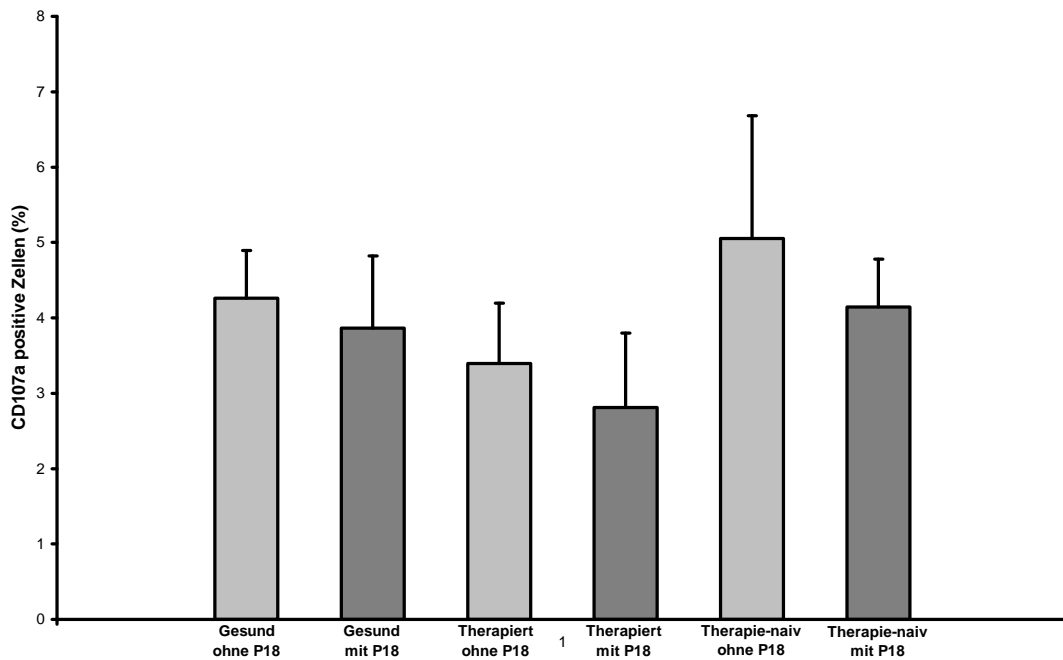


Abbildung 26: CD107a Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität der CD8 positiven T-Lymphozyten bei Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (ohne bzw. mit vorheriger Inkubation mit P18), vorherige Stimulation durch OKT. Nur CD8⁺ low Zellen (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten)

5. Diskussion

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus verläuft ohne antivirale Therapie in den meisten Fällen chronisch, obwohl der Mensch ein funktionierendes Immunsystem besitzt. Somit scheint das Virus über effektive Strategien zu verfügen, um der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang nur unzureichend verstanden. Eine steigende Anzahl an Publikationen belegt, dass der Störung der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort eine besondere Bedeutung zukommt.

Die Funktion von CD8⁺ T-Lymphozyten wird primär über Signale reguliert, die über den T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelt werden. Zudem sind hierbei jedoch auch auf CD8⁺ T-Zellen exprimierte NK Zell-Rezeptoren (NKR), und hier insbesondere der hemmende NKG2A-Rezeptor, von Relevanz.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die chronische Hepatitis C mit einer erhöhten Expression des hemmenden NK-Zell Rezeptors NKG2A auf NK-Zellen assoziiert ist. Gleichzeitig fand sich auch eine erhöhte intrahepatische Expression des NKG2A-Liganden HLA-E. Anhand von in vitro Versuchen konnten wir nachweisen, dass HCV für ein HLA-E-bindendes Epitop (HCV Core_{aa35-44} = P18) kodiert, welches die Oberflächenexpression von HLA-E stabilisiert. Die HCV-induzierte Erhöhung der Expression von HLA-E bei gleichzeitig erhöhter Expression von NKG2A führte hierbei zu einer Hemmung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen.

Unklar blieb jedoch, wie sich dies auf die Freisetzung von Zytokinen und die dadurch vermittelte Interaktion von NK-Zellen mit CD8⁺ T-Zellen auswirkt, und ob bei der chronischen Hepatitis C auch auf CD8⁺ T-Zellen die NKG2A-Expression verändert ist.

5.1 Expression und funktionelle Bedeutung des NKG2A-Rezeptors auf CD8 positiven T-Lymphozyten bei der chronischen Hepatitis C

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass Patienten mit chronischer Hepatitis C eine signifikant höhere Anzahl NKG2A-positiver CD8-Lymphozyten aufweisen als gesunde Personen und Patienten, die nach Kombinationstherapie mit Interferon α und Ribavirin HCV RNA (-) waren.

Die exakte funktionelle Bedeutung der NKG2A-Expression auf CD8⁺ T-Zellen ist momentan noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise ist dieser Rezeptor über Erhöhung der

Reizschwelle für TCR-vermittelte Signale an der Feineinstellung der CD8⁺ T-Zell Antwort und damit auch an der Toleranz-Vermittlung beteiligt. In Übereinstimmung mit diesem Konzept konnte gezeigt werden, dass über NKG2A die Zytokinsekretion und zytolytische Aktivität von Antigen-spezifischen T-Zellen gehemmt wird. Zudem wurde die Unfähigkeit der antiviralen CD8⁺ T-Zellen zur Kontrolle Virus-induzierter Tumoren der Hochregulation von CD94/NKG2A Rezeptoren auf T-Zellen zugeschrieben (Moser et al., 2002). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese könnte die Hochregulation von NKG2A durch chronische Exposition gegenüber einem Pathogen ein Mechanismus sein, klonale Erschöpfung zu verhindern oder eine exzessive immunpathologische Antwort zu unterdrücken. Auf der anderen Seite würde ein vorzeitiges Ausschalten der T-Zell-Antwort infolge einer Induktion von NKG2A zu einer Hemmung der zellulären Immunantwort führen und damit zur viralen Persistenz beitragen (Jabri et al., 2002; Moser et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit führte die Ko-Stimulation von NKG2A und des TCR zu einer Hemmung der TCR-vermittelten zytolytischen Funktion von T-Lymphozyten. In Übereinstimmung mit der erhöhten NKG2A-Expression auf CD8⁺ T-Zellen bei der chronischen Hepatitis C war dieser Effekt besonders ausgeprägt bei CD8⁺ T-Zellen von HCV-infizierten Patienten nachweisbar. Möglicherweise exprimieren manche T-Zellen sowohl den aktivierenden NKG2C- als auch den hemmenden NKG2A-Rezeptor. Wir konnten zeigen, dass die Ko-Stimulation des T-Zell-Rezeptors und des CD94-Moleküls, welches Heterodimere mit NKG2A und NKG2C bildet, selbst jedoch nicht an der Signaltransduktion beteiligt ist, ebenfalls zu einer Verminderung der zytotoxischen T-Zell-Aktivität führt (Nattermann et al., 2005a). Dies bedeutet demnach, dass das inhibierende, NKG2A-vermittelte Signal dominant ist. Übereinstimmende Ergebnisse waren bereits von Jabri und Mitarbeitern publiziert worden (Jabri et al., 2002). Zudem zeigten CD8⁺ T-Zellen von HCV-infizierten Patienten eine reduzierte zytolytische Aktivität gegenüber Zielzellen mit einer durch das Peptid HCV Core_{aa35-44} induzierten Erhöhung der HLA-E Expression. Somit deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die simultane Hochregulation von NKG2A und seinem Liganden HLA-E im Rahmen der HCV-Infektion eine effektive Strategie des Hepatitis C Virus darstellt, um der antiviralen Aktivität von CD8-Zellen zu entgehen.

Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der natürliche Ligand von NKG2A, das nicht-klassische MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E, durch das Peptid HCV Core_{aa35-44} (P18) stabilisiert werden kann und dies ebenso wie die erhöhte NKG2A-Expression in einer gestörten zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen resultiert (Nattermann et al., 2005a). In der

vorliegenden Arbeit wurde auch für CD8⁺ T-Zellen ein vergleichbarer Effekt beobachtet. Auch hier führte die HCV Core_{aa35-44}-induzierte HLA-E Expression zu einer verminderten zytolytischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen chronisch HCV-infizierter Patienten.

Eine gestörte Aktivität von NK-Zellen (Tseng et al., 2002; Crotta et al., 2002; Ahmad et al., 2004; Jinushi et al., 2004) und CD8 positiven T-Lymphozyten (Kanto et al., 1998; Erickson et al., 2001; Lechner et al., 2000b) bei chronischer Hepatitis C ist bereits seit längerem bekannt. Wie bereits mehrfach erwähnt konnte kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Stabilisierung von HLA-E durch HCV Core_{aa35-44} (P18) zu einer gestörten zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen führt (Nattermann et al., 2005a). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte NKG2A-Expression auf CD8-positiven T-Lymphozyten mit einer erniedrigten zytotoxischen Aktivität dieser Zellen vergesellschaftet ist.

Die simultane Erhöhung der Expression von NKG2A und HLA-E bei der chronischen HCV-Infektion könnte somit effektiv sowohl die NK-Zell- (Nattermann et al., 2005a), als auch die CD8-Zell-vermittelte Immunantwort (Jabri et al., 2002; Moser et al., 2002) stören. Da die NK-Zellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind, wäre eine Hemmung der zytotoxischen Aktivität dieser Zellen vor allem in der akuten Phase der Infektion mit dem Hepatitis C Virus von Bedeutung, während eine Hemmung der CD8-vermittelten Zytotoxizität vor allem in der adaptiven, also späteren Phase der Immunantwort von Bedeutung wäre. Auf diese Weise könnte das Virus demnach mit beiden Phasen der Immunantwort interferieren.

Wie von V. Braud bereits vorgeschlagen, könnte die Hemmung der T-Zell-Immunantwort allerdings auch als positiv zu erachten sein, um Autoimmunphänomene und eine Erschöpfung des T-Zell-Pools zu verhindern (Braud et al., 2002).

Darüber hinaus sind auch andere Auswirkungen einer veränderten Oberflächenexpression von NKG2A auf CD8⁺ T-Zellen denkbar. So konnte interessanterweise z.B. durch Jinushi und Mitarbeiter gezeigt werden, dass eine erhöhte NKG2A-Expression bei chronischer Hepatitis C Infektion zu einer veränderten NK-Zell-induzierten Modulation dendritischer Zellen führt (Jinushi et al., 2004)

Die Mechanismen, die zu dieser erhöhten NKG2A-Expression auf NK-Zellen und CD8-positiven T-Lymphozyten führen, sind bisher nur unvollständig verstanden. In in-vitro-Studien wurde von Jabri und Mitarbeitern, sowie von Mingari und Mitarbeitern eine Stimulierung der NKG2A-Expression durch IL-15 (Interleukin 15) und TGF- β (Transforming Growth Factor β) vorgeschlagen (Jabri et al., 2002; Mingari et al., 2003). Auch von Ray et al. konnte im in-vitro-

Versuch eine erhöhte TGF- β Expression gezeigt werden, die eine Rolle bei der Pathogenese der HCV-assoziierten Leberzirrhose spielen könnte. Unsere Arbeitsgruppe konnte in-vivo jedoch keine unterschiedlichen Serumkonzentrationen von TGF- β und IL-15 im Vergleich zwischen HCV-infizierten Patienten und gesunden Probanden erkennen (Nattermann et al., 2005a). Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass es in-vivo zu einer Interaktion viraler Proteine mit zellulären Molekülen oder Signalwegen kommen könnte, die eine Veränderung der Zytokin-Ausschüttung bewirken könnte. So führt beispielsweise die Bindung von E2 an CD81 zu einer reduzierten CCR5-Expression, was wiederum die Expression von Integrinen verändert. Ebenso wäre eine Interaktion über andere Zytokine denkbar, die in-vivo mit der Expression von TGF- β und IL-15 interagieren. Die Tatsache, dass nach erfolgreicher Therapie der Patienten mit Interferon α und Ribavirin die Expression von NKG2A wieder sinkt, spricht für die Bedeutung der Virämie oder der viralen Replikationsmechanismen in diesem Zusammenhang.

5.2 Veränderung des Cross-Talks zwischen NK-Zellen und CD8 positiven T-Lymphozyten durch die HLA-E/NKG2A-Interaktion

5.2.1 P18 induzierte Veränderung der Zytokinsekretion

Zytokine sind wichtige Botenstoffe des Immunsystems. Die Expression der in dieser Dissertation untersuchten Zytokine ist insbesondere wichtig für die Entscheidung zur Ausbildung einer T_H1- oder einer T_H2-Immunantwort. Da diese essentiell für die Elimination oder Persistenz des Virus im Organismus ist, sollte der Einfluss der NKG2A/HLA-E Interaktion auf die Expression der Zytokine TNF- α , IL-10 und IL-6 und damit auf die Funktion der NK- und CD8-positiven T-Zellen untersucht werden.

Es konnte zwar keine signifikante, aber eine tendenzielle Abnahme der TNF- α -Sekretion der NK-Zellen bei Hepatitis C gezeigt werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte dies über die Interaktion von HLA-E mit NKG2A gesteuert werden. Dies ist von großer Bedeutung, da das von NK-Zellen gebildete T_H1-Zytokin TNF- α eine Möglichkeit der NK-Zellen darstellt, auf andere Zellen zytotoxisch zu wirken. Darüber hinaus wird über dieses Zytokin eine lokale Entzündung ausgebildet und die Expression des für die antivirale Immunantwort wichtigen T_H1-Zytokins IFN- γ verstärkt (Orange et al., 1996b). TNF- α und IFN- γ spielen im gesunden Immunsystem außerdem eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Virusreplikation (Guidotti et al., 1996a, b und 2001). Eine Abnahme der TNF- α -Sekretion über die Interaktion zwischen NKG2A und

HLA-E würde also eine Abnahme der zytotoxischen T_H1 -Antwort zugunsten der T_H2 -Antwort bedeuten.

