

**Charakterisierung von Subpopulationen  
Natürlicher Killer-Zellen  
bei der Hepatitis C Virus-Infektion**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Marianne Eisenhardt**

aus

Jena

Bonn, 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Jacob Nattermann
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Datum der mündlichen Prüfung: 03.07.2014

Erscheinungsjahr: 2014

# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung .....	1
1	Die Hepatitis C Virus-Infektion .....	1
1.1	Das Hepatitis C Virus .....	1
1.2	Klinik und Therapie der HCV-Infektion .....	1
1.3	Die HCV/HIV-Ko-Infektion .....	4
2	Natürliche Killer-Zellen bei der HCV-Infektion.....	5
2.1	Natürliche Killer-Zellen .....	5
2.1.1	NK-Zell-Rezeptoren .....	6
2.1.2	Ko-Stimulation von NK-Zellen.....	7
2.2	NK-Zell-Subpopulationen .....	8
2.3	Natürliche Killer-Zellen bei der HCV-Infektion .....	10
2.3.1	NK-Zellen bei der akuten Hepatitis C-Infektion.....	10
2.3.2	NK-Zellen bei der chronischen Hepatitis C-Infektion .....	11
2.3.3	NK-Zellen und Fibrose.....	13
3	Lösliche Komponenten der angeborenen Immunität .....	14
3.1	Zytokine und Chemokine.....	14
4	Zielsetzung der Arbeit.....	17
II.	Material .....	19
1	Geräte.....	19
2	Verbrauchsmaterial.....	20
3	Reagenzien.....	21
4	Antikörper .....	23
5	Zytokine .....	25
6	Kits.....	25
7	Zelllinien und primäre Zellen.....	25
8	Puffer und Medien .....	26
9	Untersuchungsmaterial .....	28
III.	Methoden .....	30

1	Zellkultur und zellbiologische Methoden .....	30
1.1	Kultivierung der HUH7 A2 <sub>Replikon</sub> Zelllinie.....	30
1.2	Kultivierung der K562 Zelllinie .....	30
1.3	Kultivierung primärer Zellen .....	30
1.4	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	31
2	Immunologische und molekularbiologische Methoden .....	32
2.1	Zellisolation .....	32
2.1.1	Isolation peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation nach Böyum.....	32
2.1.2	Immunmagnetische Isolation von Natürlichen Killer-Zellen und Monozyten.....	33
2.1.3	Isolation von CXCR3(+) / (-) und CD27(+) / (-) NK-Zell-Subpopulationen.....	34
2.2	Generierung von Monozyten-Überständen .....	34
2.3	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) .....	34
2.4	Migrations-Assay.....	35
2.5	Durchflusszytometrie (FACS).....	36
2.5.1	Prinzip.....	36
2.5.2	Markierung von Zelloberflächenmolekülen .....	37
2.5.2.1	Färbung von Oberflächenantigenen primärer Zellen und Zelllinien	37
2.5.2.2	Färbung von Oberflächenantigenen im Vollblut.....	38
2.5.2.3	Färbung intra-zellulärer Zytokine .....	38
2.6	Ko-Inkubations-Assays.....	39
2.7	Luciferase-Assay.....	40
2.8	RNA-Extraktion .....	40
2.9	Reverse Transkription und Echtzeit PCR .....	41
2.9.1	Prinzip.....	41
2.9.2	Untersuchung des Einflusses von CXCL10 auf die Genexpression profibrotischer Proteine in HSC .....	42
3	Statistische Methoden .....	42
IV.	Ergebnisse .....	44

1	Definition von NK-Zell-Populationen anhand der CD27-Expression .....	44
1.1	CD27-Expression auf peripheren NK-Zellen .....	44
1.2	Funktion CD27(+) NK-Zellen .....	45
1.3	Regulation der anti-viralen Funktion von CD27 .....	48
1.4	Bedeutung CD27(+) NK-Zellen bei der HCV-Infektion .....	51
2	Funktionelle und phänotypische Charakterisierung von NK-Zellen anhand der CXCR3-Expression .....	53
2.1	Expression von CXCR3 auf peripheren NK-Zellen.....	53
2.2	Phänotypische Charakterisierung CXCR3(+) NK-Zellen .....	54
2.3	Funktionelle Charakterisierung CXCR3(+) NK-Zellen .....	58
2.4	Rolle von NKG2D für die NK-Zell-Aktivität CXCR3(+) NK-Zellen .....	64
2.5	Einfluss des CXCR3 Liganden CXCL10 auf die Fibrose-Entwicklung in hepatischen Sternzellen .....	66
2.6	CXCR3(+) NK-Zellen bei der HCV-Infektion.....	69
2.6.1	Intra-hepatische Akkumulation CXCR3(+) NK-Zellen .....	69
2.6.2	Anti-fibrotische Aktivität CXCR3(+) NK-Zellen bei der HCV-Infektion	70
2.6.3	Phänotypische Analyse peripherer NK-Zellen .....	72
V.	Diskussion.....	75
1	Definition von NK-Zell-Subpopulationen anhand der CD27-Expression .....	76
2	Die Bedeutung CXCR3-exprimierender Natürlicher Killer-Zellen.....	81
VI.	Anhang.....	90
1	Literaturverzeichnis.....	90
2	Abkürzungsverzeichnis .....	101
	Eidesstattliche Erklärung.....	103

## Zusammenfassung

Die bisher vorherrschende starre Einteilung Natürlicher Killer (NK)-Zellen in CD56<sup>Dim</sup> und CD56<sup>High</sup> Subtypen scheint zu stark vereinfacht. Es wird versucht, sich der Komplexität dieser Lymphozyten-Population durch Beschreibung spezifischer NK-Zell-Subpopulationen anzunähern.

Die Funktion von NK-Zellen wird durch eine Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert. Darüber hinaus beeinflussen ko-stimulatorische Moleküle deren Funktion. Hinweise dahingehend, dass CD27, ein Mitglied der TNFR-Familie, neben der Relevanz im B- und T-Zellsystem auch Einfluss auf das Signaling für NK-Zellen hat, nehmen zu. Überdies scheint, wie im Mausmodell gezeigt wurde, die CD27-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen für die Immunantwort gegen Virus-infizierte Zellen von Bedeutung zu sein. Die hier generierten funktionellen Daten zur Untersuchung von CD27-exprimierenden NK-Zellen weisen auf ein starkes anti-virales Potential von CD27(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen gegenüber HCV-replizierenden HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen hin. Dabei scheint die anti-virale Wirkung nicht zwangsläufig an eine direkte CD27/CD70-Interaktion gebunden zu sein, wie Experimente mit Blockierung von CD70 ergaben. Allerdings ließ sich die anti-virale Effektivität von NK-Zellen durch Prä-Stimulation mit CD27 noch steigern. Bei HIV(+) Patienten mit akuter Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion war eine hohe Frequenz CD27(+) NK-Zellen mit einem spontan ausheilenden Verlauf der HCV-Infektion assoziiert. Die CD27-Expression korrelierte hier mit der Sekretion von IFN- und der Fähigkeit zur Hemmung der HCV-Replikation. Die Expression von CD27 scheint eine Population aktivierter NK-Zellen zu kennzeichnen, die über starkes anti-virales Potential verfügen.

Murine Daten belegen, dass NK-Zellen durch Eliminierung aktivierter Hepatischer Sternzellen (HSC) anti-fibrotische Aktivität besitzen. Als entscheidende Komponente der angeborenen Immunität sind NK-Zellen in die frühe Kontrolle und Immunpathogenese der HCV-Infektion involviert. Chemokine und Chemokin-Rezeptoren regulieren dabei maßgeblich die hepatische Rekrutierung von NK-Zellen. Im Zusammenhang mit Hepatitis C wurde eine Assoziation des Chemokin-Rezeptors CXCR3 und seiner Liganden mit dem Fibrose-Stadium beschrieben. Daher liegt eine Rolle dieser Chemokine in Bezug auf die HCV-induzierte Leberschädigung nahe.

Mechanistisch konnte dies bisher nicht geklärt werden, zudem lagen keine funktionellen humanen Daten vor.

Experimente mit isolierten humanen NK-Zellen ergaben, dass die Expression von CXCR3 distinkte NK-Zell-Populationen definiert. Durch funktionelle Untersuchungen in Ko-Inkubationsexperimenten ließ sich bei gesunden Probanden die stärkste anti-fibrotische Aktivität gegenüber HSC in der CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> Subpopulation nachweisen. Die chronische HCV-Infektion war mit einer signifikant erhöhten Frequenz CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen assoziiert. Allerdings stellte sich heraus, dass bei chronischer HCV-Infektion dieser NK-Zell-Subtyp sowohl hinsichtlich Degranulation, als auch IFN- $\gamma$ -Sekretion beeinträchtigt war. Dadurch war die Eliminierung aktivierter HSC ineffizient und die Regulation von fibrotischen Umbauprozessen in der Leber gestört. Darüber hinaus konnte eine intra-hepatische Akkumulation von CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen in fortschreitenden Stadien der Leberfibrose nachgewiesen werden. Mittels Blockierungsexperimenten ließ sich nachweisen, dass bei dieser NK-Zell-Subpopulation eine Aktivierung über den NKG2D-Rezeptor für die anti-fibrotische Aktivität entscheidend ist. Insgesamt weisen meine Untersuchungen darauf hin, dass eine intra-hepatische Anreicherung CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen, deren Funktion eingeschränkt ist, an der Progression der Leberfibrose bei chronischer Hepatitis C-Infektion entscheidend beteiligt ist.

# **I. Einleitung**

## **1 Die Hepatitis C Virus-Infektion**

### **1.1 Das Hepatitis C Virus**

Das Hepatitis C Virus ist ein hepatotropes Virus und gilt seit seiner Identifizierung 1989 (vorher Non-A / Non-B Hepatitis) weltweit als eine der Hauptursachen chronischer Leberschädigungen <sup>1</sup>. Die resultierende Entzündung der Leber kann nach langjährigem Verlauf zur Leberfibrose bzw. -zirrhose und zur Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen. Obwohl Hepatozyten das primäre Ziel des Virus darstellen, kann es auch mit Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen interagieren <sup>2,3</sup>.

Das HC Virus besitzt ein Einzelstrang-RNA-Genom in Plusstrangorientierung und wird taxonomisch der Familie der Flaviviridae und der Gattung der Hepaciviren zugeordnet<sup>1</sup>.

### **1.2 Klinik und Therapie der HCV-Infektion**

Weltweit geht die WHO von 130 - 180 Millionen (in Deutschland etwa 500000) HCV-positiven Individuen aus <sup>4</sup>. Das Hepatitis C Virus infiziert vorwiegend Hepatozyten, in denen es repliziert und führt zu einer entzündlichen Erkrankung der Leber. Da das Virus selbst nicht zytopathisch ist, scheint die HCV-assoziierte Schädigung der Leber weniger direkt durch das Virus, sondern eher durch die Immunantwort des Wirtes verursacht zu sein <sup>5</sup>.

Die Transmission erfolgt hauptsächlich über Blutkontakt. Dabei sind die meisten Neuinfektionen auf Mehrfachbenutzung kontaminierter Spritzbestecks Drogenabhängiger zurückzuführen. Etwa 20% der Infektionen bleiben ungeklärten Ursprungs. Eine Impfung gegen Hepatitis C gibt es bisher nicht, was sich u. a. in der hohen Mutationsrate des Virus und der großen genetischen Diversität begründet. Bisher sind 6 Genotypen mit zahlreiche Subtypen beschrieben, die sich hinsichtlich Transmission, geographischer Verteilung und Therapieansprechen unterscheiden <sup>6,7</sup>. In Europa herrscht die Genotyp (GT) 1-Infektion vor, welche mit dem schlechtesten Ansprechen auf die bisherige Standardtherapie assoziiert ist <sup>8-10</sup>.

Etwa 75% aller HCV-Infektionen verlaufen ohne primäre Krankheitssymptome, weshalb die Infektion oftmals nicht diagnostiziert wird. Nach einigen Wochen Inkubationsdauer etabliert sich eine leicht verlaufende Leberentzündung, die sich meist in grippeartigen Symptomen äußert. Nach dieser „akuten Phase“ der HCV-Infektion, die bis zu 26 Wochen anhält, entscheidet sich, ob das Virus erfolgreich vom Immunsystem des Wirtes eliminiert worden ist oder sich eine chronische HCV-Infektion etabliert. Letzteres erfolgt bei etwa 80% aller Infizierten und wird im weiteren Verlauf zumeist vom fibrotischen Umbau der Leber begleitet. Innerhalb von Dekaden entwickeln 20-40% der Patienten eine Leberzirrhose. Bei jährlich etwa 5% der zirrhotischen Patienten bildet sich ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC), welches eine häufige Indikation für eine Lebertransplantation darstellt <sup>11-13</sup>.

Die Fibrose der Leber ist das Ergebnis chronischer Leberschädigung mit gleichzeitiger Akkumulation Extrazellulärer Matrix (EZM) -Proteine <sup>14</sup>. Wird die Leber lediglich akut geschädigt, regenerieren die Parenchymzellen und apoptotische/nekrotische Zellen werden ersetzt. Dies wird von einer inflammatorischen Reaktion und begrenzter Ablagerung von EZM begleitet. Erfolgt allerdings eine persistierende Schädigung, ist es möglich, dass die Regeneration der Leber nur unzureichend erfolgt. Dies hat zur Folge, dass Hepatozyten in einer Art Wundheilungsprozess durch kollagenreiches Gewebe ersetzt werden <sup>15</sup>.

In den 80er Jahren wurden Hepatische Sternzellen (HSC) als die Hauptproduzenten des in der Leber synthetisierten Kollagens identifiziert <sup>16</sup>. In der gesunden Leber stellen die im Disse-Raum lokalisierten HSC den Hauptspeicherort für Vitamin A dar. Infolge chronischer Leberschädigung werden sie aktiviert und transdifferenzieren in Myofibroblasten-ähnliche Zellen, wodurch sie kontraktile, pro-inflammatorische und fibrogene Eigenschaften erhalten <sup>17</sup>. Aktivierte HSC migrieren in der Leber zu Orten der Gewebereparatur, wo sie akkumulieren und die Bildung breiter Bindegewebssepten initiieren. Eine Akkumulation von EZM resultiert, wenn die Synthese die Degradation übersteigt. Die Aktivität von EZM-abbauenden Matrix-Metalloproteasen (MMP) ist bei der chronischen Hepatitis C verringert, da es zu einer Überexpression von deren Inhibitoren, den TIMPs (*tissue-inhibitor of metalloproteases*), kommt <sup>18</sup>.

Im Verlauf der Fibroseprogression wird das Sinusendothel durch Kapillarendothel ohne Fenestrae ersetzt. Es erfolgt die Kapillarisation der Sinusoide. Eine tonische Kontraktion der HSC bewirkt eine zusätzliche Resistenzerhöhung im Lebersinusoid, die zum Pfortaderhochdruck beiträgt.

Seit den 90er Jahren wird angenommen, dass der Prozess der Fibrotisierung reversibel ist, was die Suche nach anti-fibrotischen Therapien stimuliert hat <sup>19</sup>. In der experimentell induzierten Fibrose bewirkte die Beendigung der Leberschädigung eine Regression <sup>20</sup>. Im Menschen konnte dies, nach erfolgreicher Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung, bis zu einem bestimmten Grad auch beobachtet werden <sup>21,22</sup>. Eine Beseitigung aktivierter HSC durch Apoptose, bzw. deren Rückführung in einen ruhenden Status scheinen der Fibroseregession voranzugehen <sup>23,24</sup>. Allerdings existieren diesbezüglich noch zahlreiche unbeantwortete Fragen.

Die Leberbiopsie gilt methodisch als Gold-Standard zur Untersuchung der Leberfibrose <sup>25</sup>. Histologisch lässt sich auf die Ursache der Leberschädigung schließen, der Grad der Nekroinflammation und das Fibrose-Stadium bestimmen. Für die vorliegende Arbeit stellten Biopsien die Grundlage der intra-hepatischen NK-Zell-Analysen dar.

Als bisherige Standardtherapie der HCV-Infektion galt die kombinierte Gabe von pegyliertem IFN- (pegIFN) und Ribavirin (RBV) über 24 Wochen (GT 2 & 3) bzw. 48 Wochen (GT 1) <sup>26</sup>. Das Ziel der HCV-Therapie stellt das Erreichen der Virusfreiheit dar. Als ausgeheilt gilt ein Patient, wenn 6 Monate nach Therapieende die HCV-RNA nicht mehr detektierbar ist. Speziell für Infizierte mit HCV GT 1 lag die Therapie-Ansprechrates jedoch unter 50% <sup>8,9</sup>. Faktoren wie weibliches Geschlecht, niedriges Lebensalter, Normalgewicht und eine niedrige Ausgangs-Viruslast begünstigen den Erfolg der Therapie <sup>27</sup>. Mit Zulassung neuer Medikamente, wie der Virus-spezifischen Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir, die mit pegIFN und RBV zur Triple-Therapie kombiniert werden, hat sich die Ausheilungschance für Patienten mit GT 1-Infektion verbessert. Allerdings wird sie von neuen und stärkeren Nebenwirkungen begleitet <sup>28</sup>.

### **1.3 Die HCV/HIV-Ko-Infektion**

Der Verlauf der HCV-Infektion wird durch eine zusätzliche Infektion mit dem HI (Humanes Immundefizienz) Virus verschlechtert. Aufgrund der geschwächten zellulären Immunantwort scheinen der Infektionsverlauf und besonders die Progression der Leberfibrose beschleunigt zu sein <sup>29-31</sup>. Dadurch verkürzt sich bei HCV-Patienten mit gleichzeitiger HIV-Infektion der Zeitraum bis zur Entwicklung einer Leberzirrhose und damit die Lebenserwartung <sup>32,33</sup>. Ferner steigt das Risiko zur Entwicklung eines HCC deutlich <sup>34</sup>.

Die Prävalenz von HCV bei HIV-Infizierten ist europaweit recht hoch. Allerdings variiert sie stark in Abhängigkeit vom Transmissionsweg. Hämophilie-Patienten (60%) und intravenöse Drogenkonsumenten (bis 90%) sind besonders häufig betroffen <sup>35-37</sup>.

Hepatitis C scheint wiederum die HIV-Infektion negativ zu beeinflussen, indem beispielsweise der natürliche Verlauf der Infektion beschleunigt und das Ansprechen auf eine hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) verschlechtert wird <sup>38</sup>.

## 2 Natürliche Killer-Zellen bei der HCV-Infektion

### 2.1 Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind eine heterogene Lymphozyten-Subpopulation und stellen einen zentralen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar. Hierbei werden NK-Zellen üblicherweise anhand der Expression des Oberflächenmoleküls CD56 und dem Fehlen des T-Zell-Rezeptors (CD3) von den anderen Lymphozyten-Populationen unterschieden.

Im peripheren Lymphozytenpool finden sich unter physiologischen Bedingungen etwa 5-10% NK-Zellen, wobei in bestimmten Organen, wie der Leber, der NK-Zell-Anteil 30-50% betragen kann<sup>39</sup>. Intra-hepatisch sind NK-Zellen hauptsächlich in den Sinusoiden lokalisiert, wo sie meist an endothelialen Zellen adhären<sup>39,40</sup>.

Charakteristisches Merkmal der NK-Zellen ist ihre Fähigkeit, maligne transformierte oder virusinfizierte Zellen direkt – ohne vorheriges Priming - zu eliminieren. Hierbei kommt es nach Kontaktaufnahme mit der Zielzelle zur Adhäsion und zur Ausbildung einer sogenannten immunologischen Synapse. In der NK-Zelle gebildete intrazelluläre Granula werden polarisiert und per Exozytose sezerniert<sup>41,42</sup>. In den zytotoxischen Granula enthaltenes Perforin und Granzym lysieren die Zielzelle und induzieren deren Apoptose. Alternativ kann die Apoptose-Induktion auch durch die auf NK-Zellen exprimierten bzw. von ihnen sezernierten „Todes-Liganden“ FasL (CD95L) und TRAIL (CD253) vermittelt werden<sup>43,44</sup>.