Das zweite in dieser Versuchsreihe untersuchte Zytokin, Interleukin 10 (IL-10), stellt dagegen einen Vertreter der T_H2 -Immunantwort dar. Als solcher wirkt IL-10 entzündungshemmend. IL-10 kann allerdings nicht nur durch T_H2 -Zellen, sondern auch durch regulatorische T-Zellen gebildet werden. Für IL-10 ist beschrieben, dass es zu einer Herunterregulation proinflammatorischer (also T_H1) Zytokine führen kann (D'Andrea et al., 1993; Snijders et al., 1996) und als Antwort auf manche virale Infektionen gebildet werden kann (Mo et al., 1995). Dolganiuc und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Dendritische Zellen HCV-infizierter Patienten eine vermehrte Produktion an IL-10 aufweisen und die Sekretion von T_H1 -Zytokinen hemmen können (Dolganiuc et al., 2003a und b). Dieser Mechanismus wäre nun in ähnlicher Weise auch für NK-Zellen denkbar, obwohl die vorliegenden Daten nur auf eine erhöhte IL-10-Produktion im Verlauf der HCV-Infektion hinweisen, aber nicht deutlich zeigen können, dass diese Veränderung der IL-10-Produktion über die Interaktion zwischen HLA-E und NKG2A zustande kommt. Interessanterweise ist aber vorbeschrieben, dass IL-10 (und andere Zytokine wie IL-15 und TGF- β 1) die Expression von CD94/NKG2A auf NK-Zellen und CD8 positiven Lymphozyten erhöhen können (rev. Ahmad und Alvarez, 2004). Dies könnte Bedeutung für die mögliche Interaktion zwischen HLA-E und NKG2A haben.

Zur Produktion von IL-6 bei chronischer Hepatitis C gibt es bisher nicht viele Daten. Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten zeigen, dass HCV Core_{aa35-44} über eine Bindung an TLR-2 auf Monozyten IL-6 freisetzt (Dolganiuc et al., 2004; Feldmann et al., 2006). Darüber hinaus ist beschrieben, dass auch einige andere virale (Pulliam et al., 1995; Moskophidis et al., 1991; Kanangat et al., 1996; Ruzek et al., 1997) und bakterielle Infektionen, sowie maligne Tumoren (Kawano et al., 1988; Hess et al., 2000) die Expression von IL-6 erhöhen. Es weist außerdem eine Funktion als T_H2 -Zytokin auf (Diehl et al., 2000). Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigten eine leicht, jedoch nicht signifikant erhöhte Produktion im Vergleich zu gesunden Probanden oder Patienten unter Kombinationstherapie, was wiederum für eine Verstärkung der T_H2 - im Vergleich zur T_H1 -Antwort sprechen und die Rolle von IL-6 als antiinflammatorisches Zytokin unterstreichen würde (rev. in Tilg et al., 1997). Interessant ist in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass die monozytäre IL-1- und TNF- α -Produktion durch IL-6 gehemmt werden können (Aderka et al., 1989; Schindler et al., 1990).

Die Untersuchung dieser drei Zytokine weist auf eine interessante Tatsache hin: bei chronischer Hepatitis C scheint die T_H2 -Antwort deutlich stärker ausgeprägt zu sein als die T_H1 -Antwort. Schon mehrfach wurde die These aufgestellt, dass diese Verlagerung zugunsten einer T_H2 -Antwort ein wichtiger Mechanismus sein könnte, durch den es HCV gelingt, der antiviralen Immunantwort zu entgehen (Kamal et al., 2002; Tsai et al., 1997; Wedemeyer et al., 2002). Sowohl die T_H1 -, als auch die T_H2 -Antwort haben Vor- und Nachteile in Bezug auf eine Eliminierung oder Persistenz von HCV. Einerseits führt die zytotoxische T_H1 -Antwort zu einer Entzündungsreaktion, die wiederum mit einem ausgeprägten Leberzellschaden einhergehen kann, während die antiinflammatorische T_H2 -Antwort die Entzündungsreaktion eindämmt und einen größeren Leberzellschaden verhindert (Moser et al., 2001). Andererseits scheinen Patienten mit einer starken T_H1 -Antwort eine deutlich bessere Chance auf eine körpereigene Elimination des Hepatitis C Virus zu haben, als Patienten mit einer schwachen T_H1 -Antwort. Rosen und Mitarbeiter konnten sogar zeigen, dass die Ausprägung einer T_H1 -Antwort nach Stimulation mit dem HCV-Protein NS3 invers mit der Hepatitis C Viruslast korreliert (Rosen et al., 2002). Ebenso konnten Cramp und Mitarbeiter für die HCV-Therapie mit IFN- α und Ribavirin zeigen, dass die verstärkte Produktion des T_H2 -Zytokins IL-10 und die abgeschwächte Produktion des T_H1 -Zytokins IFN- γ in Therapiewoche 4 mit einer erhöhten Zahl an Therapieversagern einhergeht (Cramp et al., 2000).

Generell zeigt sich also im Verlauf der HCV- Infektion eine gestörte Zytokinproduktion infolge eines gestörten Gleichgewichts zwischen T_H1 - und T_H2 - Antwort. Es erscheint möglich, dass eine Subpopulation dabei besonders stark proliferiert, oder dass es über eine direkte Interaktion mit HCV in der Leber zu einer Funktionsstörung oder Kompetenz der jeweiligen Immunantwort kommen kann. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen HLA-E und NKG2A auf der Oberfläche von NK-Zellen für die veränderte Zytokinsekretion zumindest mitverantwortlich sein könnte. Deutlich ausgeprägt erscheint dieses Ergebnis allerdings nur für die Untersuchungen zu IL-10, für TNF- α und IL-6 deuten sie aber zumindest in diese Richtung.

Insgesamt muss festgehalten werden, dass es sich bei den funktionellen Untersuchungen um komplexe Experimente handelt. Wegen der begrenzten Anzahl verfügbarer Zellen konnten diese komplexen Untersuchungen daher nur bei einem Teil der Probanden und Patienten durchgeführt werden. Als Folge wurden besonders bei Untersuchung der Zytokinproduktion keine statistisch signifikanten Ergebnisse erreicht. Dennoch waren bei einem Teil der Experimente konsistente

Ergebnisse in einzelnen Gruppen zu beobachten, die nahe legen, dass den beobachteten Trends tatsächlich immunologisch relevante Effekte zugrunde liegen.