Zudem besitzen NK-Zellen durch ihre Zytokinsekretion (u. a.: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, M-CSF) auch wichtige anti-virale und immunregulatorische Bedeutung<sup>45-47</sup>.

### 2.1.1 NK-Zell-Rezeptoren

Da NK-Zellen über keine Antigen-spezifischen Rezeptoren verfügen, wird ihre Funktion hauptsächlich über aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren (NKR) reguliert.<sup>48,49</sup> Hierbei wird die Aktivität der NK-Zelle durch die Balance aus aktivierenden und hemmenden Signalen bestimmt.

Wichtige Vertreter humaner NKR stellen NKG2-Rezeptoren, *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCR) und die *Killer Immunoglobulin-like receptors* (KIR) dar.

NKG2-Rezeptoren sind C-Typ Lektin-ähnliche Membranproteine, die oberflächlich (mit Ausnahme von NKG2D) als Heterodimer mit dem Lektin-ähnlichen Polypeptid CD94 exprimiert werden. Während NKG2A nach Interaktion mit seinem Liganden HLA-E inhibierende Signale vermittelt, führt die Stimulation von NKG2C, E und H zur Aktivierung der NK-Zelle. NKG2D vermittelt nach Interaktion mit MICA/B und ULBP ebenfalls aktivierende Signale<sup>50</sup>.

Die Gruppe der NCR umfasst ausschließlich aktivierende Rezeptoren der Ig-Superfamilie. Identifiziert sind zum jetzigen Zeitpunkt NKp30, NKp44, NKp46 und NKp80<sup>51,52</sup>. Die Liganden dieser Rezeptoren sind bisher nicht bekannt. Lediglich für NKp46 wurde die Bindung an Hämagglutinin und Hämagglutinin-Neuraminidase von Influenza und Parainfluenza-Viren beschrieben<sup>53</sup>.

Die SLAM (*Signaling lymphocyte activation molecules*)-Rezeptoren 2B4, CD48, NTB-A und CRACC scheinen bezüglich der NK-Zell-Aktivierung mehr als Ko-Rezeptoren zu fungieren<sup>54-56</sup>. Während sie dabei überwiegend die aktivierende Wirkung anderer NK-Zell-Rezeptoren verstärken, scheint die Bindung unterschiedlicher Adaptermoleküle auch hemmende Auswirkungen auf die NK-Zell-Funktion zu haben<sup>57</sup>.

Die Familie der KIR umfasst sowohl hemmende als auch aktivierende Rezeptoren. Als Liganden wurden bisher die klassischen HLA-Molekülen HLA-A, -B und -C, sowie das nicht-klassische HLA-G Molekül beschrieben<sup>58-60</sup>.

Vermutlich verleiht die unterschiedliche Expression dieses großen Rezeptorrepertoires den einzelnen NK-Zell-Populationen spezifische Eigenschaften.

### 2.1.2 Ko-Stimulation von NK-Zellen

Neben den NK-Zell-Rezeptoren scheinen auch ko-stimulatorische Moleküle die Funktion von NK-Zellen sowohl direkt als auch indirekt zu beeinflussen, indem sie den Schwellenwert zur Aktivierung modulieren.

So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass durch die Interaktion des ko-stimulatorischen Moleküls CD28 mit seinem Liganden CD80 die Zytokinsekretion, Zytotoxizität und Proliferation von NK-Zellen gesteigert werden <sup>61,62</sup>.

Ein bisher hauptsächlich auf T-Zellen untersuchtes ko-stimulatorisches Molekül stellt CD27, ein Mitglied der TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) -Familie dar. Der zytoplasmatische Schwanz von CD27 assoziiert mit TRAF2 und -5, wodurch die Signalübertragung an die Jun N-terminale Kinase und NF- $\kappa$ B erfolgt <sup>63</sup>. Während CD27 konstitutiv auf der Mehrzahl der Lymphozyten exprimiert wird, findet sich der zugehörige Ligand CD70 hauptsächlich auf B- und T-Zellen sowie auf Dendritischen Zellen, kann aber auch von NK-Zellen exprimiert werden <sup>64</sup>.

Die Interaktion von CD27 und CD70 hat Einfluss auf verschiedene biologische Funktionen. CD27 unterstützt die Expansion Antigen-spezifischer naiver T-Zellen und hat als ko-stimulatorischer Rezeptor Bedeutung für die effektive Generierung von Memory-T-Zellen. In CD27<sup>-/-</sup> Mäusen äußerte sich dies in einer Beeinträchtigung der Bildung von T-Gedächtniszellen in Form einer verspäteten Antwort bei Re-Exposition sowie einer reduzierten Anzahl CD8<sup>+</sup> Virus-spezifischer T-Zellen <sup>65</sup>. Die Interaktion von CD27 und CD70 spielt zudem bei der Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen eine Rolle <sup>66</sup>. Hierbei erfolgt nach CD27/CD70-Wechselwirkung eine starke Sekretion der Immunglobuline IgG und IgM <sup>67</sup>.

Des Weiteren deutet eine zunehmende Anzahl experimenteller Daten darauf hin, dass die CD27/CD70-Interaktion auch die Aktivität von NK-Zellen moduliert <sup>68,69</sup>. Daten aus Mausexperimenten lassen vermuten, dass eine durch CD27 vermittelte Aktivierung von NK-Zellen in die Immunantwort gegen Virus-infizierte Zellen involviert ist <sup>70</sup>. Dabei konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Expression von CD27 definierte Subpopulationen von NK-Zellen mit distinkter Reaktionsfähigkeit und migratorischem Potential markiert <sup>71,72</sup>.

## 2.2 NK-Zell-Subpopulationen

Bisher wurden NK-Zellen anhand der Expressionsdichte des Oberflächenmoleküls CD56 in zwei distinkte Populationen, CD56<sup>Dim</sup> und CD56<sup>High</sup> NK-Zellen, unterteilt <sup>73,74</sup>. Hierbei wird angenommen, dass CD56<sup>High</sup> NK-Zellen die unreifere Subpopulation repräsentieren und im Laufe der Zeit zu CD56<sup>Dim</sup> NK-Zellen differenzieren <sup>75,76</sup>.

Neben phänotypischen Unterschieden variieren beide Subpopulationen auch bezüglich ihrer Funktion. Dabei wurde CD56<sup>Dim</sup> NK-Zellen, die etwa 90% der NK-Zellen im peripheren Blut ausmachen, vorwiegend zytotoxisches Potential zugeschrieben, während CD56<sup>High</sup> NK-Zellen durch ihre Zytokin-Produktion eher mit immunregulatorischen Funktionen in Zusammenhang gebracht wurden <sup>77-79</sup>. Diese ursprüngliche funktionelle Einteilung bezog sich allerdings auf ruhende Zellen und gilt mittlerweile als zu stark vereinfacht. So zeigte sich, dass die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen oder die Interaktion mit unterschiedlichen Zielzellen einen starken Einfluss auf die Funktion der beiden NK-Zell-Subpopulationen besitzt. So exprimieren CD56<sup>High</sup> NK-Zellen, neben dem auf allen NK-Zellen vorhandenen intermediär affinen IL2-Rezeptor IL-2R<sub>β</sub>, den hoch affinen Rezeptor IL-2R<sub>γ</sub>. Dadurch stimulieren bei dieser NK-Zell-Subpopulation, im Gegensatz zu CD56<sup>Dim</sup> NK-Zellen, bereits geringe IL-2-Konzentrationen die Produktion von IFN- $\gamma$  und steigern die zytotoxische Aktivität <sup>80-82</sup>. Insgesamt scheinen beide NK-Zell-Populationen ein vergleichbares zytotoxisches Potential aufzuweisen, das abhängig vom jeweiligen Stimulus unterschiedlich leicht aktiviert werden kann.

Mittlerweile werden NK-Zellen als komplexe, heterogene Lymphozyten-Population angesehen. Es wird daher nun versucht, die verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen phänotypisch und funktionell genauer zu charakterisieren. Allerdings fehlen noch einheitliche Standards, wie spezifische Subtypen definiert werden sollen. So wurde in den vergangenen Jahren von unterschiedlichen Arbeitsgruppen vorgeschlagen, NK-Zell-Subpopulation auf Grundlage des Reifungszustands, der Effektor-Funktion oder des Migrationspotentials zu charakterisieren <sup>83-86</sup>, während in anderen Arbeiten die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle als Definitionskriterium verwendet wurde <sup>72,87-90</sup>.

Hierbei ist zu beachten, dass die unterschiedlichen Definitionskriterien zumindest teilweise überlappende NK-Zell-Subtypen beschreiben. So konnte unsere Arbeitsgruppe beispielsweise zeigen, dass sich NK-Zellen anhand der Expression des NK-Zell-Rezeptors NKp46 in spezifische Subpopulationen einteilen lassen, die sich gleichzeitig hinsichtlich ihrer anti-viralen Eigenschaften als auch durch die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR5 und damit ihres Migrationsverhaltens voneinander unterscheiden <sup>90,91</sup>.

Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Definition von NK-Zell-Subtypen anhand der Expression von CD27. Im Mausmodell wurden Unterschiede im Phänotyp, der Gewebeverteilung, den Effektor-Funktionen und des Migrationspotentials zwischen CD27(+) und CD27(-) Populationen beobachtet <sup>71</sup>. NK-Zellen aus CD27<sup>-/-</sup> Mäusen erlangen die volle phänotypische Reife und sind im ruhenden Zustand funktionell unauffällig. Nach Stimulation wiesen sie jedoch eine verringerte Zytotoxizität und Zytokinsekretion auf, die auf der verstärkten Expression inhibitorischer Rezeptoren auf NK-Zellen beruhen könnte <sup>92</sup>. Analog lassen sich im Menschen NK-Zell-Subpopulationen anhand der CD27-Expression definieren. Dieser Marker war bisher lediglich zur Beschreibung unreifer Zellen während des NK-Zell-Reifungsprozesses herangezogen worden <sup>89</sup>. Interessanterweise wiesen CD27(+)/(-) NK-Zellen auch hier Unterschiede hinsichtlich der Kompartimentierung, des Rezeptorprofils und der Funktion auf. Allerdings sind die Berichte zu funktionellen Daten noch uneinheitlich <sup>72,88</sup>.

## 2.3 Natürliche Killer-Zellen bei der HCV-Infektion

### 2.3.1 NK-Zellen bei der akuten Hepatitis C-Infektion

Basierend auf immungenetischen Arbeiten existieren Hinweise, dass NK-Zellen einen Einfluss auf die Immunpathogenese und den Verlauf der akuten HCV-Infektion nehmen<sup>93-96</sup>. Es konnte eine Assoziation zwischen dem KIR-Genotyp und dem Verlauf einer HCV-Infektion nachgewiesen werden<sup>95</sup>. Bei Patienten, die den Genotyp des inhibitorischen KIR2DL3 Rezeptors in Kombination mit seinem Liganden HLA-C1 trugen, wurde eine spontane Viruseliminierung besonders häufig beobachtet. Zudem trat bei Patienten, die erfolgreich mit einer auf IFN- basierenden HCV-Therapie behandelt worden waren, dieser Genotyp signifikant häufiger auf, als bei Patienten mit schlechtem Therapie-Ansprechen<sup>93</sup>. Funktionelle Daten über NK-Zellen in der akuten Phase einer HCV-Infektion sind allerdings aufgrund seltener Untersuchung von Patienten unmittelbar nach Infektion nur begrenzt vorhanden.

Amadei und Kollegen berichten in einer der wenigen Arbeiten zur akuten Hepatitis C-Infektion von einer Verschiebung in der Zusammensetzung der CD56-Population hin zum CD56<sup>High</sup>-Phänotyp, die mit dem Infektionsverlauf zu korrelieren scheint<sup>97</sup>. Dieser Anstieg an CD56<sup>High</sup> NK-Zellen ging bei Patienten, welche die Virusinfektion spontan ausheilten, wieder auf das Niveau Gesunder zurück. Bei Patienten, die eine chronische Infektion entwickelten, blieb die Zunahme der CD56<sup>High</sup> NK-Zellen bestehen. Gleichzeitig beobachteten die Autoren eine verstärkte Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen akut HCV-Infizierter. Funktionell korrelierte diese Veränderung mit einer verstärkten Degranulation und IFN- - Sekretion. Die erhöhte Degranulationsaktivität wurde von einer weiteren Gruppe bestätigt<sup>98</sup>. Eine generelle Aktivierung von NK-Zellen wurde auch von unserer Arbeitsgruppe bei der akuten Hepatitis C-Infektion von HIV(+) Patienten beobachtet<sup>99</sup>. Dabei verfügten NK-Zellen in diesem Infektionsstadium über ein effektives antivirales Potential, das mit einer robusten Sekretion von IFN- assoziiert war und *in vitro* die HCV-Replikation im Replikonmodell hemmen konnte. Spontan-Ausheiler wiesen dabei eine wesentlich stärkere IFN- -Antwort auf als Patienten, bei denen sich eine chronische Infektion etablierte. Als weitere Merkmale waren auch hohe Expressionslevel der aktivierenden Rezeptoren NKp46 und NKG2D mit der spontanen Eliminierung der HCV-Infektion assoziiert. Phänotypisch wurde andererseits bei

Patienten mit spontaner Ausheilung eine geringere Häufigkeit von NKp30(+), NKp46(+), CD161(+) und NKG2D(+) NK-Zellen beobachtet als bei Patienten mit einem chronischen Infektionsverlauf.

### **2.3.2 NK-Zellen bei der chronischen Hepatitis C-Infektion**

Im Unterschied zur akuten Hepatitis C-Infektion existieren für die chronische Phase zahlreiche Veröffentlichungen, in denen von Unterschieden in der Frequenz, des Phänotyps, sowie der Funktion der NK-Zellen berichtet wird. Die Deutung dieser Untersuchungen ist uneinheitlich. Eine reduzierte Frequenz intra- und extra-hepatischer Natürlicher Killer-Zellen wird ebenso diskutiert wie die veränderte Zusammensetzung der CD56-Subpopulationen <sup>100-102</sup>.

Unter den Veränderungen des Phänotyps wird aber eine gesteigerte Expression des inhibierenden Rezeptors NKG2A recht einheitlich beschrieben <sup>100,103,104</sup>. Diese geht einher mit einer verringerten zytotoxischen Wirkung gegen HLA-E-exprimierende Zellen <sup>104</sup>. Darüber hinaus scheint die gesteigerte NKG2A-Expression die Funktion Dendritischer Zellen (DC) zu modulieren: IL-15 ist ein wichtiger Faktor für die Proliferation und Funktion von NK-Zellen und liegt bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion deutlich verringert vor <sup>105,106</sup>. Dendritische Zellen gehen mit NK-Zellen einen sogenannten „cross-talk“ ein und stellen eine wichtige IL-15-Quelle dar. Die Produktion von IL-15 ist unter HCV-Einfluss allerdings unzureichend. Dies reflektiert wahrscheinlich die verringerte Kapazität der NK-Zellen, Dendritische Zellen zu aktivieren <sup>106,107</sup>.

Während der chronischen Phase der Infektion sind NK-Zellen offenbar in ihrer Funktion gestört. Dabei wird eine Polarisierung der Zellen in Richtung Zytotoxizität diskutiert <sup>108</sup>. Andererseits sprechen Experimente mit direktem Zell-Zell-Kontakt zwischen NK-Zellen und HCV-infizierten Hepatomzellen hingegen für eine verminderte Kapazität zur Degranulation und Lyse von Zielzellen. Die Abnahme der Degranulation hängt in diesen Experimenten mit einer verringerten Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D und NKp30 zusammen.

Andere Arbeiten berichten davon, dass als weiterer wichtiger anti-viraler Mechanismus auch die Bildung von IFN- gestört ist <sup>109-111</sup>. Die unterschiedlichen Befunde zu einer veränderten Degranulation wurden auf eine erhöhte Expression aktivierender

Rezeptoren wie NKG2C, NKp44, NKp46 und NKp30 zurückgeführt<sup>108,109,112,113</sup>. Vor allem der NKG2D-Signalweg wird für die Abwehr des HC-Virus von einigen Gruppen als bedeutungsvoll bewertet. Allerdings sind die Berichte zu den Beobachtungen des Phänotyps hierbei am widersprüchlichsten: sie reichen von unveränderter, erhöhter, bis zu verringerter NKG2D-Expression<sup>108,112,114</sup>.

Zahlreiche Zytokine wurden als bedeutsam für eine NK-Zell-Aktivierung und die NK-Zell-Funktion bewertet. Besonderes Interesse erlangte dabei das Typ III Interferon IL28B (IFN 3), weil ein Polymorphismus nahe des IL28B-Genlocus (rs12979860) als wichtiger Wirtsfaktor für eine spontane Eliminierung des HC Virus identifiziert wurde<sup>115</sup>. Dieser Befund wurde nachfolgend genutzt, um den Erfolg einer Interferon-Therapie bei Hepatitis C vorauszusagen<sup>115,116</sup>. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass sich der Krankheitsverlauf noch besser durch die Kombination des IL28B-Genotyps mit dem HLA-C-Typ abschätzen lässt<sup>117</sup>. Interessanterweise scheint bei der HCV-Infektion der IL28B-Polymorphismus mit der NK-Zell-Funktion verknüpft zu sein. Die Analyse chronisch HCV/HIV(+) Patienten ergab eine Assoziation des für die Ausheilung unvorteilhaften Genotyps (CT bzw. TT) mit einer beeinträchtigten NK-Zell-Funktion<sup>118</sup>.

### 2.3.3 NK-Zellen und Fibrose

Neben dem Schutz vor Pathogenen und transformierten Zellen geben Versuche im Mausmodell Hinweise darauf, dass NK-Zellen anti-fibrotisches Potential besitzen<sup>119,120</sup>. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte bei Mäusen mit dysfunktionalen NK-Zellen eine schnellere Progression zur Fibrose beobachtet werden<sup>121</sup>. In diesen Experimenten korrelierte die NK-Zell-Aktivität mit dem Grad der HCV-assoziierten Leberfibrose<sup>122</sup>. Nach Aktivierung über NKG2D können NK-Zellen in aktivierten hepatischen Sternzellen über TRAIL Apoptose induzieren<sup>120</sup>. HSC exprimieren nach Übergang in den aktivierten Zustand verstärkt MICA (NKG2D-Ligand) und den TRAIL-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Dadurch werden aktivierte HSC gegenüber einer Lyse durch NK-Zellen vermehrt suszeptibel<sup>123,124</sup>. Derart wird das Ausmaß der Fibrose in der Leber begrenzt. Ist die Funktion von NK-Zellen gestört, resultiert vermehrt Fibrose. Von NK-Zellen sezerniertes IFN- $\gamma$  trägt ferner zur direkten Hemmung der HSC-Aktivierung bei<sup>119,125</sup>.

Die Relevanz dieser Befunde für den Menschen konnte durch unsere Gruppe nachgewiesen werden<sup>126</sup>. Wir konnten zeigen, dass NK-Zellen HCV-positiver Patienten auch in aktivierten humanen HSC effektiv Apoptose induzieren können. Die Apoptose-Induktion war kontaktabhängig und wurde durch TRAIL, NKG2D und FasL vermittelt. Dabei war besonders bemerkenswert, dass eine inverse Korrelation zwischen der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität und dem Fibrorestadium vorlag.

### 3 Lösliche Komponenten der angeborenen Immunität

Das menschliche Immunsystem hat unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um sich vor eindringenden Pathogenen, wie Viren, zu schützen. Hierbei unterscheidet man zwischen der angeborenen, unspezifischen und der adaptiven, spezifischen Immunität. Neben löslichen Faktoren wie Zytokinen/Chemokinen und Komplementfaktoren umfasst die unspezifische Abwehr auch Zellen wie Makrophagen oder Natürliche Killer-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Bei der adaptiven Immunabwehr existieren analog zelluläre (B- und T-Zellen) und humorale (Antikörper) Komponenten. Die Effektormechanismen von angeborener und erworbener Immunität sind miteinander vernetzt.

Beim Eintritt von Viren in den menschlichen Organismus greift als erster Abwehrmechanismus die angeborene Immunität. Dabei sind Interferone (IFN) die Schlüsselzytokine, welche die Zellen in einen anti-viralen Status versetzen und zur Aktivierung und Regulation der zellulären Komponenten, wie NK-Zellen, führen. Der toll-like Rezeptor (TLR) abhängige und der RIG-I/MDA5-Signalweg stellen die Hauptideckungsmechanismen viraler Nukleinsäuren dar und führen zur Induktion von Typ I (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ ) und Typ III (IFN- $\gamma$ ) IFN<sup>127–130</sup>.

Trotz effizienter Abwehrmechanismen sind einige Viren (wie HCV und HIV) in der Lage, eine chronische Infektion zu etablieren, indem sie die Immunantwort unterlaufen. Dafür haben diese Viren verschiedene Mechanismen entwickelt, die allerdings bisher nur teilweise verstanden sind. Es existieren jedoch Hinweise, dass auch eine Hemmung der Aktivität Natürlicher Killer-Zellen hierbei von Bedeutung ist<sup>131–133</sup>.

#### 3.1 Zytokine und Chemokine

Zytokine sind als humorale Faktoren auch für die angeborene Immunität essentiell. Die von unterschiedlichen Zellen auf Aktivierung hin sezernierten Polypeptide wirken als Mediatoren in vielfältiger Weise auf weitere Zellen mit geeigneten Rezeptoren. Zu ihnen zählen beispielsweise Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, Wachstumsfaktoren und Chemokine. Neben IFN- $\gamma$  ist das als T-Zell-Wachstumsfaktor beschriebene Interleukin-2 (IL-2) ein wichtiges Zytokin für die vorliegende Arbeit. IL-2 wird hauptsächlich von CD4(+) T-Zellen, in geringerem Maße auch von CD8(+) T-Zellen, sezerniert und wirkt vornehmlich autokrin. Darüber hinaus beeinflusst es B-

Zellen und NK-Zellen. Auf Letztere hat es proliferative und aktivierende Wirkung, wodurch sich das zytolytische Potential verstärkt<sup>134,135</sup>. Aktivierte Dendritische Zellen, NK-Zellen, sowie NKT-Zellen scheinen auch zu einer IL-2-Produktion fähig zu sein, deren biologische Relevanz aber noch unklar ist<sup>136–138</sup>.

Chemokine stellen eine Familie kleiner, chemotaktisch aktiver Zytokine dar. Sie regulieren über Gradienten die gerichtete Migration von Leukozyten, indem sie an G-Protein-gekoppelte transmembrane Chemokin-Rezeptoren binden. Neben wichtigen Funktionen während Inflammation und Abwehr haben sie Bedeutung bei der Regulation der Embryonalentwicklung, Angiogenese, Lymphozytenwanderung, Wundheilung und Hämatopoese<sup>139</sup>. Abhängig von der Position der beiden N-terminalen Cysteinreste lassen sich Chemokin-Rezeptoren in 4 Subfamilien unterteilen. Der für diese Arbeit relevante Chemokin-Rezeptor CXCR3, Mitglied der CXC-Familie, wurde in Bezug auf die Leukozyten-Migration in die Leber bisher hauptsächlich auf T-Zellen untersucht<sup>140,141</sup>.

Die akute und chronische HCV-Infektion sind mit der Rekrutierung diverser Subtypen von Immunzellen ins Leberparenchym assoziiert. Dieser inflammatorische Prozess ist essentiell für die Suppression der viralen Replikation, kann andererseits jedoch zur Ausbildung einer nekroinflammatorischen Leberschädigung und zum Fortschreiten der Entzündung in Richtung Fibrose führen<sup>142–144</sup>.

CXCR3 ist in die Rekrutierung aktivierter Lymphozyten in die inflammatorische Leber involviert und spielt bei der HCV-Infektion eine Schlüsselrolle für die Regulation der Rekrutierung von Immunzellen in die Leber. Es wurde gezeigt, dass die intra-hepatischen mRNA-Spiegel der CXCR3-assoziierten Chemokine CXCL9 (*Mig*, *monokine induced by IFN- $\gamma$* ), CXCL10 (*IP-10*, *IFN- $\gamma$ -inducible protein 10*) und CXCL11 (*I-TAC*, *interferon-inducible T cell chemoattractant*) bei HCV(+) Patienten mit fortgeschrittener Nekroinflammation und Fibrose signifikant höher sind. Darüber hinaus sind die Liganden bei HCV(+) Patienten im Vergleich mit Gesunden extra- und intra-hepatisch überexprimiert<sup>145–147</sup>. Zudem scheinen CXCR3-exprimierende Lymphozyten im Leberparenchym von Patienten mit HCV-Infektion vorzuherrschen<sup>148,149</sup>. Es wird diskutiert, ob Chemokine die Progression des fibrotischen Umbaus direkt unterstützen<sup>150</sup>.

Beispielsweise wurde in verschiedenen Studien bei der HCV-Infektion für CXCR3 gezeigt, dass erhöhte intra-hepatische mRNA- und Plasma-Spiegel des CXCR3-Liganden CXCL10 einen negativen Prädiktor für das Therapie-Ansprechen darstellen und direkt mit dem Fibrose-Stadium assoziiert sind <sup>146,147,151,152</sup>. Dieser scheinbare Widerspruch kann zum Teil dadurch erklärt werden, dass CXCL10 via DDP4 (Dipeptidylpeptidase IV) durch N-terminale Trunkierung in eine dominant negative (antagonistische) Variante des Proteins verwandelt wird <sup>153</sup>. Bei HCV-Patienten lag eine gesteigerte DDP4-Aktivität vor <sup>154</sup>. Zudem dominierte im Plasma derjenigen chronisch HCV-Infizierten, die nicht erfolgreich auf eine Therapie ansprachen, die trunkierte CXCL10-Form. Wie Casrouge und Kollegen beobachteten, ist diese verkürzte CXCL10-Form zwar noch zur Bindung an den Rezeptor CXCR3 fähig, induziert jedoch keine Aktivierung und Signaltransduktion <sup>155</sup>. Daraufhin erfolgt nur eine begrenzte Migration von CXCR3(+) Lymphozyten in Richtung des Gradienten.

Typ II Interferone induzieren sehr effektiv die Chemokine CXCL9 und CXCL10 <sup>156</sup>. Zudem ist CXCR3 eng an T<sub>H1</sub> Immunantworten gekoppelt <sup>157</sup>. Daher könnte CXCR3 die Rekrutierung von T<sub>H1</sub> Effektorzellen in die entzündete Leber unterstützen. Diese Zellen generieren einerseits eine anti-virale Immunantwort, führen andererseits womöglich zur Schädigung des Lebergewebes <sup>158</sup>. Nach der Infektion mit HCV konnte ein deutlicher Anstieg in der Expression von Typ I und II Interferon-regulierten Genen nachgewiesen werden <sup>159,160</sup>.

## 4 Zielsetzung der Arbeit

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind als wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität von zentraler Bedeutung. Mittlerweile werden NK-Zellen als komplexe, heterogene Lymphozyten-Population angesehen und es wird versucht, verschiedene Subpopulationen anhand phänotypischer und funktioneller Kriterien zu charakterisieren. Einheitliche Standards zur Definition spezifischer Subtypen fehlen bisher. Die Funktion von NK-Zellen wird durch eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Daneben scheinen ko-stimulatorische Moleküle deren Funktion direkt oder indirekt zu modulieren. Es existieren Hinweise, dass die Stimulation von NK-Zellen über CD27 in die Immunantwort von NK-Zellen involviert ist. Da NK-Zellen eine bedeutende Rolle in der frühen Kontrolle viraler Infektionen spielen, erscheint CD27 im Kontext der HCV-Infektion interessant. Daher sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob sich anhand der Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD27 unterschiedliche NK-Zell-Subpopulationen unterteilen lassen. Weiterhin sollte der Einfluss der Ko-Stimulation auf die Funktion dieser Zellen untersucht und ihre Bedeutung im Zusammenhang mit einer HCV-Infektion geklärt werden.

Epidemiologische und funktionelle Daten deuten stark darauf hin, dass NK-Zellen den natürlichen Verlauf einer HCV-Infektion beeinflussen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bisher nicht komplett verstanden. Da für murine NK-Zellen eine anti-fibrotische Aktivität nachgewiesen wurde, ist dies auch für den Menschen denkbar. Die hepatische Infiltration mit immunkompetenten Zellen gilt als ein histologisches Kennzeichen der HCV-Infektion. Die damit verbundene Entzündungsreaktion wird als entscheidender Faktor bei der Immunpathogenese der Infektion betrachtet. Hierbei sind Chemokine entscheidend an der Rekrutierung von Lymphozyten in die Leber beteiligt. Bei der HCV-Infektion scheinen der Chemokin-Rezeptor CXCR3 und seine Liganden bezüglich der Leberschädigung von Bedeutung zu sein. Die Vermutung, dass CXCR3-exprimierende NK-Zellen eine Rolle bei der HCV-assoziierten Leberschädigung spielen, sollte im zweiten Teil der Arbeit überprüft werden. Dazu sollte analysiert werden, inwieweit die Expression von CXCR3 abgrenzbare distinkte NK-Zell-Subpopulationen charakterisiert. Ferner sollte die Bedeutung dieser Zellen für den Verlauf einer chronischen HCV-Infektion und der

damit assoziierten Leberfibrose durch Untersuchungen der anti-fibrotischen Aktivität bestimmt werden.

## II. Material

### 1 Geräte

Autoklav	Tuttnauer, Wesel
CO <sub>2</sub> Inkubator	Forma Scientific, Frankfurt a.M.
Durchflusszytometer FacsCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer FacsCanto II	BD, Heidelberg
Feinwaage BP 61	Sartorius, Göttingen
Inverses Lichtmikroskop Typ DMI	Leitz, Köln
Kühlzentrifuge	Beckman Coulter, München
LightCycler™-Instrument	Roche, Mannheim
MACS-Separator Vario	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroplattenleser Sunrise®	Perkin Elmer, Männedorf, Schweiz
Mikrozentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plattenschüttler Typ MTS 2	IKA-Labortechnik, Staufen
Sterilbank BSB4A	Flow Laboratories, Meckenheim
Sterilisator Typ F-60	Dr. Gruß KG, Neuss
Tischzentrifuge Biofuge 13	Haereus, Osterode
Vortexer Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik, Staufen
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Nalgene, Schwerte
Mikroplattenleser Infinite® M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Zellsorter FACSAria III	BD, Heidelberg
Nanodrop	PEQLAB, Erlangen

## 2 Verbrauchsmaterial

Auslaufpipetten (5, 10, 25ml)	Greiner-Bio One, Frickenhausen
Chirurgische Einmal-Skalpelle	B. Braun, Melsungen
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Einmalfiltrationsgeräte	Nunc, Wiesbaden
Einweg-Handschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
Transwell® 6,5mm; 3,0 µm Poren	Corning, Amsterdam, Niederlande
MACS-Röhrchen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
LumiNunc-Platte, 96-well	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Light-Cycler™ Kapillaren	Roche, Mannheim
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Parafilm®	Brand, Wertheim,
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Polypropylen-Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner-Bio One, Frickenhausen
Polystyren-FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
S-Monovette für Heparinblut (9ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Wattestäbchen	LIDL, Neckarsulm
Zellkulturflaschen (25, 75cm <sup>2</sup> )	Greiner-Bio One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (24, 48, 96-Loch)	Greiner-Bio One, Frickenhausen
Zellsieb (100µm)	BD, Heidelberg
Kryoröhrchen (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht

### 3 Reagenzien

4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Accutase	PAA, Cölbe
Ampuwa (steriles Aqua dest.)	Fresenius, Bad Homburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CellFix™ Fixierlösung	BD, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
HCV Core Protein (rekombinant) fusioniert mit $\alpha$ -Galaktosidase	Fitzgerald, Acton, USA
HCV NS3 Protein (rekombinant) aa 1450 – 1643, fusioniert mit $\alpha$ -Galaktosidase	Fitzgerald, Acton, USA
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)-Lösung	PAA, Cölbe
Peptidoglykan (PGN)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	Apotheke des Universitätsklinikums Bonn
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	PAA, Cölbe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin EDTA	PAA, Cölbe
Primer (Echtzeit-PCR)	TIB Molbiol, Berlin
Steady-Glo® Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Ficoll-Separationsmedium	PAA, Cölbe
Erythrozyten-Lysepuffer	BD, Heidelberg
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom, Berlin

## Material

G418 (Geneticin)	PAA, Cölbe
Brefeldin A aus <i>Penicillium brefeldianum</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Golgi Stop	BD, Heidelberg
Blasticidin	PAA, Cölbe
EDTA	PAA, Cölbe
Hyaluronsäure (HA)	SERO TECH, Düsseldorf
Sternzell-Medium & -Zusätze	ScienCell, Carlsbad, CA, USA

## 4 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-2B4 PE		Ziege, IgG	R&D, Wiesbaden
Anti-CD107a PE	H4A3	Maus, IgG <sub>1</sub>	BD, Heidelberg
Anti-CD127 PE	HIL-7R-M21	Maus IgG <sub>1</sub>	BD, Heidelberg
Anti-CD158b FITC	CH-L	Maus, IgG <sub>2B</sub>	BD, Heidelberg
Anti-CD16 PerCP	3G8	Maus IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD27 (aktivierend)	O323	Maus, IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD27 PE	O323	Maus IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD3 APC/Cy7	UCHT-1	Maus IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD3 PerCP	SK7	Maus IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD45 Brilliant Violet	HI30	Maus, IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD48 PE	394607	Maus, IgG <sub>2B</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-CD56 APC	B159	Maus, IgG <sub>1</sub>	BD, Heidelberg
Anti-CD56 APC	HCD56	Maus IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD62L PE	DREG-56	Maus, IgG <sub>1</sub>	BD, Heidelberg
Anti-CD70 (blockierend)	BU 69	Maus IgG <sub>1</sub>	Abcam, Cambridge, USA
Anti-CD70 PE	113-16	Maus IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD94	131412	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-CRACC PE	235614	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-CXCR3 FITC	49801	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D, Wiesbaden

Material

Anti-IFN- (blockierend)	NIB42	Maus IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Anti-INF- PE	25723	Maus, IgG <sub>2B</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-NKG2A PE	131411	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-NKG2D (blockierend)	149810	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-NKG2D PE	149810	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-NKp30 PE	210845	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-NKp46 PE	195314	Maus, IgG <sub>2B</sub>	R&D, Wiesbaden
Anti-NTBA PE	292811	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D, Wiesbaden
Isotyp-Kontrolle FITC	MOPC-21	Maus, IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Isotyp-Kontrolle FITC	11711	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D, Wiesbaden
Isotyp-Kontrolle PE	MOPC-21	Maus, IgG <sub>1</sub>	Biolegend, San Diego, USA
Isotyp-Kontrolle PE	133303	Maus, IgG <sub>2B</sub>	R&D, Wiesbaden

## 5 Zytokine

Rekombinantes humanes IL-2	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes IL-12	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes IL-15	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes CXCL10	PromoKine, Heidelberg
Rekombinantes humanes CCL5	PromoKine, Heidelberg

## 6 Kits

NK cell Isolation Kit II	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Human IP-10 ELISA Kit	Ray Biotech, Norcross, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTec Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Cytofix/Cytoperm Permeabilization <sup>TM</sup>	BD, Heidelberg

## 7 Zelllinien und primäre Zellen

HUH7A2 <sub>Replikon</sub>	humane transfizierte Hepatomzelllinie, V. Lohmann, R. Bartenschlager, Heidelberg
K562	humane Leukämie-Zelllinie; generiert aus Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (Blasenstadium) ATCC CCL-243
Primäre HSC	primäre aktivierte humane hepatische Sternzellen, ScienCell, Carlsbad, CA, USA

## **8 Puffer und Medien**

### MACS-Puffer

PBS

0,5% BSA

2 mM EDTA

### Pufferkontrolle für NS3/Core-Stimulation

Aqua dest.

8 M Harnstoff

20 mM Tris-HCl pH 8.0

10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

### Erythrozyten-Lysepuffer (10x)

1l Aqua dest.

89,9 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

10,0 g  $\text{KHCO}_3$

0,37g Tetra Sodium EDTA

pH 7.3

### Medium für primäre Zellen

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

10% FCS

10U/ml Penicillin

10 $\mu$ g/ml Streptomycin

Medium für HUH7A2<sub>Replikon</sub> Zellen

DMEM high Glucose 4.5g/l

10% FCS

10U/ml Penicillin

10µg/ml Streptomycin

1% NEA (nicht-essenzielle Aminosäuren)

1mg/ml Geneticin

3µ/ml Blasticidin

Medium für K562 Zellen

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

10% FCS

10U/ml Penicillin

10µg/ml Streptomycin

Monozyten-Medium

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

5% FCS

10U/ml Penicillin

10µg/ml Streptomycin

Medium für primäre Hepatozyten

Sternzell-Basalmedium

2% FCS

1% Wachstumsfaktoren-Zusatz

10U/ml Penicillin

10µg/ml Streptomycin

Einfriermedium

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

10% FCS

10% DMSO

## 9 Untersuchungsmaterial

Für die phänotypischen und funktionellen Untersuchungen peripherer NK-Zellen wurden 20-30ml heparinisiertes Vollblut durch die Hepatologische Spezialambulanz, die Gastroenterologische Ambulanz und die Immunologische Ambulanz der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt. Zudem wurde Vollblut aus der „Praxis am Ebertplatz“ in Köln bezogen. Zur Analyse intrahepatischer NK-Zellen standen nicht benötigte Anteile von routinemäßig an der Medizinischen Klinik I durchgeführten Leberbiopsien zur Verfügung. Von allen in der Arbeit eingeschlossenen Patienten wurde zuvor eine Einverständniserklärung über die Verwendung des Materials zu wissenschaftlichen Versuchszwecken unterschrieben. Alle Studien sind von der Ethikkommission der Universität Bonn bewilligt worden.

Die detaillierte Patientencharakteristik ist den Tabellen zu entnehmen. Zu Tabelle 1 ist anzumerken, dass alle Patienten mit HIV/akuter HCV-Ko-Infektion zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses mindestens ein Jahr lang mit einer HAART behandelt wurden. Aufgrund der erhaltenen Immunkompetenz konnte in diesen Patienten modellhaft eine akute HCV-Infektion untersucht werden. Tabelle 2 beinhaltet die Daten aller Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion, von denen Blut- sowie Lebergewebe-Proben zur Verfügung standen.