5.2.2 Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokinsekretion der NK-Zellen auf Phänotyp und Funktion CD8 positiver Lymphozyten

Die Sekretion der verschiedenen Zytokine war für die vorliegende Doktorarbeit noch in einem weiteren Zusammenhang von besonderem Interesse: es sollte untersucht werden, inwieweit die über die Interaktion von NKG2A mit HLA-E veränderte Zytokinsekretion der NK-Zellen zu einer Veränderung des Aktivierungsniveaus der Zytotoxischen T-Lymphozyten führen kann. Dieser Punkt wurde in einer nächsten Versuchsreihe untersucht, in welcher der Einfluss der Zytokin-haltigen Überstände aus der Ko-Inkubation von NK-Zellen mit HLA-E transfizierten K-562 Zellen auf Phänotyp und Funktion CD8 positiver T-Lymphozyten analysiert wurde.

5.2.2.1 Einfluss auf den Phänotyp

B5-Zellen wurden mit NK-Zellen von gesunden, therapierten und therapie-naiven Patienten inkubiert. Die Überstände aus dieser Inkubation wurden auf die CD8 Zellen gegeben. In Bezug auf die Oberflächenexpression von CCR7 zeigte sich hierbei kein Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen. Es fiel aber auf, dass die Überstände, die von NK-Zellen der Patienten unter Therapie nach vorheriger Inkubation mit P18 stammten, also an der Oberfläche HLA-E stabilisiert hatten, einen deutliche Hinweis, aber nicht signifikante Abnahme der CCR7-Oberflächenexpression auf den CD8 Zellen bewirkten. Die Oberflächenstabilisierung von HLA-E auf der Oberfläche der B5-Zellen durch P18 scheint also in diesem Fall mit einer Änderung der Zytokinsekretion durch die NK-Zellen zu korrelieren, die wiederum die CCR7-Expression auf den CD8-Zellen erhöht. Wie von Hegde et al. beschrieben, kann IL-6 über eine Suppression von CCR7 die Proliferation dendritischer Zellen hemmen (Hegde et al, 2004). Ein ähnlicher Mechanismus wäre nun hier für CD8 positive Lymphozyten ebenfalls denkbar. Die Überstände aus den Proben der therapie-naiven Patienten zeigten dagegen keinen Unterschied in der CCR7 Expression nach vorheriger Inkubation mit P18, ebenso wenig zeigte sich für die Überstände der gesunden Probanden ein Unterschied durch eine vorherige Inkubation mit P18.

Für CCR7 auf der Oberfläche CD8 positiver T-Lymphozyten wurde beschrieben, dass besonders naive CD8 Zellen diesen Oberflächenrezeptor exprimieren, während aktivierte Zellen ihn verlieren (Campbell et al., 2001). Interessant ist nun in diesem Zusammenhang, dass die Zellen

der Patienten unter Therapie eine solche Abnahme der CCR7 Oberflächenexpression und somit unter Umständen eine Zunahme der für die Immunantwort wichtigen Effektorzellen aufweisen könnten. Darüber hinaus ist für CCR7 noch bekannt, dass es die Rekrutierung und Migration dendritischer Zellen über eine Aktivierung der lymphokinen Chemokine CCL21 und CCL19 in den Lymphknoten steuert (Yanagihara et al., 1998; Forster et al., 1999). Eine gestörte CCR7-Expression könnte also auch über diesen Weg einen negativen Einfluss auf die Immunantwort haben.

Die Oberflächenexpression von CCR5 auf den CD8 positiven T-Lymphozyten änderte sich in den Experimenten für die vorliegende Doktorarbeit dagegen weder durch eine Inkubation der B5-Zellen mit P18, noch durch die Inkubation mit Überständen der drei verschiedenen Patientengruppen. In vorangehenden Arbeiten konnte allerdings generell gezeigt werden, dass CD8 positive Lymphozyten chronisch mit HCV infizierter Patienten eine erniedrigte T_H1 Sekretion, sowie signifikant erniedrigte CCR5 Expression aufweisen (Shields et al., 1999; Lechner et al., 2000b; Gruener et al., 2001; Lichterfeld et al., 2002). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen demnach, dass die in dieser Versuchsreihe benutzten Überstände und die enthaltenen Zytokine auf CD8-Zellen gesunder Probanden nicht den generell beschriebenen Effekt haben und somit auch nicht die Stabilisierung von HLA-E auf der Oberfläche der B5-Zellen und die hierdurch hervorgerufene Änderung der NK-Zell-Zytokinsekretion hierfür verantwortlich sein können.

Von Nattermann et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass das Hepatitis C Virus über HCV E2 envelope Protein direkt eine Internalisierung von CCR5 induzieren kann (Nattermann et al., 2004). Dagegen konnte von Shields et al. gezeigt werden, dass T-Lymphozyten in der Leber während einer chronischen HCV-Infektion eine hohe Oberflächenexpression von CCR5 aufweisen (Shields et al., 1999). Da es sich bei Lymphozyten mit hoher CCR5-Expression um Zellen handelt, die T_H1 -Zytokine produzieren (Loetscher et al., 1998; Luster et al., 1998; Qin et al., 1998), würde dies für eine T_H1 -Reaktion in der Leber sprechen, was wiederum einerseits zu einer suffizienten Immunantwort, andererseits auch zu einem deutlichen Leberschaden führen kann (Apolinario et al., 2002; Boisvert et al., 2003).

Die durch die NK-Zell-Interaktion mit den B5-Zellen induzierte Veränderung der Zytokinsekretion bewirkte, dass die Oberflächenexpression von CD80 auf den CD8 positiven T-Zellen nach Inkubation mit den Überständen gesunder Probanden höher war als nach Inkubation mit den Überständen therapierter oder therapie-naiver Probanden. Nach vorheriger Inkubation der

B5-Zellen mit P18 waren diese Unterschiede noch wesentlich deutlicher und für die Gruppe der therapienaiven Patienten sogar signifikant ausgeprägt. Für CD80 gilt also, dass seine Oberflächenexpression bei einer Hepatitis C Infektion deutlich herabreguliert wird und dass dies mit der Stabilisierung von HLA-E durch P18 und der dadurch hervorgerufenen Änderung der Zytokinsekretion der NK-Zellen korreliert.

5.2.2.2 Einfluss auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69

Bei CD69 handelt es sich um einen frühen Aktivierungsmarker. Die Oberflächenexpression von CD69 auf den CD8-positiven T-Lymphozyten zeigte nach Stimulation mit den Überständen der NK-Zell/B5-Zell-Inkubation von gesunden und therapie-naiven Patienten keinen erkennbaren Unterschied. Ebenfalls erbrachte die die Stabilisierung von HLA-E durch P18 keine wesentliche Änderungen der Expression.