**Tabelle 1: Patientencharakteristik CD27**

	HIV(+)/aHCV(+)		HIV(+)/cHCV(+)	HIV(+)	Gesunde Kontrollen
	akut -> spontan ausgeheilt	akut -> chronisch			
Anzahl	12	18	11	7	11
Männliches Geschlecht <sup>a)</sup>	12 (100%)	18 (100%)	10 (91%)	5 (71%)	5 (46%)
Alter (Jahre) <sup>b)</sup>	38.7 (31 - 50)	41.6 (27 - 52)	46.2 (38 - 58)	46.9 (34 - 58)	30.8 (21 - 52)
<b>Risikofaktoren</b>					
MSM <sup>a),d)</sup>	11 (92%)	14 (78%)	4 (36%)	5 (71%)	-
Andere/Unbekannt <sup>a)</sup>	1 (8%)	4 (22%)	7 (64%)	2 (29%)	-
<b>Klinische Daten</b>					
ALT (U/l) <sup>b)</sup>	784 (23 - 3208)	736 (26 - 3644)	74 (4 - 181)	26 (16 - 40)	n.a. <sup>e)</sup>
AST (U/l) <sup>b)</sup>	501 (16 - 1638)	424 (24 - 2006)	51 (20 - 102)	19 (16 - 24)	n.a. <sup>e)</sup>
<b>HIV-Status</b>					
HIV-Last (Kopien/ml) <sup>a)</sup>	≤ 50	≤ 50	≤ 50	≤ 50	-
CD4 Zellen / µl <sup>b)</sup>	646 (358 - 873)	698 (300 - 1377)	624 (354 - 1151)	751 (421 - 1199)	n.a. <sup>e)</sup>
CD8 Zellen / µl <sup>b)</sup>	1270 (407 - 1794)	1178 (220 - 2775)	1087 (254 - 2249)	1011 (366 - 1574)	n.a. <sup>e)</sup>
HAART <sup>a)</sup>	12 (100%)	18 (100%)	11 (100%)	7 (100%)	-
PI-basiert <sup>a)</sup>	10 (83.3%)	14 (77.8%)	7 (63.6%)	3 (42.9%)	-
Nicht PI-basiert <sup>a)</sup>	2 (16.7%)	4 (22.2%)	4 (36.4%)	4 (57.1%)	-
<b>HCV-Status</b>					
HCV-Last (x10 <sup>6</sup> Kopien/ml) <sup>b)</sup>	14.8 (<0.1 - 69)	14.5 (<0.1 - 69)	4.9 (0.4 - 26)	-	-
<b>HCV-Genotypen:</b>					
Genotyp 1 <sup>a)</sup>	7 (58%)	13 (72%)	9 (82%)	-	-
Genotyp 2 <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-
Genotyp 3 <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-
Genotyp 4 <sup>a)</sup>	-	4 (22%)	2 (18%)	-	-
Unbestimmter Genotyp <sup>a)</sup>	5 (42%)	1 (6%)	-	-	-

**Tabelle 2: Patientencharakteristik CXCR3**

	HCV RNA(+)	Gesunde Kontrollen
Anzahl	57	27
Weibliches Geschlecht <sup>a)</sup>	16 (28.1%)	13 (48.1%)
Alter (Jahre) <sup>b)</sup>	46.95 (17 - 72)	29.1 (22 - 49)
<b>Klinische Daten</b>		
ALT U/l <sup>b)</sup>	96.2 (13 - 384)	n.a. <sup>e)</sup>
γ-GT <sup>b)</sup>	142.9 (21 - 957)	n.a. <sup>e)</sup>
<b>HCV-Status</b>		
HCV-Last (x10 <sup>6</sup> Kopien/ml) <sup>b)</sup>	5.2 (n.a. - 23.3)	-
<b>HCV-Genotypen:</b>		
Genotyp 1 <sup>a)</sup>	29 (50.9%)	-
Genotyp 2 <sup>a)</sup>	3 (5.3%)	-
Genotyp 3 <sup>a)</sup>	8 (14.0%)	-
Genotyp 4 <sup>a)</sup>	4 (7.0%)	-
Unbestimmter Genotyp <sup>a)</sup>	13 (22.8%)	-

a) Anzahl der Fälle (Anzahl / Gesamtmenge in %)

b) Mittelwert (Wertebereich)

c) n.a. – nicht analysiert

d) MSM (men who have sex with men)

e) Viruslast unterhalb des Detektionslimits von 50 Kopien/ml

### III. Methoden

#### 1 Zellkultur und zellbiologische Methoden

##### 1.1 Kultivierung der HUH7 A2<sub>Replikon</sub> Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit wurde die HUH7 A2<sub>Replikon</sub> Zelllinie (im Weiteren HUH7<sub>Replikon</sub>) verwendet, welche sich autonom replizierende subgenomische HCV RNA enthält. Neben einem Resistenzgen für Neomycin (G418) codiert das Replikon auch für die Nicht-Struktur-Proteine NS3-NS5B. Zusätzlich ist ein Luciferase-Gen vorhanden, mit dessen Hilfe eine direkte sensitive Quantifizierung der HCV RNA-Replikation möglich ist <sup>161,162</sup>.

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von V. Lohmann und R. Bartenschlager (Institut für Molekulare Virologie, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um adhärente Zellen, die in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% nicht essentiellen Aminosäuren (NEA), sowie den Antibiotika G418 (1mg/ml) und Blasticidin (3µg/ml) kultiviert wurden. Huh7<sub>Replikon</sub> Zellen wurden zwei Mal wöchentlich passagiert. Dabei wurden sie mit Accutase gelöst und in einer Verdünnung von 1:4 neu ausgesät.

##### 1.2 Kultivierung der K562 Zelllinie

Die MHC-I defiziente K562 Zelllinie wurde in RPMI 1640 Medium mit 10%FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zur Passage der Suspensionszellen wurde 1ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit 25ml frischem Medium überführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow) durchgeführt.

##### 1.3 Kultivierung primärer Zellen

Isolierte primäre aktivierte humane hepatische Sternzellen wurden 2-4 Passagen in definiertem Sternzellmedium (StemCell) mit 2% FCS, 1% Sternzellwachstumszusatz, 10U/ml Penicillin und 10µg/ml Streptomycin bei 5%CO<sub>2</sub> und 37°C im Brutschrank kultiviert und bis zum Gebrauch kryokonserviert. Die HSC wurden 2 Tage vor Versuchsbeginn aufgetaut und in Kultur genommen.

Zur Kurzzeit-Kultivierung isolierter NK-Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml in RPMI 1640 Medium / 10%FCS / 1%P/S bei 37°C über Nacht unter

Zugabe von 25U/ml IL-2 (soweit nicht anders im Text angegeben) im Brutschrank kultiviert. Monozyten wurden in RPMI 1640 / 5% FCS / 1%P/S kultiviert.

#### **1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch anhand einer Neubauer-Zählkammer. Hierbei handelt es sich um einen Objektträger, auf den 4 Großquadrate (wiederum unterteilt in 16 Kleinquadrate) mit jeweils einer Fläche vom  $1\text{mm}^2$  und einer Kammertiefe von 0,1mm eingraviert sind. Das somit vorliegende Kammervolumen innerhalb eines Großquadrates beträgt  $0,1\mu\text{l}$ . Zum Ausschluss toter Zellen aus der Zählung wird die Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung (0,025% (w/v) in Aqua dest.) angefärbt. Hierbei kann der Farbstoff nur das Zytoplasma jener Zellen blau anfärben, die aufgrund einer nicht mehr intakten Zellmembran dafür durchlässig geworden sind. Aus dem Volumen eines Großquadrates unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich zur Berechnung der Zellkonzentration folgende Formel:

$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \text{Zellzahl in einem Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.$

## 2 Immunologische und molekularbiologische Methoden

### 2.1 Zellisolation

#### 2.1.1 Isolation peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation nach Böyum

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden aus frischem, heparinisiertem Blut mittels der von Böyum entwickelten Methode separiert <sup>163</sup>. Hierbei erfolgt durch Dichtegradientenzentrifugation die Trennung der Blutbestandteile aufgrund ihrer Größe und Dichte. Das stark verzweigte synthetische Polymer Ficoll aus Saccharose und Epichlorhydrin dient dabei als Gradientenbildner. Nachdem die Ficoll-Lösung mit verdünntem antikoaguliertem Blut überschichtet und anschließend zentrifugiert wurde, befinden sich Lymphozyten und Monozyten in der milchigen Interphaseschicht am Grenzbereich zur Ficoll-Lösung. Während Erythrozyten und Granulozyten am Boden pelletieren, sammeln sich Serum und Thrombozyten im Überstand. Mit einer Pasteurpipette kann daraufhin die mit PBMC angereicherte Interphaseschicht vorsichtig abgenommen werden.

#### Durchführung

- antikoaguliertes Blut 1:2 mit PBS verdünnen
- 15ml Ficoll-Lösung in 50ml Falcon vorlegen
- vorsichtig mit verdünntem Blut überschichten
- Zentrifugation bei 2400 U/min für 20min ohne Bremse
- PBMC enthaltende Interphase mit Pasteurpipette abnehmen
- Überführen in ein 15ml Falcon und mit PBS waschen
- Zentrifugation bei 1750 U/min für 10min
- Überstand verwerfen
- Zellpellet in PBS resuspendieren und auf 15ml auffüllen
- Zentrifugation bei 1350u/min

- Überstand verwerfen
- Zellpellet in PBS resuspendieren
- Bestimmung der Zellzahl

### **2.1.2 Immunmagnetische Isolation von Natürlichen Killer-Zellen und Monozyten**

Aus PBMC von Patienten und gesunden Probanden wurden Natürliche Killer-Zellen und Monozyten mittels immunmagnetischer Separation gewonnen. Bestimmte Zellpopulationen können auf diese Weise durch Bindung an Magnetpartikel aus einer heterogenen Zellsuspension isoliert werden. Dabei erfolgt die Markierung der Zellen über biotinylierte Antikörper, welche spezifische Oberflächenproteine der Zielzellen erkennen. Mit Hilfe eines magnetisch aktiven Sekundärantikörpers, der sich spezifisch gegen Biotin richtet, werden Antigen-Antikörper-Komplexe magnetisch detektierbar. Wird die Zellsuspension in einer Säule anschließend einem Magnetfeld ausgesetzt, bleiben so die magnetisch markierten Zellen haften, während unmarkierte Zellen als Eluat die Säule passieren. Es lassen sich zwei Arten der Zellseparation unterscheiden: die Positiv-Isolation, bei der die zu isolierende Zellpopulation mit spezifisch gegen definierte Oberflächenmoleküle gerichtete Antikörper markiert und von den durchfließenden unmarkierten Zellen separiert wird und die Negativ-Selektion, bei der alle unerwünschten Zellen durch ein Antikörpergemisch markiert und somit in der Säule zurückgehalten werden und sich die Zielpopulation im Eluat findet.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Negativselektionen mit Kits der Firma Miltenyi entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.1.3 Isolation von CXCR3(+)/(-) und CD27(+)/(-) NK-Zell-Subpopulationen**

Durch Negativ-Selektion gewonnene NK-Zellen gesunder Spender wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD56 und CXCR3 bzw. CD27 gefärbt und in der Flow Cytometry Core Facility, Institut für Molekulare Medizin, Bonn am FACSAria III Cell Sorter (BD) hinsichtlich einfach- und doppelt-positiver Fluoreszenz sortiert. Die NK-Subpopulationen wurden in Kulturmedium aufgefangen, mit IL-2 stimuliert und direkt im Anschluss in weiterführenden Experimenten eingesetzt oder über Nacht im Brutschrank aufbewahrt.

## **2.2 Generierung von Monozyten-Überständen**

Um zu untersuchen, ob die Sekretion von CXCL10 in humanen Monozyten durch HCV-Proteine induziert werden kann, wurden diese in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$ /ml in Medium aufgenommen und in eine 24-well Platte pipettiert. Die Stimulation der Monozyten erfolgte mit:

- HCV Core            3µg/ml
- HCV NS3            5µg/ml
- Peptidoglykan      1µg/ml

für 24h im Brutschrank. Als Negativkontrolle wurde Medium, versetzt mit dem Puffer, in dem HCV Core und HCV NS3 gelöst vorlagen, eingesetzt. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Überstand in 200µl-Aliquots abgenommen und für weitere Bestimmungen bei -20°C eingefroren. Monozyten-Überstände wurden im CXCL10-ELISA und im Migrations-Assay eingesetzt.

## **2.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

Der ELISA stellt eine sehr sensitive immunbiologische Nachweismethode dar, die den quantitativen Nachweis von Antigenen über eine enzymatische Farbreaktion ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde ein sogenannter „Sandwich“ ELISA verwendet, um den CXCR3-Liganden CXCL10 im Überstand stimulierter Monozyten nachzuweisen. Dazu wird ein CXCL10-spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf einer Mikrotiterplatte

immobilisiert. Durch Zugabe einer Probe, welche das zu untersuchende Protein enthält, kann dieses vom Primärantikörper gebunden werden. Wird ein weiterer Antikörper (Sekundärantikörper) hinzugefügt, der gleichermaßen gegen das Antigen gerichtet, darüber hinaus zusätzlich an Biotin gekoppelt ist, kann der Nachweis ausgebildeter Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgen. Dazu wird dem Ansatz das Enzym Peroxidase beigefügt, das an Streptavidin gekoppelt ist. Letzteres bindet an den Biotinrest des Sekundärantikörpers. Die Zugabe des Enzymsubstrates resultiert nach Ablauf der enzymatischen Reaktion in einem Farbumschlag, dessen Lichtabsorption bei 450nm gemessen wird und mit der Menge gebundenen CXCL10 korreliert. Parallel zu den Probenansätzen wird eine Verdünnungsreihe des Proteins in bekannter Konzentration (Standard) mitgeführt. Durch Vergleich der Extinktionen der Standardreihe kann die Menge an Protein im Probengemisch bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Human IP-10 ELISA Kit der Firma RayBio verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers.

## **2.4 Migrations-Assay**

Der Migrations-Assay diente in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der gerichteten Migration von NK-Zellen entlang eines Zytokingradientens.

Grundlage des Versuches stellt die von Boyden beschriebene Methode dar, bei der Zellen durch eine poröse Membran hindurch in Richtung eines Gradienten wandern<sup>164</sup>. Zu diesem Zweck wurden Zellkultureinsätze (Transwell) verwendet, welche die Vertiefungen einer 24-well Mikrotiterplatte in zwei Kammern unterteilen. Auf die poröse Membran wurden  $2 \times 10^5$  NK-Zellen in einem Volumen von 100 $\mu$ l ausgesät, denen durch die 3 $\mu$ m großen Poren eine Passage möglich war. In der unteren Kammer befanden sich Überstände stimulierter Monozyten (s. III2.2) bzw. PBS mit/ohne Stimulus (Gesamtvolumen 600 $\mu$ l). Die Migration der NK-Zellen erfolgte in die untere Kammer hinein. Nach 3.5h wurden die migrierten NK-Zellen aus der unteren Kammer zur weiteren Analyse mittels Durchflusszytometrie entnommen.

Als Stimuli wurden eingesetzt:

- Monozyten-Überstand aus PGN-Stimulation
- Monozyten-Überstand aus HCV-Core-Stimulation
- rh IL-12 (50ng)
- CCL5 (100ng)
- CXCL10 (100 / 600ng)

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde folgende Formel zur Berechnung des Migrations-Index herangezogen:

MI = Anzahl migrierte Zellen in PBS mit Stimulus / Anzahl migrierte Zellen in PBS ohne Stimulus.

## **2.5 Durchflusszytometrie (FACS)**

### **2.5.1 Prinzip**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für durchflusszytometrische Messungen das FacsCanto II (BD, Heidelberg) genutzt, das eine parallel Analyse von bis zu 8 Fluorophoren zulässt. Methodisch erlaubt die Durchflusszytometrie, viele Zellen in kurzer Zeit hinsichtlich ihrer Eigenschaften zu analysieren.

Durch einen Flüssigkeitsstrom fokussiert, werden die Zellen vereinzelt und nacheinander an einem Laser vorbeigeführt. Dabei wird das Licht unterschiedlich stark gestreut. Die Streuung des Lichtes wird durch die Eigenschaften der Zelle bestimmt, sodass die Messung des Vorwärtsstreulichts (FSC, Forward Scatter) Rückschlüsse auf die Größe und des Seitwärtsstreulichts (SSC, Side Scatter) auf die Granularität der Zelle zulässt. Zusätzlich ist der Nachweis oberflächlicher und intra-zellulärer Antigene möglich. Durch Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper können diese ebenfalls im SSC detektiert werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei abhängig von der Anzahl der pro Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle. Das für jedes Fluorochrom spezifisch emittierte Licht wird auf Detektoren geleitet. Die Signale

werden verstärkt und letztlich in Daten für die weitere computergestützte Auswertung umgewandelt.

Eine spezielle Form der Durchflusszytometrie stellt das sogenannte Sorten (Fluorescent Activated Cell Sorting) dar. Hierbei können Zellen eines heterogenen Gemisches aufgrund ihrer Eigenschaften mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper voneinander separiert und für weitere Analysen angereichert werden.

Die Auswertung und graphische Aufarbeitung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software (Tristar, Ashland, USA). Ausgewertet wurden durch Setzen von sogenannten Gates jene Zellen, die ein bestimmtes Molekül exprimieren, angegeben als Prozent positive Zellen (vgl. Abb. 9). Eine weitere Möglichkeit stellt die Angabe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) durch die Software dar, die Rückschlüsse auf die Expressionsdichte eines Moleküls einer eingegrenzten Zellpopulation zulässt. Dazu wurde der jeweilige Marker anhand des zugehörigen Isotyp-Antikörpers (Kontrolle) nach folgender Formel zum RFI (relative Fluoreszenzintensität) normiert:

$$\text{RFI} = ( \text{MFI (Rezeptor)} - \text{MFI (Kontrolle)} ) / \text{MFI (Kontrolle)}.$$

## **2.5.2 Markierung von Zelloberflächenmolekülen**

### **2.5.2.1 Färbung von Oberflächenantigenen primärer Zellen und Zelllinien**

Zur phänotypischen Charakterisierung von aufgereinigten PBMC, NK-Zellen oder Zielzellen wurden 5µl Antikörperlösung (CD3-PerCP 1µl) in einem Probenvolumen von 100µl und einer Zellkonzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingesetzt. Die Färbung erfolgte in Polystyren-FACS-Röhrchen für 25min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde der Ansatz mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1350rpm, 10min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100µl Cellfix resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Zur Analyse der intra-hepatischen NK-Zell-Zusammensetzung dienen Leberbiopsien. Unter Zuhilfenahme eines Zellspatels wurde die Biopsie durch ein Sieb (100µm) gedrückt und die mechanisch vereinzelteten Zellen in PBS gewaschen (1350rpm, 10min). Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der zuvor beschriebenen Vorgehensweise.

### **2.5.2.2 Färbung von Oberflächenantigenen im Vollblut**

Bei Färbungen im Vollblut wurden 100µl heparinisieretes Vollblut mit PBS verdünnt (1:1) und dem Waschschrift nach der Oberflächenantigen-Färbung eine Erythrozytenlyse angeschlossen. Erythrozyten sind im Vergleich mit Leukozyten und anderen kernhaltigen Zellen gegen eine hypotone Lyse empfindlicher und können durch Inkubation mit einer hypotonen Lösung aus einem Zellgemisch entfernt werden. Hierfür wurden die Zellen in 1ml Lysepuffer resuspendiert, nach 10minütiger Inkubation zweimalig mit PBS gewaschen und darin aufbewahrt. Die Messung erfolgte innerhalb der nächsten 2 Stunden.

### **2.5.2.3 Färbung intra-zellulärer Zytokine**

Nach Permeabilisierung der Zellmembran können intra-zellulär akkumulierte Proteine mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Färbung von IFN- erfolgte mit Hilfe des Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilisation Kits (BD).

Durchführung:

- Überführen der Zellen in FACS-Röhrchen
- Zugabe entsprechender Menge Antikörper zur Oberflächenantigenfärbung (25min, dunkel)
- Waschen mit 2ml PBS / 2% FCS; 1350rpm, 10min
- Verwurf des Überstandes
- Pellet in 50µl Cytofix/Cytoperm resuspendieren
- Inkubation 20min, 4°C
- Waschen mit 500µl Perm / Wash; 1350rpm, 10min (2x)
- Zugabe von 5µl anti- IFN- -Antikörper
- Inkubation 30min, 4°C, dunkel
- Waschen mit 1ml Perm / Wash; 1350rpm, 10min
- Pellet in 100µl Cellfix resuspendieren

## 2.6 Ko-Inkubations-Assays

Zur funktionellen Untersuchung von NK-Zellen wurden diese mit Zielzellen (HSC / HUH7<sub>Replikon</sub>) für 5 Stunden ko-inkubiert und anschließend die Expression von CD107a als Marker der Degranulation oder die Sekretion von IFN- durch NK-Zellen gemessen. Alle funktionellen Untersuchungen mit NK-Zellen in dieser Arbeit wurden (soweit nicht anders vermerkt) mit IL-2 (25U) stimulierten NK-Zellen durchgeführt.

Der CD107a-Assay bedient sich der Tatsache, dass NK-Zellen nach Erkennung und Konjugation von Zielzellen mit ihren zytotoxischen Granula neben den lytischen Komponenten zugleich das Lysosomen-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP-1 / CD107a) freisetzen und dieses zugänglich zur FACS-Antikörpermarkierung wird. Um die endozytotische Internalisierung des Moleküls zu unterbinden, wird während der Ko-Inkubation GolgiStop (BD) zugegeben, welches durch das enthaltene Monensin durch Ansäuerung die Aufnahme in Endosomen blockiert.

Zum Nachweis intra-zellulär produzierter Zytokine wie IFN- muss deren Sekretion aus der Zelle verhindert und die Akkumulation innerhalb der Zelle begünstigt werden. Zur Hemmung des sekretorischen und lysosomalen Proteintransports erfolgt daher die Zugabe von BFA (Brefeldin A).

Durchführung:

- Aussaat der Zielzellen in Zellkulturplatte (48-well)
- Zugabe der NK-Zellen im Verhältnis 1:1
- Hinzufügen von 5µl anti-CD107a-AK zum Ko-Inkubationsansatz
- nach 1h Zugabe von 0.5µl GolgiStop bzw. 2.5µl BFA (10µg/ml)
- nach beendeter Inkubation: Überführen der Ansätze in FACS-Röhrchen zur Färbung für die Durchflusszytometrie (siehe 2.5.2.1)

## 2.7 Luciferase-Assay

Zur Untersuchung des anti-viralen Potentials von NK-Zellen wurden diese, bzw. generierte NK-Zell-Überstände, mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen inkubiert. Letztere wurden dazu in 48-well-Platten ausgesät, nach 3h das Medium abgesaugt und mit NK-Zellen bzw. NK-Zell-Überständen in unterschiedlichen E:T-Verhältnissen über einen Zeitraum von 24h kultiviert. Als Anhaltspunkt für die basale Luciferase-Aktivität (Kontrolle) wurden analog behandelte Ansätze ausschließlich mit HUH7<sub>Replikon</sub>-Zellen mitgeführt. Vor Messung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen aller Ansätze mit je 100µl Steady-Glo (Steady-Glo Luciferase assay System, Promega) für 8min schüttelnd im Dunkeln lysiert. Die Lösung wurde luftblasenfrei in eine LumiNunc-Platte (96-well) übertragen und die Lumineszenz als Aktivität der Luciferase auf einem Mikrotiterplattenleser (Tecan) gemessen. Die Hemmung der HCV-Replikation wurde als Abnahme an Luciferase-Aktivität betrachtet. Die Berechnung der prozentualen Hemmung der *in vitro*-HCV-Replikation folgte der Formel

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - [\text{Lumineszenz (Probe)} / \text{Lumineszenz (Kontrolle)} \times 100].$$

## 2.8 RNA-Extraktion

Die Isolation von RNA aus humanen hepatischen Sternzellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Hierbei wurden die Zellen in Lyse-/Bindungspuffer vorbereitet und die frei werdende RNA mittels Ethanol selektiv an eine Silica-Gel-Membran gebunden. Durch wiederholtes Zentrifugieren und Waschschrte mit speziellen Puffern wurden DANN, Proteine und Salze beseitigt, die RNA von der Säule gelöst und letztlich in destilliertem Wasser eluiert.

## 2.9 Reverse Transkription und Echtzeit PCR

### 2.9.1 Prinzip

Bei der Reversen Transkription erfolgt das Umschreiben von RNA in DNA (cDNA), katalysiert vom retroviralen Enzym Reverse Transkriptase. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Hierbei katalysiert die DNA-Polymerase die Reaktion und synthetisiert, ausgehend von 2 Oligonukleotid-Primern, die an gegenläufig komplementäre DNA-Stränge binden, neue DNA-Fragmente. In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Echtzeit-PCR (*real-time PCR*) angewendet. Methodisch ermöglicht sie, bereits während der Amplifikation die Zunahme des PCR Produkts sowohl zu quantifizieren als auch zu detektieren. Sie wurde mit dem LightCycler® 2.0 System der Firma Roche Diagnostics durchgeführt. Hierbei erfolgte eine photometrische Messung der Fluoreszenz, die von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR® Green während der Amplifikations-Reaktion erzeugt wird. Die Intensität der Fluoreszenz ist abhängig von der Menge des entstehenden PCR-Produktes. Stark exprimierte Gene bewirken aufgrund der hohen vorliegenden Template-Anzahl eine schnellere Zunahme der Fluoreszenz.

Der Beginn der exponentiellen Amplifikation der PCR-Produkte wird zum Vergleich der Proben herangezogen. Als interne Qualitätskontrolle erfolgt nach Beendigung der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei werden die PCR-Produkte langsam stufenweise erhitzt und gleichzeitig kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Während der Denaturierung ergibt sich ein abfallendes Fluoreszenzsignal bei einer für jedes Produkt bestimmten Temperatur (Schmelzpunkt), woraus sich graphisch eine charakteristische Schmelzkurve erstellen lässt.

## 2.9.2 Untersuchung des Einflusses von CXCL10 auf die Genexpression pro-fibrotischer Proteine in HSC

Zur Untersuchung der potentiell pro-fibrotischen Wirkung von CXCL10 auf aktivierte HSC wurde die Expression von Collagen und  $\alpha$ -SMA auf Transkriptionsebene mit Hilfe des LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kits analysiert. Als Probe kam cDNA aus CXCL10-stimulierten bzw. unstimulierten HSC zum Einsatz. Die Primer-Paare für Col1A1 und  $\alpha$ -SMA wurden von der Firma Qiagen bezogen.

Bei 4°C wurde der folgende Reaktionsansatz vorbereitet:

- 5µl Maxima SYBR Green PCR Master Mix (2x)
- 1µl Primer-Mix (0.5µM)
- 1µl Template (cDNA)
- 3µl ddH<sub>2</sub>O

Für die PCR wurde das folgende Programm genutzt:

10 min 95°C	[initiale Denaturierung]
95°C für 15 sec, 55°C für 30 sec, 72°C für 30 sec	[50 Zyklen]
am Ende des 72°C Schritts	[Detektion der Fluoreszenz]

Schmelzkurvenanalyse:

95°C für 10 s	[Denaturierung]
35°C für 15 s	[Sonden-Anlagerung]
40°C – 80°C (Heizrate 0,2°C/ s) bei kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz	

## 3 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism (Version 5.0a) genutzt. Mann-Whitney-U-Tests und ungepaarte t-Tests wurden zum Vergleich des

NK-Zell-Phänotyps, der zytotoxischen Antwort, von Zytokin-Konzentrationen sowie der Luciferase-Aktivität herangezogen. Der gepaarte Student t-Test kam bei Untersuchungen des NK-Zell-Phänotyps zwischen gepaarten Leber- und Blutproben zum Einsatz. Zur Untersuchung von Korrelationen wurde eine Lineare Regression genutzt.

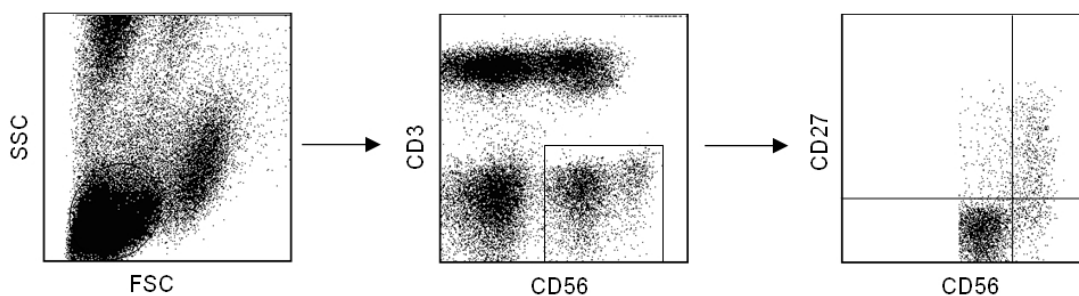
Ein zweiseitiger p-Wert  $\leq 0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen (\*p  $\leq 0.05$ , \*\*p  $\leq 0.01$ , \*\*\*p  $\leq 0.001$ ). Die Daten wurden dargestellt als Boxplot, Balkendiagramm (mit Standardabweichung) oder als Einzelwerte unter Angabe des Mittelwertes.

## IV. Ergebnisse

### 1 Definition von NK-Zell-Populationen anhand der CD27-Expression

#### 1.1 CD27-Expression auf peripheren NK-Zellen

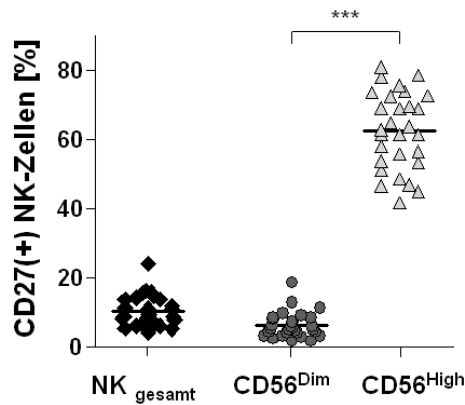
Zum Nachweis von CD27(+) NK-Zellen wurden Vollblutproben gesunder Spender nach Zugabe Fluoreszenz-markierter Antikörper im FACS untersucht (Abb. 1).



**Abb. 1: Expression von CD27 auf peripheren NK-Zellen.** Vollblut gesunder Spender wurde mit Antikörpern gegen CD56, CD3 und CD27 gefärbt und hinsichtlich der Expression von CD27 durchflusszytometrisch untersucht. Die Abbildung verdeutlicht das Setzen der Gates zur Quantifizierung CD27(+) NK-Zellen.

Hierbei zeigte sich, dass anhand der CD27-Expression vier verschiedene NK-Zell-Subpopulationen ( $CD56^{\text{High}}CD27(+)$ ,  $CD56^{\text{High}}CD27(-)$ ,  $CD56^{\text{Dim}}CD27(+)$  und  $CD56^{\text{Dim}}CD27(-)$ ) unterscheidbar sind. Im zirkulierenden Blut wurde CD27 hauptsächlich von  $CD56^{\text{High}}$  NK-Zellen exprimiert (Abb. 2). Daher konzentrierten wir uns in den anschließenden Untersuchungen auf diese Population.

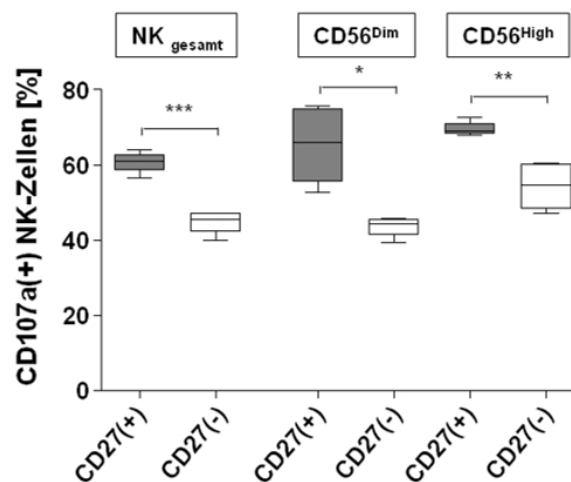
## Ergebnisse



**Abb. 2: CD27-Expression auf peripheren NK-Zellen.** Quantifizierung der durchflusszytometrischen CD27-Analyse auf NK-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl % CD27-positiver NK-Zellen an der Gesamtpopulation bzw. den beiden CD56(+) Subpopulationen (n=29). \*\*\*p 0.001

### 1.2 Funktion CD27(+) NK-Zellen

Anschließend wurde untersucht, ob sich CD27-positive und CD27-negative CD56<sup>High</sup> NK-Zellen hinsichtlich ihrer Funktion unterscheiden. Hierfür wurden isolierte NK-Zellen gesunder Spender nach 5-stündiger Ko-Inkubation mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen in Bezug auf ihr zytotoxisches Potential untersucht. Hierbei wurde die Expression des Degranulationsmarkers CD107a auf CD27(+) und CD27(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen verglichen.



**Abb. 3: Zytotoxische Aktivität von CD27(+) und CD27(-) Zellen.** Isolierte NK-Zellen gesunder Probanden wurden mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen ko-inkubiert (1:1) und anschließend auf Degranulation (n=4) hin untersucht. \*p 0.05, \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001

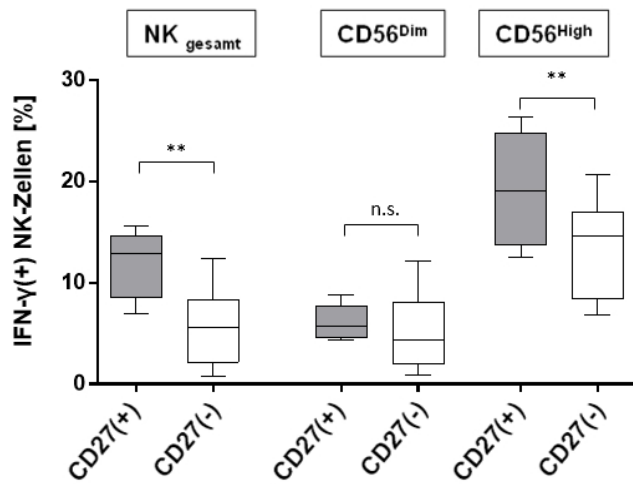
CD27(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen waren im Vergleich zu CD27(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen deutlich zytotoxisch aktiver [69.7% ± 1 vs 54.2% ± 3.5; p 0.01] (Abb. 3).

Die Sekretion von IFN- $\gamma$  stellt einen der Hauptmechanismen zur Eliminierung Virus-infizierter Zellen dar<sup>165</sup>. Daher wurde als nächstes das Potential zur IFN- $\gamma$  Sekretion von CD27(+) und CD27(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen verglichen. Wie Abb. 4A verdeutlicht, sezernierten CD27(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen signifikant mehr IFN- $\gamma$  als ihr CD27-negatives Pendant [19.2% ± 2.3 vs 13.5% ± 2; p 0.01].

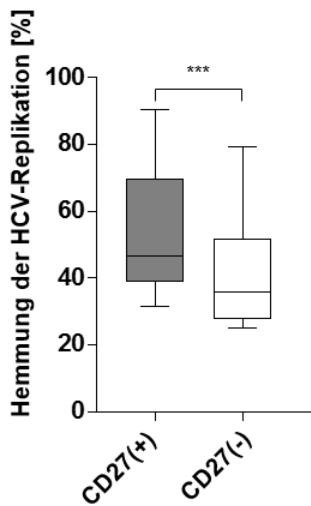
Übereinstimmend damit ergaben Versuche, bei denen die Hemmung der HCV-Replikation durch gesortete CD27(+) bzw. CD27(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen analysiert wurde, eine wesentlich potentere anti-HCV-Aktivität von CD27(+) Zellen [54.8% ± 6.5 vs 42.8% ± 5.8; p 0.001] (Abb. 4B).

## Ergebnisse

A)



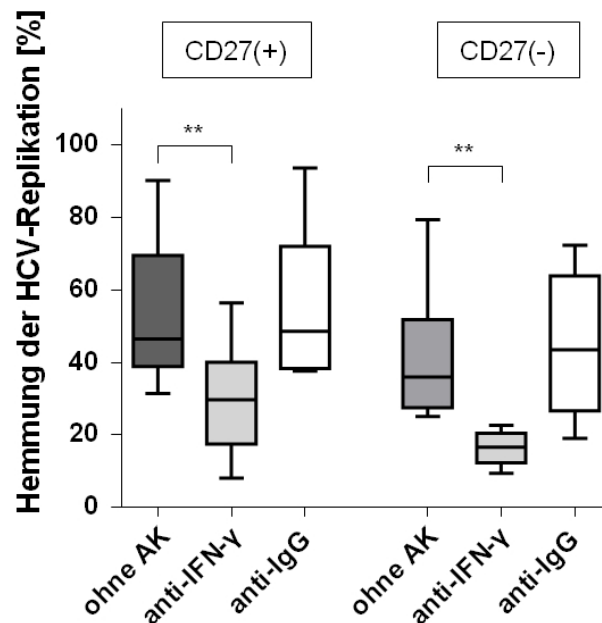
B)



**Abb. 4: Anti-virale Aktivität von CD27(+) und CD27(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen.** (A) Isolierte NK-Zellen gesunder Spender (n=6) wurden mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen zur Analyse der IFN- $\gamma$ -Produktion ko-inkubiert (1:1). (B) Gesortete CD27(+)/CD27(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen (n=9) wurden mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen für 24h ko-inkubiert (1:5) und die Aktivität der Luciferase – als Maß für die *in vitro*-Hemmung der HCV RNA-Replikation – in den Zielzellen bestimmt. n.s. nicht signifikant; \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001

### 1.3 Regulation der anti-viralen Funktion von CD27

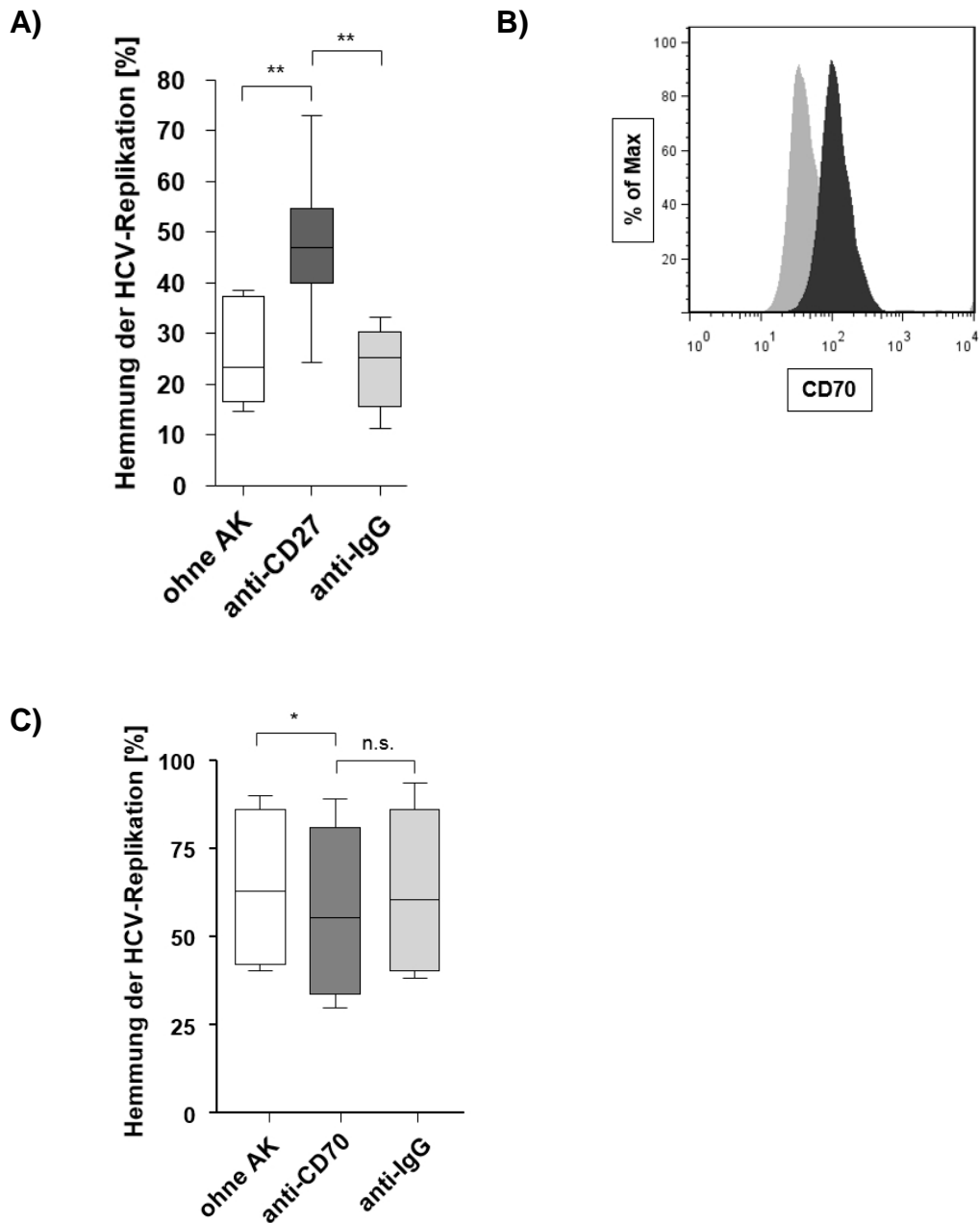
Im Weiteren sollte die starke anti-virale Aktivität von CD27(+)/CD56<sup>High</sup> NK-Zellen näher untersucht werden. In einem ersten Ansatz wurde hierbei die Rolle von IFN- analysiert. Dazu wurden wiederum Ko-Inkubationen von HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen mit gesorteten CD27(+) bzw. CD27(-)/CD56<sup>High</sup> NK-Zellen gesunder Spender durchgeführt und die biologische Aktivität von IFN- mittels Zugabe eines blockierenden Antikörpers unterbunden. Dieser Ansatz resultierte sowohl bei CD27(+) als auch bei CD27(-) Zellpopulationen in einer deutlich verminderten Fähigkeit zur Hemmung der HCV-Replikation [CD27(+) 54.8% ± 6.5 vs 29.8% ± 5.7; CD27(-) 42.8% ± 5.8 vs 16.4% ± 1.8; jeweils p 0.01] (Abb. 5).