5.3 Einfluss der HLA-E induzierten Veränderung der Zytokinsekretion auf die Zytotoxizität CD8 positiver T-Lymphozyten

In dieser Versuchsreihe wurde die Oberflächenexpression des Zytotoxizitätsmarkers CD107a untersucht um herauszufinden, welche funktionelle Auswirkung die durch die B5/NK-Zell-Interaktion hervorgerufene Veränderung der Zytokinsekretion auf die Zytotoxizität CD8 positiver T-Lymphozyten hat. Die Ergebnisse wurden getrennt für alle CD8 positiven Zellen, sowie für CD8 Zellen mit hoher bzw. niedriger Oberflächenaktivität von CD8 dargestellt. Hier konnte in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden und der Patienten unter Therapie durch die Inkubation mit P18 eine Abnahme der Zytotoxizität festgestellt werden. In den Proben mit den Überständen der therapienaiven Probanden zeigte eine B5-Zell-Inkubation mit P18 dagegen keine Veränderung der Zytotoxizität. Für die CD8 positiven Zellen mit hoher Oberflächenexpression von CD8 wiesen die Ergebnisse in dieselbe Richtung wie die Ergebnisse aus der Auswertung aller CD8 positiven Lymphozyten. Die Tatsache, dass in den Proben mit den Überständen der gesunden Probanden nach Inkubation mit P18 keine Abnahme der Zytotoxizität zu erkennen war, könnte darauf hinweisen, dass in diesen Proben allein durch die vorliegende Infektion bereits eine maximale Abnahme der Zytotoxizität erfolgt war und diese somit nicht weiter erniedrigt werden konnte. Möglicherweise wird auf diese Weise im Rahmen der Infektion mit dem Hepatitis C Virus über die durch die NK-Zellen freigesetzten Zytokine also auch die

zytotoxische Funktion der CD8 positiven T-Lymphozyten massiv gehemmt, was natürlich andererseits auch bedeutet, dass es zu einem deutlich geringeren Gewebeuntergang kommt.

Die Zellen mit niedriger CD8 Oberflächenexpression zeigten andere Befunde. Die Wirkung der Inkubation mit P18 führte in keiner der drei Versuchsgruppen zu einer Abnahme der Oberflächenexpression. Insgesamt variierte außerdem die Zytotoxizität zwischen den verschiedenen Probandengruppen weniger stark als bei allen CD8 positiven Zellen bzw. den Zellen mit hoher CD8 Oberflächenexpression. Der Effekt einer reduzierten Zytotoxizität scheint also insbesondere für die CD8 Zellen mit hoher Oberflächenexpression von CD8 zu gelten, die CD8 positiven Lymphozyten mit niedriger Oberflächenexpression von CD8 scheinen an diesem Effekt zu einem deutlich geringeren Anteil beteiligt zu sein, evtl. aufgrund eines niedrigen Bestandes mit Oberflächenrezeptoren, die für diesen Effekt verantwortlich sind.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse also, dass die Stabilisierung von HLA-E durch P18 und die dadurch veränderte Zytokinsekretion der NK-Zellen zu einer reduzierten Zytotoxizität der CD8-Zellen führen könnte, was wiederum besonders für die CD8-Zellen mit hoher Oberflächenexpression von CD8, nicht jedoch für jene mit niedriger Oberflächenexpression von CD8 zu gelten scheint.

Interessanterweise ist auch im Rahmen einer Infektion mit dem HI-Virus eine Reduktion der CD107a-Produktion durch die NK-Zellen beschrieben (Alter et al., 2005), was dafür spricht, dass es sich bei einer Herabsetzung der Zytotoxizität um einen generellen Mechanismus der RNA-Viren zur Schwächung des Immunsystems handeln könnte.

6. Zusammenfassung

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitig erhöhte Expression von HLA-E und NKG2A zu einer Hemmung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen führte. Unklar blieb jedoch, auf welchem Wege und in wie starkem Maße sich diese Veränderung auf die CD8 positiven T-Lymphozyten auswirken kann.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit zeigte sich zusammenfassend zunächst, dass es im Rahmen einer chronischen HCV-Infektion zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression von NKG2A auf CD8 positiven T-Lymphozyten kommt. Darüber hinaus zeigte sich, dass diese Zellen besonders leicht hemmbar waren, zum einen über die Ko-Stimulation von NKG2A und des TCR, die zu einer Hemmung der TCR-vermittelten zytolytischen Funktion von T-Lymphozyten führte. Dieser Effekt war in Übereinstimmung mit der erhöhten NKG2A-Expression auf CD8+ T-Zellen bei der chronischen Hepatitis C bei CD8+ T-Zellen von HCV-infizierten Patienten besonders ausgeprägt nachweisbar. Zum anderen zeigte sich, dass die zytolytische Aktivität dieser Zellen auch durch die Stabilisierung von HLA-E durch HCV Core_{aa35-44} gehemmt werden konnte. Dieser Effekt war bei Zellen von chronisch mit HCV infizierten Patienten deutlicher ausgeprägt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der HCV-Infektion durch die Interaktion von HLA-E mit NKG2A zu keiner klaren Änderung in der Produktion des T_H1 Zytokins TNF- α kam. Es zeigte sich zwar die Tendenz zu einer erniedrigten Produktion, diese war jedoch nicht signifikant. Außerdem schien es im Rahmen der Infektion ebenfalls zu einer, wenn auch nicht signifikanten, erhöhten Produktion des T_H2-Zytokins IL-6 durch die NK-Zellen zu kommen, was eine Verschiebung der Immunantwort in Richtung einer T_H2-dominanten und somit immunsuppressiven Zytokinbildung bedeuten würde. In Bezug auf das T_H2-Zytokin IL-10 dagegen zeigte sich eine signifikant erhöhte Produktion im Rahmen der HCV-Infektion, und zwar sowohl im Vergleich zwischen gesunden Probanden und therapie-naiven Patienten, als auch im Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten unter Kombinationstherapie.

Die veränderte Zytokinsekretion scheint außerdem zumindest in der Tendenz einen Einfluss auf die CD107a Oberflächenexpression der CD8 positiven T-Lymphozyten (und hier insbesondere auf die Subpopulation mit hoher CD8 Oberflächenexpression) zu haben, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit darauf hinweist, dass die Zytotoxizität der CD8 positiven T-Zellen infolge der veränderten Zytokinsekretion abnehmen könnte.

Außerdem wurde die Bedeutung der veränderten Zytokinsekretion für die Funktion der CD8 positiven T-Lymphozyten untersucht. In diesem Rahmen zeigte sich, dass es durch die veränderte NK-Zell Zytokinbildung zu keiner Änderung der CCR5-, CCR7- und CD69-Expression auf den CD8-Zellen kam. Es konnte aber gezeigt werden, dass es zu einer verminderten CD80-Oberflächenexpression kam, die konsistent war, aber nur im Vergleich der therapie-naiven Patienten und der gesunden Probanden nach Inkubation mit P18 zu einem signifikanten Ergebnis führte. Es erscheint also plausibel, dass die veränderte Zytokinsekretion diese Veränderungen für CD80 auf der Oberfläche der CD8 positiven Lymphozyten hervorrief, während die in der Literatur beschriebene Änderung der CCR5-Oberflächenexpression (Shields et al., 1999; Lechner et al., 2000a und b; Gruener et al., 2001; Lichterfeld et al., 2002) auf andere Zellinteraktionen zurückzuführen sein müsste.