**Abb. 5: Einfluss der Blockierung von IFN- auf die Hemmung der Replikation.** Gesortete CD27(+)/CD27(-) CD56<sup>High</sup> NK-Zellen (n=9) wurden ohne bzw. in Anwesenheit eines blockierenden IFN- -Antikörpers mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen (1:5) für 24h ko-inkubiert. Ein IgG-spezifischer Antikörper diente als Kontrolle. Als Maß für die Hemmung der HCV-Replikation wurde die Lumineszenz bestimmt. \*\*p 0.01

Um zu klären, ob die Interaktion von CD27 mit seinem Liganden CD70 in die effektive anti-virale Aktivität CD27-positiver NK-Zellen involviert ist oder alternativ die Expression von CD27 lediglich eine NK Zell-Population mit besonders ausgeprägter Potenz charakterisiert, wurden isolierte NK-Zellen gesunder Probanden in Anwesenheit von IL-12 in anti-CD27-beschichteten Platten kultiviert. In Kontroll-Experimenten wurden NK-Zellen auf anti-IgG-beladenen bzw. unbeschichteten Platten inkubiert. Anschließend wurden die NK-Zellen auf ihre anti-HCV Aktivität getestet. Wie Abb. 6A zu entnehmen ist, führte die Prä-Stimulation mit anti-CD27 zu einer signifikant erhöhten Blockierung der viralen Replikation durch CD56<sup>High</sup> NK-Zellen [25.9% ± 4.5 vs 48% ± 3.5; p 0.01].

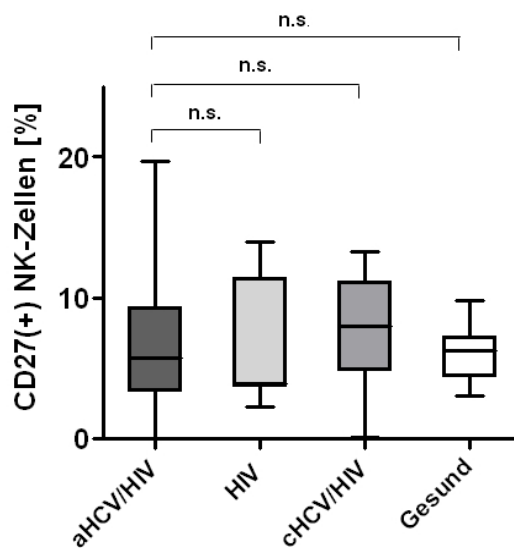
Allerdings führte die Blockierung von CD70 auf der Oberfläche von HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen (Abb. 6B) durch einen neutralisierenden anti-CD70 Antikörper nur zu einer diskreten Verringerung der anti-viralen Aktivität der NK-Zellen [55.5% ± 7.8 vs 59.5% ± 7.1; p 0.05] (Abb. 6C).



**Abb. 6: Rolle der CD27/CD70-Interaktion.** IL-12 aktivierte NK-Zellen gesunder Spender (n=8) wurden für 24h ohne bzw. in Anwesenheit von Antikörpern gegen CD27 / IgG kultiviert und anschließend zur Ko-Inkubation mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen (1:5) eingesetzt (A). Nachweis der Expression von CD70 auf HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen (schwarz) im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (grau) nach durchflusszytometrischer Analyse (B). Isolierte CD56<sup>high</sup> NK-Zellen (n=5) wurden unter Zugabe eines blockierenden CD70-Antikörpers mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen (1:5) inkubiert und anschließend die Luciferase-Aktivität als Indikator der HCV-Replikationshemmung bestimmt (C). n.s. nicht signifikant; \*p 0.05; \*\*p 0.01

#### 1.4 Bedeutung CD27(+) NK-Zellen bei der HCV-Infektion

Abschließend sollte eine mögliche *in vivo*-Relevanz der beobachteten starken antiviralen Aktivität CD27-exprimierender NK-Zellen untersucht werden. Hierfür wurde in einem ersten Schritt die Frequenz CD27(+) NK-Zellen in unterschiedlichen Patientengruppen bestimmt. Untersucht wurden HIV mono-infizierte Personen, HIV(+) Patienten mit einer akuten bzw. chronischen HCV-Ko-Infektion, sowie gesunde Kontrollen. Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit CD27(+) NK-Zellen zwischen den Gruppen nachweisen (Abb. 7).

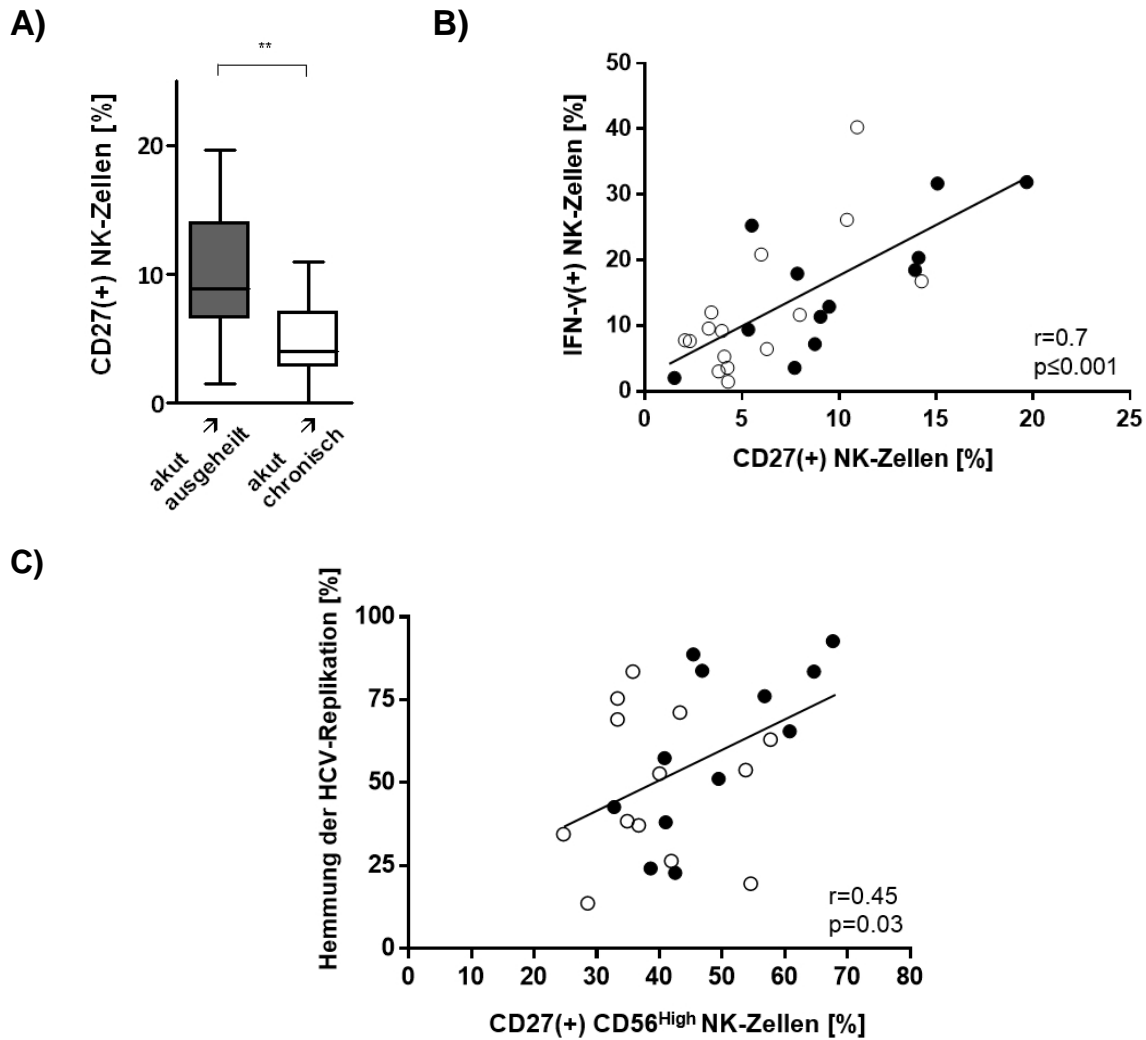


**Abb. 7: CD27-Expression auf peripheren NK-Zellen unterschiedlicher Patientengruppen.** PBMC akut HCV/HIV (n=30) bzw. chronisch HCV/HIV-Ko-Infizierten (n=11), HIV(+) (n=7) und Gesunden (n=11) wurden in Bezug auf CD27-exprimierende NK-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. n.s. nicht signifikant

Allerdings fand sich nach Aufteilung der HIV(+) Patienten mit akuter Hepatitis C in Patienten mit Spontanausheilung der HCV-Infektion und Patienten, die eine chronische Hepatitis C entwickelten, ein signifikant höherer Anteil von CD27(+) NK Zellen in der Gruppe der Spontanausheiler [ $9.8\% \pm 1.5$  vs  $4.9\% \pm 0.7$ ;  $p$  0.01] (Abb. 8A).

Aufgrund der beschränkten Menge der zur Verfügung stehenden Zellen dieser Patienten konnten keine CD27(+) und CD27(-) NK-Zellen für weitere funktionelle Charakterisierungen isoliert werden. Es ließ sich jedoch nachweisen, dass die Frequenz CD27(+) NK-Zellen bei Patienten mit akuter HCV-Infektion sowohl mit der

Sekretion von IFN- $\gamma$ , als auch mit der NK-Zell-vermittelten Hemmung der HCV-Replikation positiv korrelierte (Abb. 8B, C).



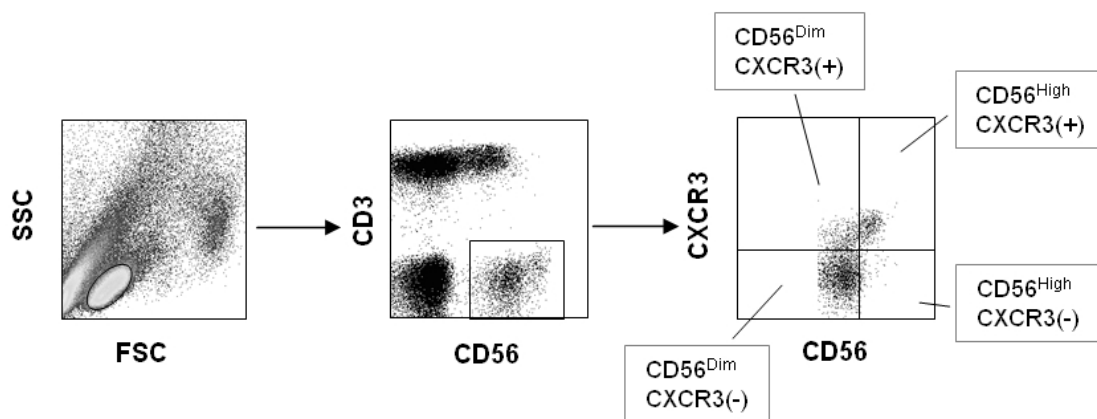
**Abb. 8: CD27-Expression korreliert mit Ausheilung der akuten HCV-Infektion.**

NK-Zellen akut HCV/HIV(+) Probanden (n=12 aa, akut->ausgeheilt, n=18 ac, akut->chronisch) wurden hinsichtlich der Expression von CD27 untersucht (A). Korrelation der CD27-Expression auf Gesamt- bzw. CD56<sup>High</sup> NK-Zellen mit der Produktion von IFN- $\gamma$  (n=27) (B) und anti-HCV-Aktivität (n=25) (C). \*\*p < 0.01

## 2 Funktionelle und phänotypische Charakterisierung von NK-Zellen anhand der CXCR3-Expression

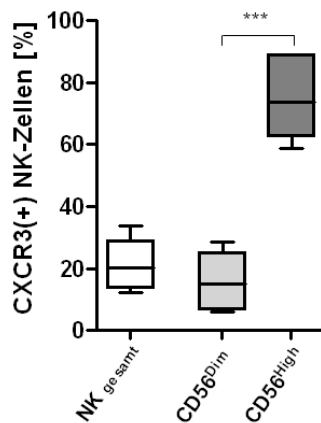
### 2.1 Expression von CXCR3 auf peripheren NK-Zellen

Zur Untersuchung des Expressionsmusters von CXCR3 auf peripheren NK-Zellen wurden Vollblutfärbungen durchgeführt. Als Resultat der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass sowohl CD56<sup>Dim</sup>, als auch CD56<sup>High</sup> NK-Zellen in CXCR3(+) und CXCR3(-) Subpopulationen unterschieden werden können (Abb. 9). In der CD56<sup>High</sup> Population war hierbei die Frequenz von NK-Zellen, die CXCR3 exprimieren, deutlich höher als bei CD56<sup>Dim</sup> NK Zellen [75.1% ± 5.2 vs 15.7% ± 3.5; p 0.001] (Abb. 10).



**Abb. 9: Gating-Strategie zur Analyse der CXCR3-Expression.** PBMC im Vollblut wurden mit Antikörpern gegen CD56, CD3 und CXCR3 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Dotplots zeigen repräsentativ die Gating-Strategie. Lymphozyten wurden über den Forward und Side Scatter gated und NK-Zellen als CD56(+)CD3(-) Lymphozyten definiert.

## Ergebnisse



**Abb. 10: CXCR3-Expression auf peripheren NK-Zellen.** Vollblut gesunder Spender (n=6) wurde bezüglich der Expression von CXCR3 durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Frequenz CXCR3-positiver Zellen in der NK-Zellgesamtpopulation sowie den CD56(+)-Subpopulationen.

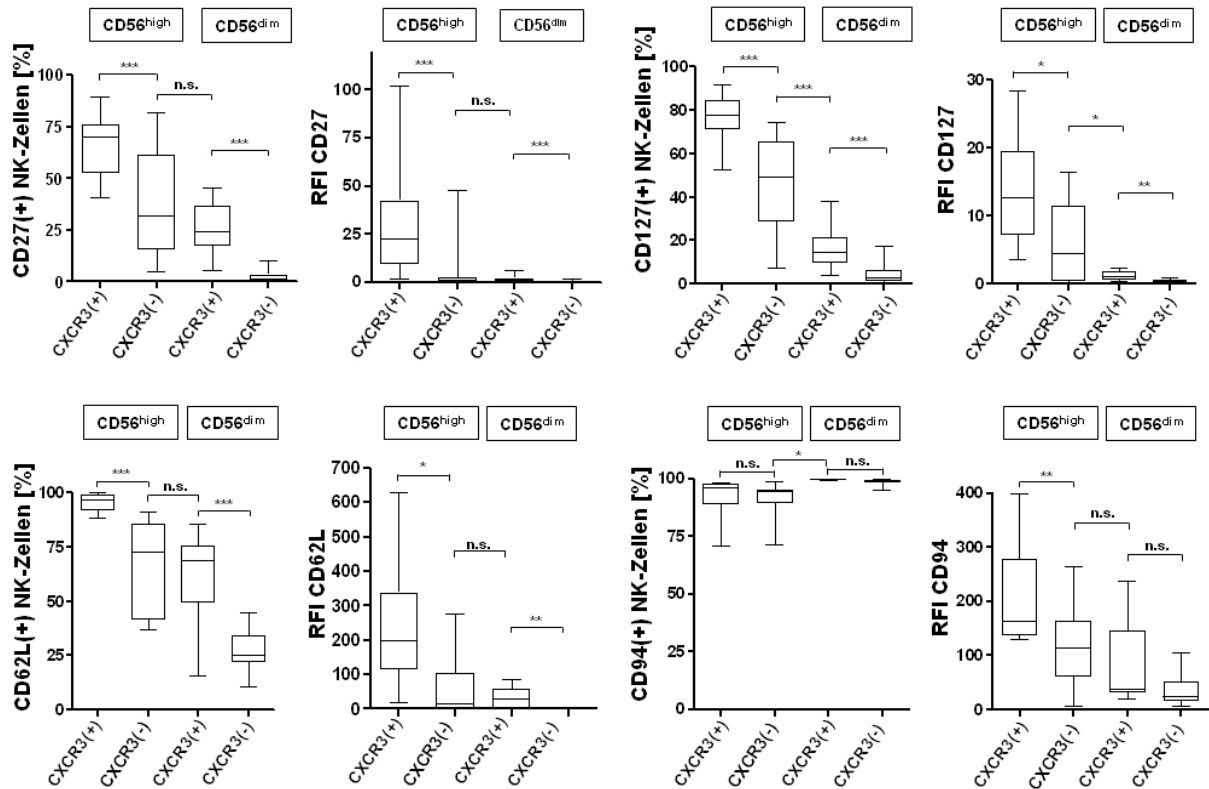
\*\*\* p 0.001

## 2.2 Phänotypische Charakterisierung CXCR3(+) NK-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung CXCR3(+) NK-Zellen wurden die vier oben definierten NK-Zell-Subtypen hinsichtlich der Ko-Expression bestimmter Reifungs- und Differenzierungsmarker durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind hier die Daten für die Reifungsmarker CD27 und CD127 (-Untereinheit des IL7-Rezeptors), das Adhäsionsmolekül CD62L (L-Selektin; „Homing“-Rezeptor) und CD94, das mit NKG2-Rezeptoren dimerisiert und den Komplex stabilisiert. Wie Abb. 11 zu entnehmen, konnten signifikante Unterschiede in der Expressionsstärke nachgewiesen werden, wobei die CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> Population die höchste Expression von CD27, CD127 und CD62L aufwies. Ferner war auffällig, dass sich die Expression von diesen Markern stufenweise von CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> über CXCR3(-)CD56<sup>High</sup> nach CXCR3(+)CD56<sup>Dim</sup> zu CXCR3(-)CD56<sup>Dim</sup> verringerte.

[CD27: 67.1% ± 3.4 vs 39.5% ± 7.1; p 0.001; vs 26.1% ± 2.6 vs 2.6% ± 0.7; p 0.001; CD127: 77.7% ± 1.7 vs 46.3% ± 4.6; p 0.001; vs 16.2% ± 1.7 vs 4.3% ± 0.8; p 0.001; CD62L: 95.6% ± 0.9 vs 66.8% ± 5.7; p 0.001; vs 62.3% ± 4.6 vs 27.2% ± 2.3; p 0.001; CD94: 99.8% ± 0.1 vs 98.7% ± 0.6; n.s.; vs 91.8% ± 3.3 vs 91.1% ± 3; n.s.]. Für CD94 ließ sich lediglich ein Unterschied zwischen CD56<sup>High</sup> und CD56<sup>Dim</sup> NK-Zellen beobachten, der unabhängig von der CXCR3-Expression war [99.2% ± 0.3 vs 91.5% ± 2.1].

## Ergebnisse



**Abb. 11: CXCR3-Expression teilt NK-Zellen in phänotypisch unterschiedliche Subpopulationen.** NK-Zellen gesunder Spender (n 8) wurden nach Antikörperfärbungen für die Durchflusszytometrie hinsichtlich gleichzeitiger Expression von CXCR3 und der gezeigten Marker ausgewertet. Angegeben ist die Anzahl % positiver Zellen bzw. die Relative Fluoreszenz Intensität. n.s. nicht signifikant, \*p 0.05, \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001

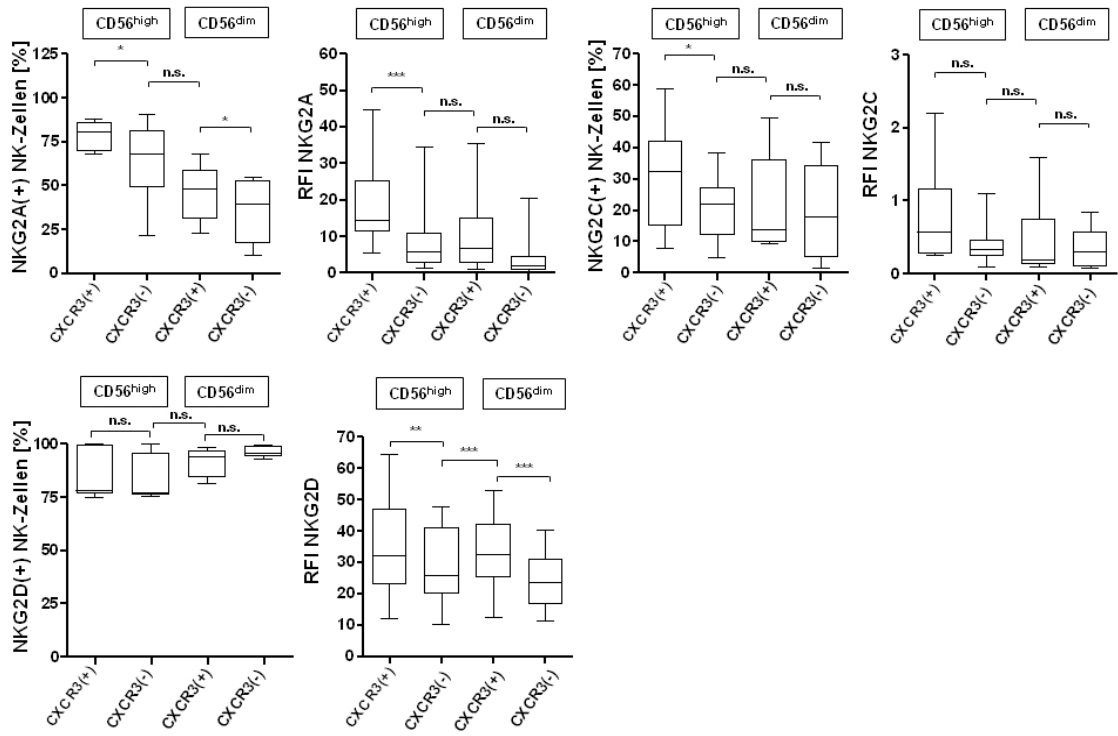
Da die Expression von NK-Zell-Rezeptoren eng mit der Entwicklung und Funktion von NK-Zellen in Zusammenhang steht, wurde im Folgenden die Expression von Rezeptoren unterschiedlicher NK-Zell-Rezeptor-Familien auf den CXCR3-Subpopulationen untersucht <sup>166,167</sup>. Bei NKG2A (Abb. 12A) und NKp44 (Abb. 12B) lag eine graduelle Verringerung der Expression zwischen den vier NK-Zell-Subtypen in Abhängigkeit der CXCR3-Expression vor [NKG2A: 78.9% ± 2.6 vs 64.5% ± 7.1; p 0.05; vs 46.7% ± 5.1 vs 36.1% ± 5.9; p 0.05; NKp44: 32.9% ± 5.7 vs 26.6% ± 4.4; p 0.05; vs 8.5% ± 1.6 vs 4.6% ± 1.4; p 0.001]. Hinsichtlich der Oberflächendichte der NKG2D-Expression (Abb. 12A) unterschieden sich CXCR3(+) NK-Zellen signifikant von CXCR3(-) NK-Zellen durch eine höhere Expression sowohl im CD56<sup>High</sup> als auch im CD56<sup>Dim</sup> Subtyp [34.8 ± 4 vs 28 ± 3; p 0.01; vs 33.9 ± 3.1 vs 24.6 ± 2.1; p 0.001]. Im Unterschied dazu war die Assoziation von CXCR3 mit den Mitgliedern der SLAM-Rezeptor-Familie NTBA, CD48 und CRACC umgekehrt: hier exprimierten CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen am wenigsten NTBA [56% ± 6.5 vs 73.9% ± 4.6;

## Ergebnisse

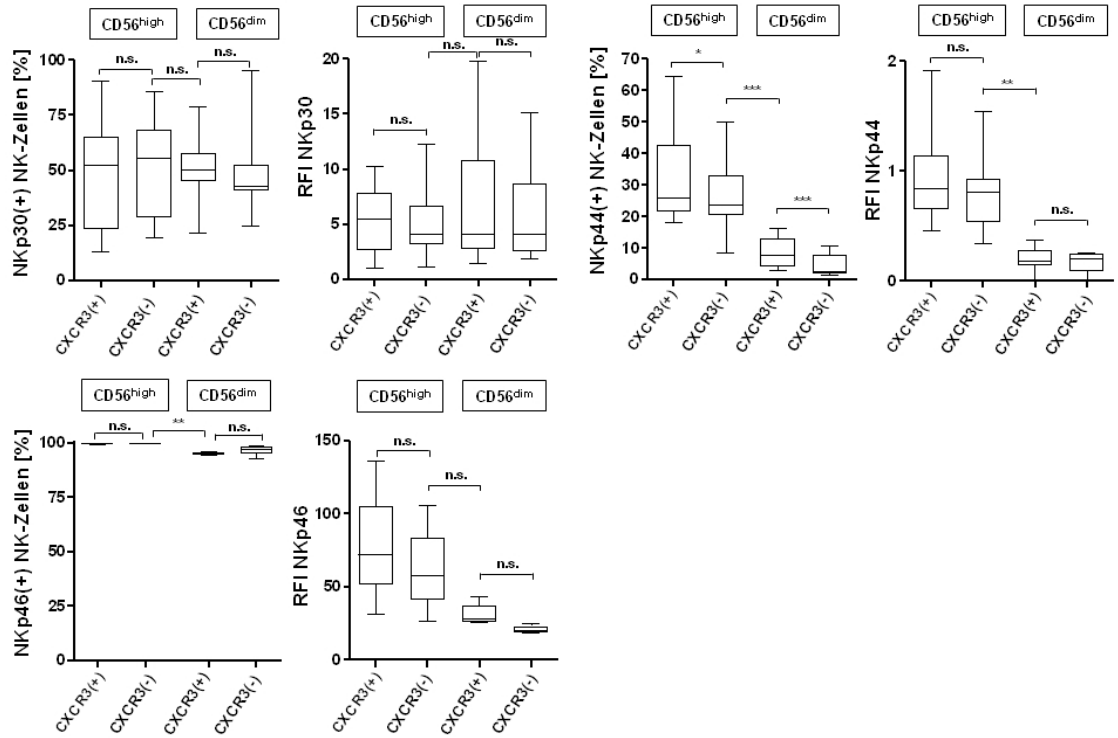
p 0.001; vs 90.2% ± 1.6 vs 95.2% ± 0.9; p 0.001], CD48 [32.4% ± 4.8 vs 58.5% ± 6.5; p 0.001; vs 70.6% ± 3.6 vs 87% ± 2.3; p 0.001] bzw. CRACC [34% ± 4.5 vs 54.4% ± 7.5; p 0.01; vs 68.3% ± 3.1 vs 79.5% ± 3.1; p 0.01], bei letzterem war die Expression unabhängig von der CD56-Subpopulation (Abb. 12C). Die Oberflächenexpression von NKG2C, NKp30, NKp46 und 2B4 wies hingegen keine signifikante Assoziation mit der Expression von CXCR3 auf (Abb. 12A-C).

# Ergebnisse

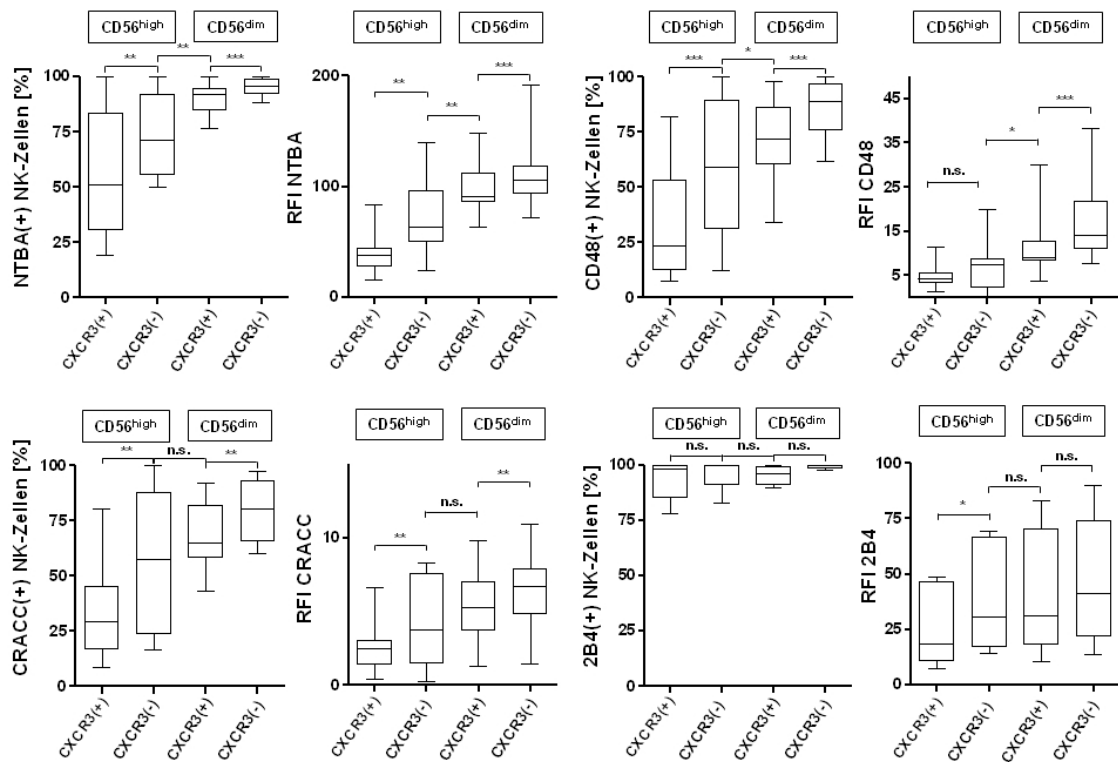
A)



B)



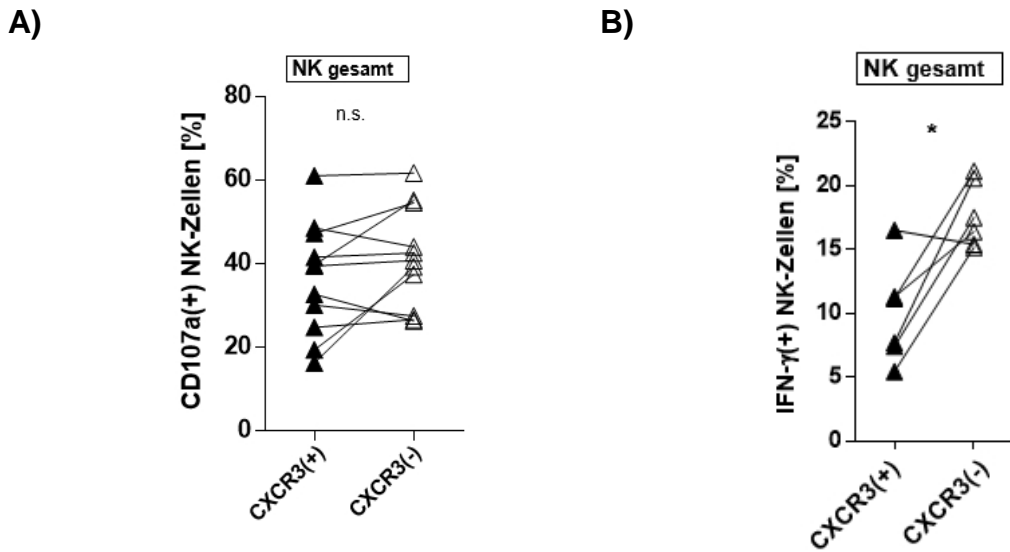
C)



**Abb. 12: NK-Zell-Rezeptor-Expression auf CXCR3(+) und CXCR3(-) NK-Zell-Subpopulationen.** Auf NK-Zellen gesunder Probanden (n 8) wurde durchflusszytometrisch die Ko-Expression von NK-Zell-Rezeptoren und CXCR3 untersucht. Angegeben ist die Anzahl % positiver Zellen bzw. die relative Fluoreszenz Intensität. n.s. nicht signifikant, \*p 0.05, \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001

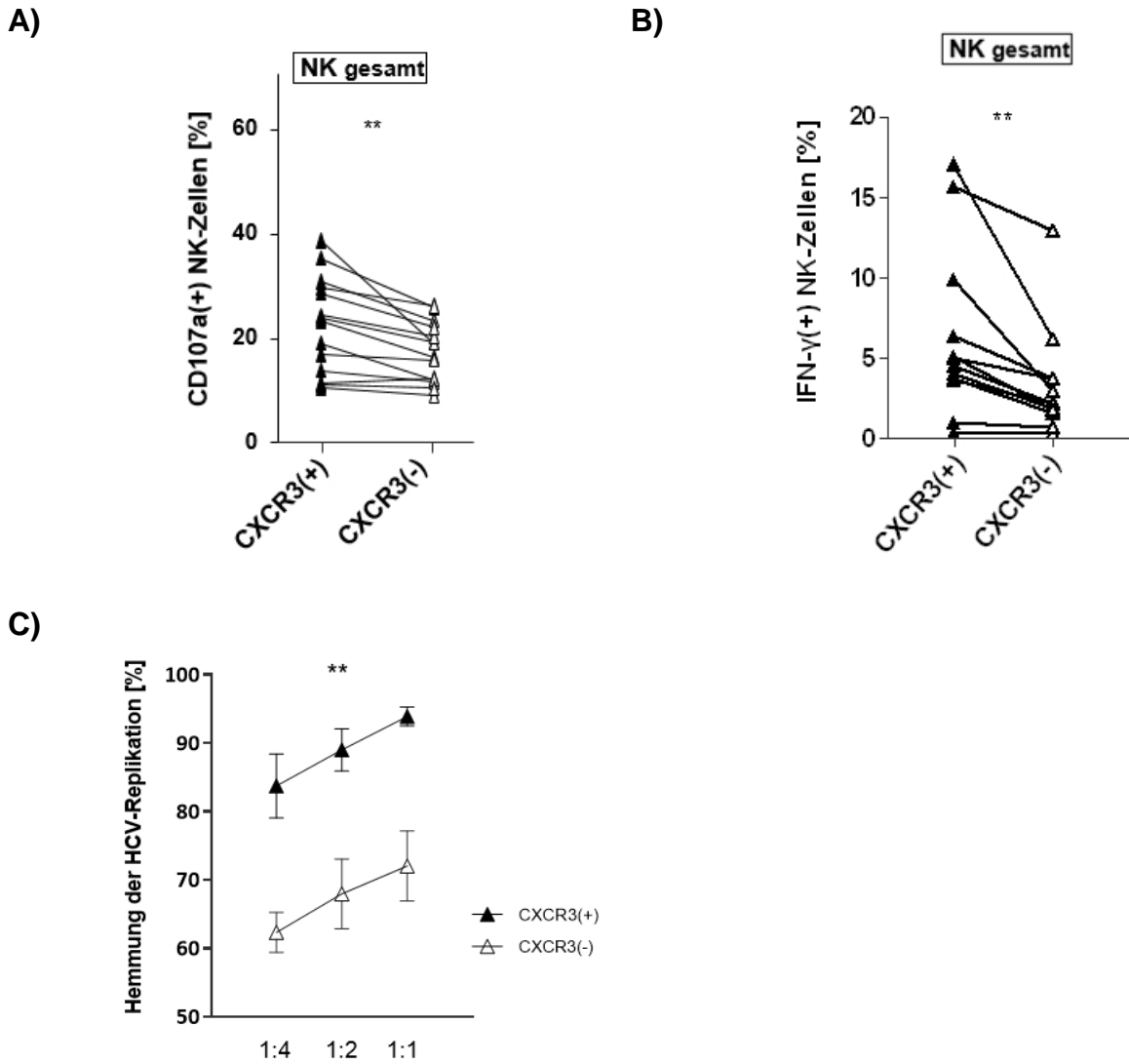
### 2.3 Funktionelle Charakterisierung CXCR3(+) NK-Zellen

Nachdem der Nachweis phänotypisch distinkter NK-Zell-Populationen durch die Expression von CXCR3 erbracht wurde, sollte geklärt werden, ob sich diese hinsichtlich ihrer Funktion unterscheiden. Isolierte NK-Zellen wurden hierfür mit der hämatopoetischen Tumorzelllinie K562 ko-inkubiert. Diese zeichnet sich durch Defizienz des MHC-Komplexes (fehlendes inhibitorisches Signal) als besonders NK-Zell-sensitiv aus und kann in Ko-Kultur mit NK-Zellen lysiert werden. Daher wurden K562 Zellen bisher standardmäßig zur Analyse von allgemeinen NK-Zell-Effektor-Funktionen von vielen Arbeitsgruppen eingesetzt. CXCR3(+) NK-Zellen unterschieden sich gegenüber K562 Zellen nur geringfügig in ihrem zytotoxischen Potential von den CXCR3(-) NK-Zellen [36.4% ± 4. vs 41.5% ± 3.6; n.s.]. Die Sekretion von IFN- durch CXCR3(+) NK-Zellen war hingegen deutlich geringer, als durch CXCR3(-) NK-Zellen [9.9% ± 1.6 vs 17.7% ± 1.1; p 0.05] (Abb. 13).



**Abb. 13: Effektor-Funktionen CXCR3(+) NK-Zellen nach Inkubation mit K562 Zellen.** Isolierte NK-Zellen gesunder Spender wurden nach Ko-Inkubation mit K562 Zellen (Verhältnis 1:1) durchflusszytometrisch hinsichtlich CXCR3-Expression und ihrer Degranulation (A, n=11) bzw. IFN- $\gamma$ -Sekretion (B, n=6) untersucht. n.s. nicht signifikant, \*p 0.05.

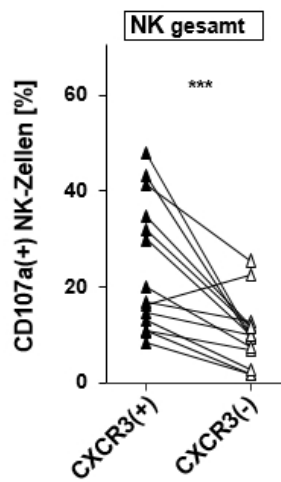
Zur Analyse der Effektor-Funktion beider NK-Subpopulationen gegenüber Leberzellen wurden Ko-Inkubationen mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen durchgeführt. Überraschenderweise ergaben sich hier Ergebnisse, die zur Kultur mit K562-Zellen genau entgegengesetzt waren. Dies trifft sowohl auf die Degranulation [21%  $\pm$  2.8 vs 15%  $\pm$  1.7; p 0.01] (Abb. 14A) als auch die Sekretion von IFN- $\gamma$  zu [6.4%  $\pm$  1.5 vs 3.4%  $\pm$  1; p 0.01] (Abb. 14B). In diesen Experimenten erwiesen sich CXCR3(+) NK-Zellen als potentere Population. Des Weiteren wurde, im Hinblick auf die HCV-Infektion in der Leber, das Potential CXCR3(+)/(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen zur Hemmung der HCV-Replikation untersucht. Wie in Abb. 14C ersichtlich, verfügten CXCR3-exprimierende NK-Zellen über ein signifikant höheres anti-virales Potential als ihr CXCR3-negatives Pendant [93.9%  $\pm$  1.4 vs 72%  $\pm$  5.1 / 89%  $\pm$  3.1 vs 67.9%  $\pm$  5.1 / 83.7%  $\pm$  4.7 vs 62.3%  $\pm$  2.9; p 0.001].