Die Stabilisierung von HLA-E, dessen Interaktion mit NKG2A und die über eine veränderte NK-Zell-Zytokinbildung übertragenen Wirkungen auf die CD8 positiven T-Zellen scheinen also Möglichkeiten des Hepatitis C Virus zu sein, der Immunantwort zu entgehen und so zu einer Chronifizierung der Infektion beizutragen.

7. Abbildungsnachweis

Abbildung 1: links: Ein inhibitorischer Rezeptor (KIR) erkennt MHC-I-Moleküle und gewährleistet durch seine Aktivierung, dass die NK-Zelle sich nicht gegen die körpereigene Zelle richtet. rechts: NK-Zellen werden durch infizierte Zellen mit verringerter MHC-I-Expression aktiviert (nach Vollmar und Dingermann, 2005)	11
Abbildung 2: Untergruppen der CD4-positiven T-Zellen und deren Funktionen (nach Vollmar und Dingermann, 2005)	14
Abbildung 3: Unterteilung der T-Lymphozyten aufgrund von Oberflächenmarkern (nach Vollmar und Dingermann, 2005)	15
Abbildung 4: Struktur von MHC-I- und MHC-II-Molekülen (nach Vollmar und Dingermann, 2005)	18
Abbildung 5: Prozessierung von Protein-Antigenen, MHC-I- und MHC-II-Pathway (nach Vollmar und Dingermann, 2005)	19
Abbildung 6: Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (nach Janeway und Travers, 1997).....	30
Abbildung 7: Prinzip der Isolation verschiedener Zellpopulationen mittels magnetischer Beads (nach Janeway und Travers, 1997).....	32
Abbildung 8: Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS) am Beispiel CD4 positiver Lymphozyten (nach Vollmar und Dingermann, 2005)	35
Abbildung 9: Bestimmung der Zytotoxizität von aktivierten CD8-positiven Zellen (nach Vollmar und Dingermann, 2005)	42
Abbildung 10: Prinzip des Sandwich-ELISA (nach Vollmar und Dingermann, 2005).....	45
Abbildung 11: FACS-Analyse der NKG2A-Expression CD8 positive Lymphozyten gesunder (n=10), HCV-positiver (n=20) und unter Therapie wieder HCV-negativ gewordener (n=10) Probanden.....	47
Abbildung 12: Re-directed Lysis Assay in Anwesenheit eines Anti-CD3- und eines Anti-NKG2A-Antikörpers. Untersuchung der Funktion von NKG2A auf CD8 positiven T-Zellen bei gesunden Probanden, HCV-positiven Patienten ohne Therapie und Patienten, die unter Therapie wieder HCV negativ wurden.	48
Abbildung 13: Lyse von HLA-E-transfizierten K-562-Zellen mit oder ohne HCV Core _{aa35-44} durch NK-Zellen bei gesunden Probanden (hell) und HCV positiven Patienten (dunkel), gemessen im Zytotoxizitätsassay, repräsentative Daten aus drei Experimenten	48
Abbildung 14: Messung der Zytotoxizität im Re-directed Lysis Assay mit K-562-Zellen als Zielzellen mit und ohne Stabilisierung von HLA-E durch HCV Core _{aa35-44} . CD8 positive Lymphozyten mit Anti-CD3 stimuliert (3 Experimente).....	49
Abbildung 15 Intrazelluläre FACS-Analyse zur Bestimmung der TNF- α -Sekretion bei Inkubation von K-562-Zellen (ohne bzw. mit Stabilisierung von HLA-E durch P18) mit NK-Zellen (10 gesunde Probanden, 23 Patienten unter Kombinationstherapie, 8 therapie-naive Patienten)	51
Abbildung 16: TNF- α -ELISA zur Bestimmung der Veränderung der Zytokinsekretion bei Inkubation von NK-Zellen und K-562-Zellen mit bzw. ohne vorherige Stabilisierung von HLA-E durch P18 (7 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 5 therapie-naive Patienten).....	52
Abbildung 17: Intrazelluläre FACS-Analyse zur Bestimmung der IL-10-Sekretion bei Inkubation von K-562-Zellen (mit bzw. ohne Stabilisierung von HLA-E durch P18) mit NK-Zellen (10 gesunde Probanden, 23 Patienten unter Kombinationstherapie, 8 therapie-naive Patienten)	53

Abbildung 18: IL-10-ELISA zur Bestimmung der Veränderung der Zytokinsekretion bei Inkubation von NK-Zellen und K-562-Zellen mit bzw. ohne vorherige Stabilisierung von HLA-E durch P18 (3 gesunde Probanden, 5 Patienten unter Kombinationstherapie, 5 therapie-naive Patienten).....	54
Abbildung 19: IL-6-ELISA zur Bestimmung der IL-6-Sekretion bei Inkubation von K-562-Zellen (ohne bzw. mit Stabilisierung von HLA-E durch P18) mit NK-Zellen (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 8 therapie-naive Patienten).....	55
Abbildung 20: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CCR7 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapienaiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen, mit und ohne vorherige Stabilisation von HLA-E durch P18); 3 gesunde Probanden, 4 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten	57
Abbildung 21: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CCR5 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapienaiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen mit und ohne vorherige Inkubation mit P18); 3 gesunde Probanden, 4 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten	58
Abbildung 22: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CD80 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapienaiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen mit und ohne vorherige Inkubation mit P18); 3 gesunde Probanden, 4 Patienten unter Kombinationstherapie, 6 therapie-naive Patienten	59
Abbildung 23: FACS-Analyse zur Veränderung der Oberflächenexpression von CD69 auf CD8 positiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (Überstände der Inkubation von NK-Zellen gesunder Probanden, therapienaiver Patienten und Patienten unter Therapie mit K-562-Zellen mit und ohne vorherige Inkubation mit P18); 2 gesunde Probanden, 2 Patienten unter Kombinationstherapie, 4 therapie-naive Patienten	61
Abbildung 24: CD107a Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der Veränderung der Zytotoxizität der CD8 positiven T-Lymphozyten bei Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (mit und ohne vorherige Inkubation mit P18), vorherige Stimulation durch OKT. Alle CD8+ Lymphozyten (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten)	62
Abbildung 25: CD107a Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität der CD8 positiven T-Lymphozyten bei Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (ohne bzw. mit vorheriger Inkubation mit P18), vorherige Stimulation durch OKT. Nur CD8+ high Zellen (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten).....	64
Abbildung 26: CD107a Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität der CD8 positiven T-Lymphozyten bei Inkubation mit den Überständen aus den Stimulationsexperimenten (ohne bzw. mit vorheriger Inkubation mit P18), vorherige Stimulation durch OKT. Nur CD8+ low Zellen (6 gesunde Probanden, 6 Patienten unter Kombinationstherapie, 7 therapie-naive Patienten).....	65

8. Literaturverzeichnis

Aderka D, Le JM, Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 1989; 143: 3517-3523

Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 743-759

Algarra I, Cabrera T, Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol* 2000; 61: 65-73

Allan DS, Colonna M, Lanier LL, Churakova TD, Abrams JS, Ellis SA, McMichael AJ, Braud VM. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1149-1156

Allan PM, Campbell D, Cresswell P, DeFranco A, Germain RN, Malissen B. Die adaptive Immunantwort. In: Janeway CA, Travers P, Hrsg. *Immunologie*. Heidelberg – Berlin – Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1997: 277-290

Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, Streeck H, Johnston MN, Staller KD, Zaman MT, Yu XG, Lichterfeld M, Basgoz N, Rosenberg ES, Altfeld M. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 2005; 106: 3366-3369

Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S93-98

Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, Kramer E, Miller JK, Mandel E, Hadler SC, Margolis HS. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA* 1989; 262: 1201-1205

Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Imawari M. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol* 1997; 158: 5283-5291

Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Pérez E, Saez A, Lozano C, Vargas J, García-Monzón C. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2861-2870

Barakonyi A, Kovacs KT, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J. Recognition of nonclassical HLA class I antigens by gamma delta T cells during pregnancy. *J Immunol* 2002; 168: 2683-2688

Bellon T, Heredia AB, Llano M, Minguela A, Rodriguez A, Lopez-Botet M, Aparicio P. Triggering of effector functions on a CD8+ cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer. *J Immunol* 1999; 162: 3996-4002

Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003; 281: 65-78

Biassoni R, Falco M, Cambiaggi A, Costa P, Verdiani S, Pende D, Conte R, Di Donato C, Parham P, Moretta L. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J Exp Med* 1995; 182: 605-609

Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and coreceptors. *Immunol Rev* 2001; 181: 203-214

Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220

Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Ehrlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham B, Sasazuki T. Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens* 1994. 44: 1-18

Boisvert J, Kunkel EJ, Campbell JJ, Keeffe EB, Butcher EC, Greenberg HB. Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *J Hepatol* 2003; 38: 67-75

Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2A confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 1998; 187: 813-818

Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97:7

Braud VM, Aldemir H, Breart B, Ferlin WG. Expression of CD94-NKG2A inhibitory receptor is restricted to a subset of CD8+ T cells. *Trends Immunol* 2003; 24: 162-164

Braud VM, Allan SJ, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B, and C. *Nature* 1998; 391: 795-799

Braud VM, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at position 2 and 9. *Eur J Immunol* 1997. 27: 1164-1169

Braud VM, Tomasec P, Wilkinson GW. Viral evasion of natural killer cells during human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 269: 117-129

Brooks AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borrego F, Coligan JE. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* 1997; 185: 795-800

Brown AM, Wright KL, Ting JP. Human major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene promoter. Functional analysis and in vivo protein/DNA interactions of constitutive and IFN--gamma-induced expression. *J Biol Chem* 1993; 268: 26328-26333

Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, Pappalardo B, Kleinman SH, NHLBI-REDS NAT Study Group. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion* 2005; 45: 254-264

Byrne P, McGuirk P, Todryk S, Mills KH. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2579-2588

Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC, Wu L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 2001; 166: 877-884

Carretero M, Cantoni C, Bellon T, Bottino C, Biassoni R, Rodriguez A, Perez-Villar JJ, Moretta L, Moretta A, Lopez-Botet M. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1997; 27: 563-567

Chander G, Sulkowski MS, Jenckes MW, Torbenson MS, Herlong HF, Bass EB, Gebo KA. Treatment of chronic hepatitis C: a systemic review. *Hepatology* 2002; 36: S135-144

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362

Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, Angman L, Cella M, Lopez-Botet M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1809-1818

Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, Cheung L, DiBisceglie A, Hoofnagel J, Shih JW, Kaslow R, Ness P, Alter HJ. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 1734-1735

Cooper MA, Fehninger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-640

Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 451-457

Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997; 7: 273-282

Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000; 118: 346-355

Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002; 195: 35-41

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-1048

Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincón M. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 2000; 13: 805-815

Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 85: 439-462

Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L jr, Mandrekar P, Zapp M, Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003a; 170: 5615-5624

Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Mandrekar P, Szabo G. Additive inhibition of dendritic cell allostimulatory capacity by alcohol and hepatitis C is not restored by DC maturation and involves abnormal IL-10 and IL-2 induction. *Alcohol Clin Exp Res* 2003b; 27: 1023-1031

Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, Kurt-Jones E, Szabo G. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 2004; 127: 1513-1524

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. *J Hepatol* 1999. 31: 3-8

Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15: 883-895

Feldmann G, Nischalke HD, Nattermann J, Banas B, Berg T, Teschendorf C, Schmiegel W, Dührsen U, Halangk J, Iwan A, Sauerbruch T, Caselmann WH, Spengler U. Induction of interleukin-6 by hepatitis C virus core protein in hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4491-4498

Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33

Garcia P, Llano M, de Heredia AB, Willberg CB, Caparros E, Aparicio P, Braud VM, Lopez-Botet M. Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol* 2002; 32: 936-944

Germain RN, Braunstein NS, Brown MA, Glimcher LH, Lechler RI, McCluskey J, Margulies DH, Miller J, Norcross MA, Paul WE, Quill H, Ronchese F. *Mt Sinai J Med* 1986; 53: 194-201

Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992; 357: 375-379

Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8⁺ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001; 75: 5550-5558

Guidotti LG, Borrow P, Hobbs MV, Matzke B, Gresser I, Oldstone MB, Chisari FV. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a; 93: 4589-4594

Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996b; 8: 478-483

Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91

Gumperz JE, Barber LD, Valiante NM, Percival L, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB 1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol* 1997; 158: 1660-1669

Hata K, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL. Natural killer activity of human liver-derived lymphocytes in various liver diseases. *Hepatology* 1991; 14: 495-503

Hegde S, Pahne J, Smola-Hess S. Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB J* 2004; 18: 1439-1441

Heintges T, Wanders JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997; 26: 521-526

Hess S, Smola H, Sandaradura De Silva U, Hadaschik D, Kube D, Baldus SE, Flucke U, Pfister H. Loss of IL-6 receptor expression in cervical carcinoma cells inhibits autocrine IL-6 stimulation: abrogation of constitutive monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* 2000; 165: 1939-1948

Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y, Jones EA. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 1986; 315: 1575-1578

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26: 15S-20S

Jabri B, Selby JM, Negulescu H, Lee L, Roberts AI, Beavis A, Lopez-Botet M, Ebert EC, Winchester RJ. TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 2002; 17: 487-499

Janeway CA, Travers P. *Immunologie*. Heidelberg – Berlin – Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1997: 57, 59

Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004; 173: 6072-6081

Kamal SM, Fehr J, Roesler B, Peters T, Rasenack JW. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 123: 1070-1083

Kanangat S, Babu JS, Knipe DM, Rouse BT. HSV-1-mediated modulation of cytokine gene expression in a permissive cell line: selective upregulation of IL-6 gene expression. *Virology* 1996; 219: 295-300

Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Katayama K, Ito A, Mochizuki K, Kuzushita N, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Cross-linking of Fc(gamma)-receptor on monocytes inhibits hepatitis C virus-specific cytotoxic T-lymphocyte induction in vitro. *Immunology* 1998; 94: 461-468

Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med* 2006; 45: 183-191

Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; 332: 83-85

Klein J, Figueroa F. Evolution of the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol* 1986; 6: 295-386

Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998; 391: 703-707

Lanier LL. On guard – activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2001; 2: 23-27

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52

Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 1996; 157: 4741-4745

Lechner F, Sullivan J, Spiegel H, Nixon DF, Ferrari B, Davis A, Borkowsky B, Pollack H, Barnes E, Dusheiko G, Klenerman P. Why do cytotoxic T lymphocytes fail to eliminate hepatitis C virus? Lessons from studies using major histocompatibility complex class I peptide tetramers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000b; 355: 1085-1092

Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000a; 191: 1499-1512

Le Dréan E, Vély F, Olcese L, Cambiaggi A, Guia S, Krystal G, Gervois N, Moretta A, Jotereau F, Vivier E. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1122

Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty DE. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5199-5204

Lichterfeld M, Leifeld L, Nischalke HD, Rockstroh JH, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection. *J Infect Dis* 2002; 185: 1803-1807

Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344-345

Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-244

Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445

Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, Alter MJ. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis* 2005; 192: 1880-1889

Mingari MC, Ponte M, Bertone S, Schiavetti F, Vitale C, Bellomo R, Moretta A, Moretta L. HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1172-1175

Mo XY, Sarawar SR, Doherty PC. Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. *J Virol* 1995; 69: 5592-5598

Moser JM, Gibbs J, Jensen PE, Lukacher AE. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. *Nat Immunol* 2002; 3:189-195

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 197-223

Moretta A, Moretta L. HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:694-701

Moretta L. Introduction: NK cells: origin, receptors and specificity. *Semin Immunol* 1995; 7: 67-73

Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 2000; 21: 420-422

Moser JM, Gibbs J, Jensen PE, Lukacher AE. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8+ T cell responses. *Nature Immunol* 2002; 3: 189-195

Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000; 1: 199-205

Moskophidis D, Frei K, Löhler J, Fontana A, Zinkernagel RM. Production of random classes of immunoglobulins in brain tissue during persistent viral infection paralleled by secretion of interleukin-6 (IL-6) but not IL-4, IL-5, and gamma interferon. *J Virol* 1991; 65: 1364-1369

Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of NK cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 2006; 55:869-77

Nattermann J, Nischalke HD, Feldmann G, Ahlenstiel G, Sauerbruch T, Spengler U. Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J Viral Hepat* 2004; 11: 519-526

Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, Leifeld L, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 2005a; 166: 443-453

Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Kupfer B, Ahlenstiel G, Feldmann G, Rockstroh J, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther* 2005b; 10: 95-107

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Sayyaparaju MR, Smulson ME, Yamin T, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43

Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol* 1996a; 156: 1138-1142

Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF- effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996b; 156: 4746-4756

Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 1995; 182: 1045-1056

Perussia B. The cytokine profile of resting and activated NK cells. *Methods* 1996; 9: 370-378

Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-538

Pietra G, Romagnani C, Falco M, Vitale M, Castriconi R, Pende D, Millo E, Anfossi S, Biassoni R, Moretta L, Mingari MC. The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR α/β -mediated recognition. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3687-3693

Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998; 280: 248-253

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 352: 1426-1432

Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003; 362: 2095-2100

Pulliam L, Moore D, West DC. Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF- alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity. *J Neurovirol* 1995; 1: 219-227

Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998; 101: 746-754

Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1093-1100

Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 35-44

Racanelli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003; 24: 456-464

Ray S, Broor SL, Vaishnav Y, Sarkar C, Girish R, Dar L, Seth P, Broor S. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 393-403

Robert Koch Institut, Berlin. *Epidemiologisches Bulletin* 46/2005.

Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002; 36: S106-113

Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, Bouwer HG, Hinrichs DJ. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* 2002; 35: 190-198

Rudensky AYu, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991; 353: 622-627

Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 1997; 185: 1185-1192

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF-. *Blood* 1990; 74: 40-47

Schumacher TN, De Bruijn ML, Vernie LN, Kast WM, Melief CJ, Neefjes JJ, Ploegh HL. Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature* 1991; 350: 703-706

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-567

Shepherd JC, Schumacher TN, Ashton-Rickardt PG, Imaeda S, Ploegh HL, Janeway CA jr, Tonegawa S. TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide-selective. *Cell* 1993; 74: 577-584

Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163: 6236-6243

Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A. Nkp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of Nkp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1656-1666

Snijders A, Hilkens CM, van der Pouw Kraan TC, Engel M, Aarden LA, Kapsenberg ML. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J Immunol* 1996; 156: 1207-1212

Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S99-105

Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 1997; 18: 428-432

Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, Cerundolo V, Borysiewicz LK, McMichael AJ, Wilkinson GW. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000; 287: 1031

Townsend A, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Karre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340: 443-448

Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376

Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25: 449-458

Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002; 195: 43-49

Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H, Kawashima T. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 1797-1801

Ulbrecht M, Martinuzzi S, Grzeschik M, Hengel H, Ellwart JW, Pla M, Weiss EH. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 2000; 164: 5019-5022

Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7:739-51

Vitale M, Castriconi R, Parolini S, Pende D, Hsu ML, Moretta L, Cosman D, Moretta A. The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1 + NK cell clones. *Int Immunol* 1999; 11: 29-35

Vollmar A, Dingeramn T. *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 29, 38, 39, 47, 48, 420, 422, 428

Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-3458

Whiteside TL, Herberman RB. Role of natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1: 125-133

Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998; 161: 571-577

World Health Organisation. Fact Sheet No. 164. Oktober 2000

Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y. EB1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* 1998; 161: 3096-3102

Zeuzem S, Roth WK, Herrmann G. Viral Hepatitis C. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 117-132

Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 1979; 27: 51-177

9. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ulrich Spengler, für die Überlassung des Themas, sowie in besonderem Maße für seine schnellen und stets sehr hilfreichen Korrekturvorschläge und -anregungen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Jacob Nattermann für seine Betreuung insbesondere im Rahmen der Laborarbeiten.

Herrn Thomas Randau danke ich sehr herzlich für seine Computerkenntnisse, die er immer mit mir zu teilen bereit war.

Mein größter Dank gilt allerdings meinen Eltern, die mich sowohl in den Jahren meines Studiums, als auch in der manchmal sehr zähen Zeit der Bemühungen um diese Dissertation stets und unermüdlich unterstützt und begleitet haben.