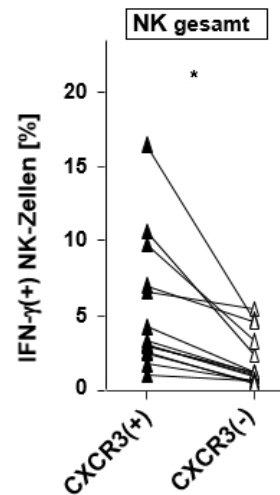
**Abb. 14: Anti-virale Aktivität CXCR3(+) NK-Zellen nach Ko-Inkubation mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen.** Isolierte NK-Zellen gesunder Spender wurden nach Ko-Inkubation mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen (1:1) durchflusszytometrisch hinsichtlich CXCR3-Expression und ihrer zytotoxischen Aktivität untersucht. (A) Analyse der NK-Zell-Degranulation, n=14; (B) Sekretion von IFN- $\gamma$ , n=12; (C) *In vitro*-Hemmung der HCV-Replikation durch gesortete CD56<sup>High</sup> NK-Zellen (n=5) nach Ko-Inkubation mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen. \*\*p 0.01

Als weitere Zielzellen wurden aktivierte primäre hepatische Sternzellen in der Ko-Kultur mit NK-Zellen untersucht. Durch diese Experimente konnte speziell die anti-fibrotische Aktivität beider NK-Zell-Subpopulationen verglichen werden. Erneut ließ sich durch CXCR3(+) NK-Zellen eine signifikant stärkere Degranulation [ $23.6\% \pm 3.5$  vs  $10\% \pm 1.8$ ;  $p < 0.001$ ] nachweisen als durch die CXCR3-negative Population (Abb. 15A). Dabei bestand eine Abhängigkeit von der eingesetzten Effektor:Target Ratio (Abb. 15C). CXCR3(+) NK-Zellen stellten sich auch nach Ko-Inkubation mit HSC wesentlich effektiver in der Sekretion von IFN- $\gamma$  heraus als CXCR3(-) NK-Zellen [ $5.4\% \pm 1.2$  vs  $2\% \pm 0.5$ ;  $p < 0.05$ ].

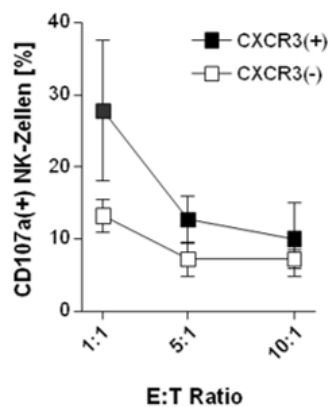
A)



B)



C)

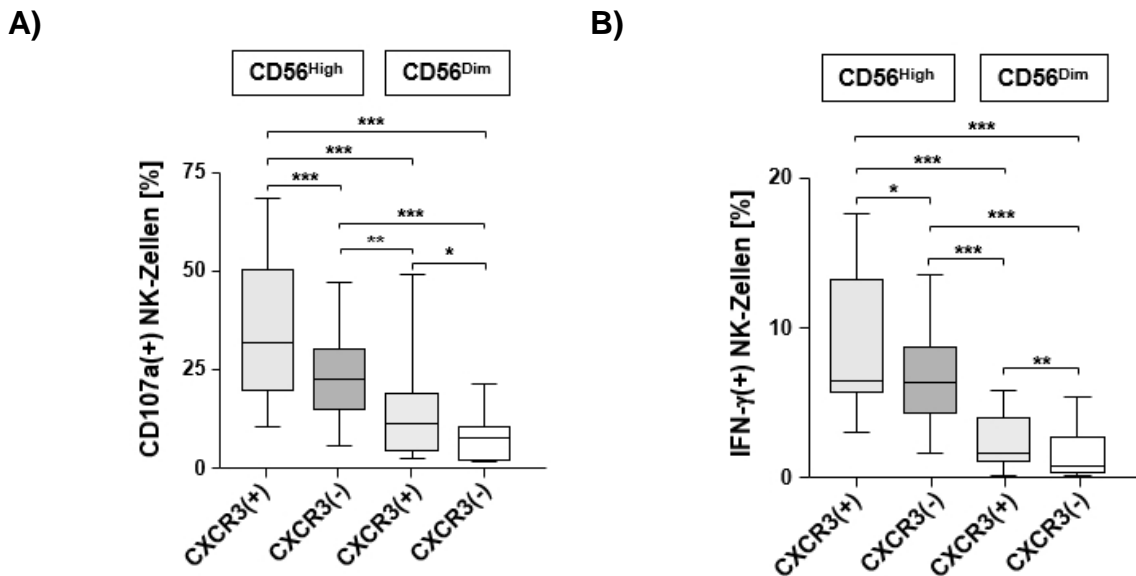


**Abb. 15: Anti-fibrotische Aktivität CXCR3(+) NK-Zellen nach Ko-Inkubation mit HSC.** Isolierte NK-Zellen gesunder Spender (n=14) wurden nach Ko-Inkubation (Verhältnis 1:1) mit HSC durchflusszytometrisch hinsichtlich CXCR3-Expression und ihrer zytotoxischen Aktivität untersucht.

## Ergebnisse

Analyse der (A) NK-Zell-Degranulation und (B) IFN- $\gamma$ -Produktion. (C) Vergleich der NK-Zell-Degranulation nach Ko-Inkubation mit HSC in unterschiedlichen Effektor zu Target (E:T) Verhältnissen (n=5). \*p 0.05, \*\*\*p 0.001

Interessanterweise bestätigte sich nach Kultivierung mit HSC die gleiche Korrelation zwischen der CXCR3-Expression und der NK-Zell-Aktivität auch bei Analyse der vier NK-Zell-Subtypen (Abb. 16A): es lag eine graduelle Verminderung der Degranulation zwischen den vier Subtypen von CXCR3(+) $CD56^{High}$  [34.7%  $\pm$  4.4] über CXCR3(-) $CD56^{High}$  [22.7%  $\pm$  2.7; p 0.001] nach CXCR3(+) $CD56^{Dim}$  [13.9%  $\pm$  2.8] zu CXCR3(-) $CD56^{Dim}$  [7.3%  $\pm$  5.6; p 0.05] vor. Analog verhielt es sich mit der Sekretion von IFN- $\gamma$  [8.7%  $\pm$  1.5 vs 6.6%  $\pm$  1; p 0.05 vs 2.3%  $\pm$  0.5 vs 1.5%  $\pm$  0.5; p 0.01] (Abb. 16B). Die stärkste anti-fibrotische Aktivität ging demnach von CXCR3(+) $CD56^{High}$  NK-Zellen aus. Da CXCR3/CXCR3-Liganden eine Rolle bei der HCV-assoziierten Leberfibrose zu spielen scheinen, lag der Fokus bei den weiteren Untersuchungen auf diesen Zielzellen <sup>146,147</sup>. Da die höchste Expression von CXCR3 auf  $CD56^{High}$  NK-Zellen zu verzeichnen war (siehe Abb. 10) und diese Subpopulation in der Leber vermehrt vorliegt, wurde sich bei den anschließenden Experimenten auf  $CD56^{High}$  NK-Zellen konzentriert <sup>168</sup>.



**Abb. 16: Anti-fibrotisches Potential von CXCR3(+) NK-Zellen.** Isolierte NK-Zellen (n=14) wurden nach Ko-Inkubation mit HSC (1:1) durchflusszytometrisch bezüglich CXCR3-Expression und Degranulation (A) bzw. Sekretion von IFN- $\gamma$  (B) analysiert. \*p 0.05, \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001

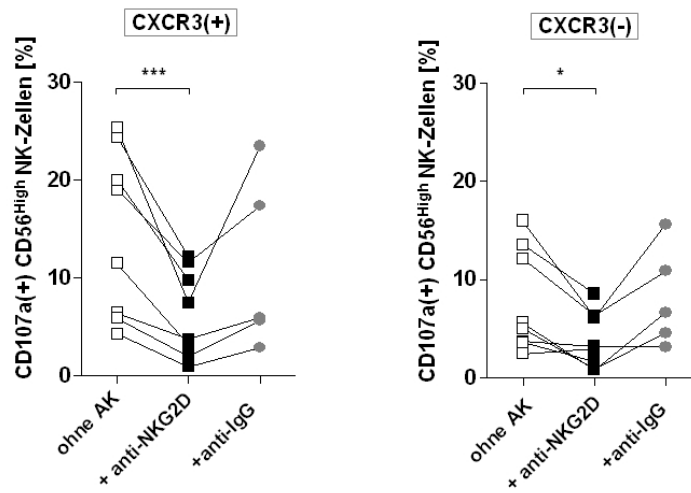
## 2.4 Rolle von NKG2D für die NK-Zell-Aktivität CXCR3(+) NK-Zellen

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der NKG2D-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der NK-Zell-vermittelten Eliminierung hepatischer Sternzellen spielt <sup>120</sup>. Wie von unserer Gruppe gezeigt, exprimieren auch humane hepatische Sternzellen die NKG2D-Liganden ULBP-2 und MICA/B auf ihrer Oberfläche <sup>126</sup>. Die in Absatz 2.2 untersuchte Oberflächenexpression von NKG2D auf CXCR3-exprimierenden und CXCR3-negativen Subpopulationen zeigte hinsichtlich der Frequenz NKG2D-positiver Zellen keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings divergierten die Ergebnisse deutlich bezüglich der Expressionsdichte des Rezeptors: auf CXCR3(+) NK-Zellen war die NKG2D-Rezeptordichte signifikant höher als auf NK-Zellen ohne CXCR3-Expression (Abb. 12 A).

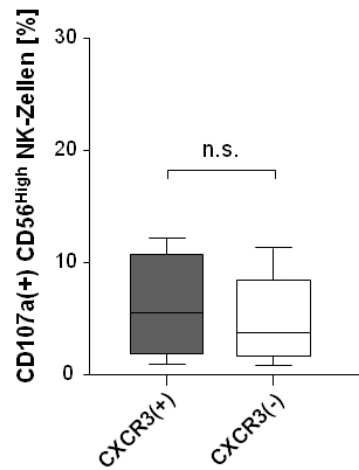
Um eine mögliche funktionelle Bedeutung von NKG2D hinsichtlich des Abtötens hepatischer Sternzellen durch humane NK-Zellen zu analysieren, wurde in Blockierungsexperimenten die Aktivierung der NK-Zellen über diesen Rezeptor-Signalweg durch Zugabe eines neutralisierenden anti-NKG2D Antikörpers während der Ko-Inkubation unterbunden. Daraus resultierte eine deutlich verminderte Degranulation sowohl durch CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> [14.6% ± 3 vs 6.4% ± 1.6; p 0.001] als auch durch CXCR3(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen [7.8% ± 1.9 vs 3.8% ± 1; p 0.05] (Abb. 17A). Darüber hinaus führte die Blockierung von NKG2D zur Aufhebung der ursprünglich beobachteten (Vgl. Abb. 16A) signifikant unterschiedlichen Zytotoxizität zwischen CXCR3-positiven und CXCR3-negativen CD56<sup>High</sup> NK-Zellen [6.4% ± 1.6 vs 3.8% ± 1; n.s.] (Abb. 17B).

## Ergebnisse

A)



B)



**Abb. 17: Einfluss von NKG2D auf die anti-fibrotische Aktivität CXCR3(+) NK-Zellen.** Isolierte NK-Zellen (n=8) wurden mit bzw. ohne Zugabe eines neutralisierenden anti-NKG2D-Antikörpers im Verhältnis 1:1 mit HSC ko-inkubiert. Die NK-Zell-Populationen wurden im Anschluss hinsichtlich der Expression von CXCR3 und CD107a aufgeschlüsselt. Als Kontrolle für die Blockierung diente ein IgG-spezifischer Antikörper (A). Zytotoxischer Vergleich von CXCR3(+) und CXCR3(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen (n=8) nach NKG2D-Blockade (B). n.s. nicht signifikant, \*p 0.05, \*\*\*p 0.001

## 2.5 Einfluss des CXCR3 Liganden CXCL10 auf die Fibrose-Entwicklung in hepatischen Sternzellen

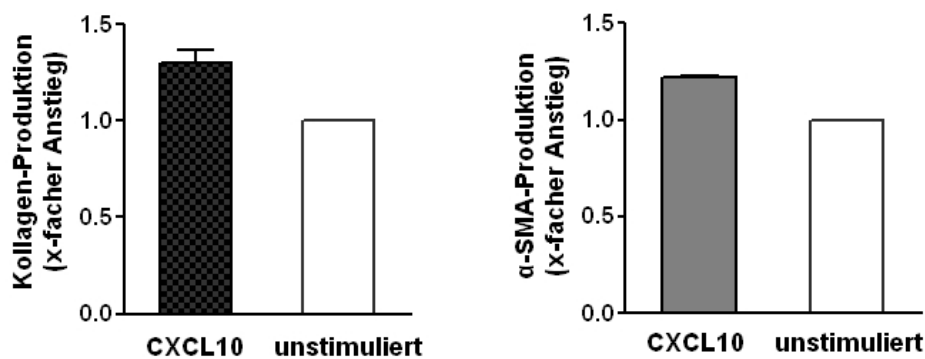
Im Lebergewebe HCV-infizierter Patienten konnten vermehrt Transkripte der CXCR3-Liganden (speziell CXCL10) nachgewiesen werden <sup>146</sup>. Ob eine starke Expression von CXCL10 Auswirkungen auf hepatische Sternzellen hat und möglicherweise sogar zu deren Aktivierung führen kann, sollte auf mRNA-Ebene überprüft werden.

Dazu wurden HSC mit CXCL10 (400pg/ml) stimuliert und anschließend die Produktion der pro-fibrotischen Proteine Col1A1 (Kollagen Typ1 alpha1) und  $\alpha$ -SMA (*smooth muscle actin*) auf mRNA-Ebene analysiert. Im Vergleich zu Kontrollen, in denen unstimulierte HSC zum Einsatz kamen, ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Induktion dieser Proteine nachweisen (Abb. 18A).

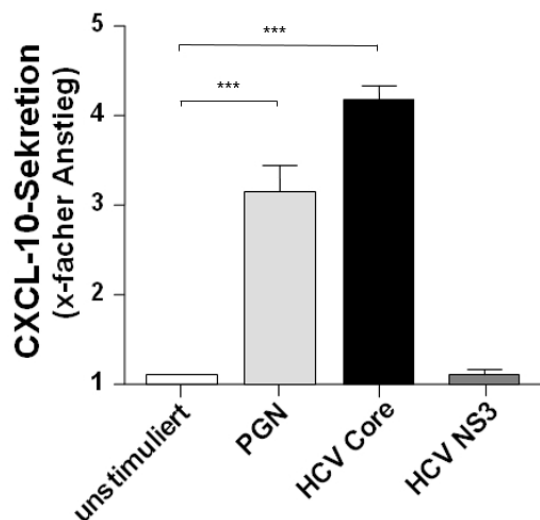
Es bestand weiterhin die Möglichkeit, dass CXCL10 einen indirekten Effekt ausübt, indem es durch seine chemotaktische Wirkung zur Rekrutierung weiterer CXCL10-sensitiver immunkompetenter Zellen führt und ferner, dass HSC unter Virus-Einfluss selbst zur CXCL10-Sekretion veranlasst werden könnten. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde getestet, ob HCV-Proteine grundsätzlich fähig sind, die Sekretion von CXCL10 zu induzieren. Dazu wurden Stimulationsexperimente modellhaft an isolierten Monozyten durchgeführt, da diese konstitutiv TLR2 exprimieren und durch Bindung der HCV-Proteine NS3 und Core eine Entzündungsantwort ausgelöst wird. Monozyten wurden mit dem TLR2-Liganden Peptidoglykan (PGN) als Positiv-Kontrolle und den HCV-Proteinen Core und NS3 über 24h stimuliert und anschließend die Zellüberstände mittels ELISA auf die Sekretion von CXCL10 analysiert. Verglichen mit Ansätzen, denen kein Stimulus zugegeben worden war, induzierte das HCV Core-Protein eine vierfach höhere Sekretion von CXCL10 in den Monozyten [ $4.2 \pm 0.2$  vs 1; p 0.001]. Durch PGN-Stimulation erfolgte eine etwa 3-fach höhere CXCL10-Produktion im Vergleich zur Kontrolle [ $3.3 \pm 0.2$  vs 1; p 0.001], wohingegen NS3 keinen Effekt bewirkte. (Abb. 18B). Ob HCV-induziertes CXCL10 chemotaktisch wirksam ist, wurde in Migrations-Assays, basierend auf dem Zwei-Kammer-Prinzip von Boyden, getestet <sup>164</sup>. NK-Zellen gesunder Probanden wurden, getrennt durch eine Membran die sie passieren müssen, von chemokinhaltigem Medium separiert. Als Stimuli dienten der CCR5-Ligand CCL5 (als nicht CXCR3-spezifisches Chemokin), hrCXCL10 (100 bzw. 600ng/ml) und Überstände aus der vorausgegangenen

Monozyten-Stimulation. Die stärkste NK-Zell-Migration wurde von rekombinantem CXCL10 [ $1.6 \pm 0.2 / 1.4 \pm 0.1$ ;  $p < 0.05$  vs PBS] bzw. von in den Überstand sezerniertem CXCL10 ausgelöst. Als Vergleich dienten Experimente mit rhIL-12 (Positiv-Kontrolle) [1.1], CCL5 [ $1.1 \pm 0.1$ ] und die Negativ-Kontrolle ohne Chemokin-Gradienten (PBS) [1] (Abb. 18C). Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des MFI von CXCR3 auf den migrierten NK-Zellen. Hierbei zeigte sich, dass präferenziell CXCR3(+) NK-Zellen durch CXCL10 (Abb. 18D) bzw. Überstand HCV Core-stimulierter Monozyten (nicht gezeigt) durch die Membran der Migrationsplatte wanderten [CXCL10 100/600ng:  $7.8 \pm 0.2 / 8.4 \pm 0.8$ ; PBS:  $7.1 \pm 0.4$ ; IL-12:  $7.1 \pm 0.1$ ; CCL5:  $7.3 \pm 0.2$ ].

A)

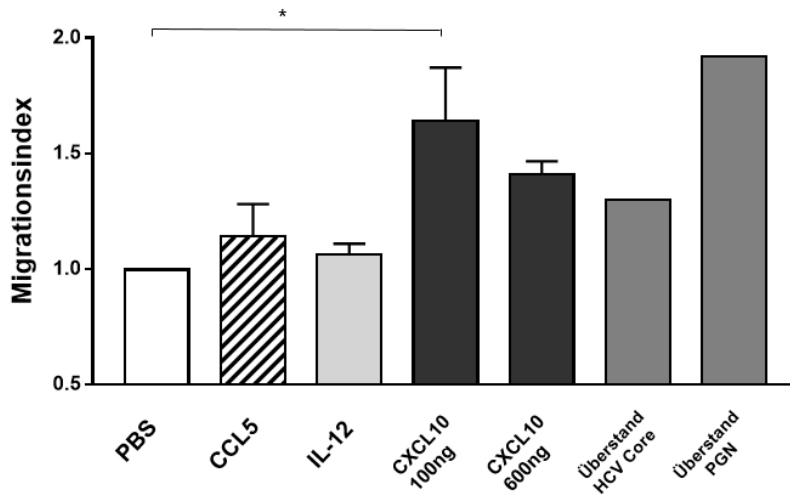


B)

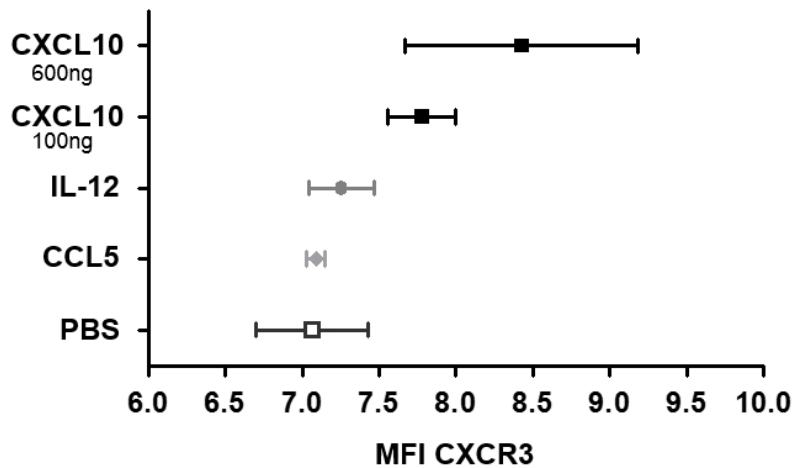


## Ergebnisse

C)



D)

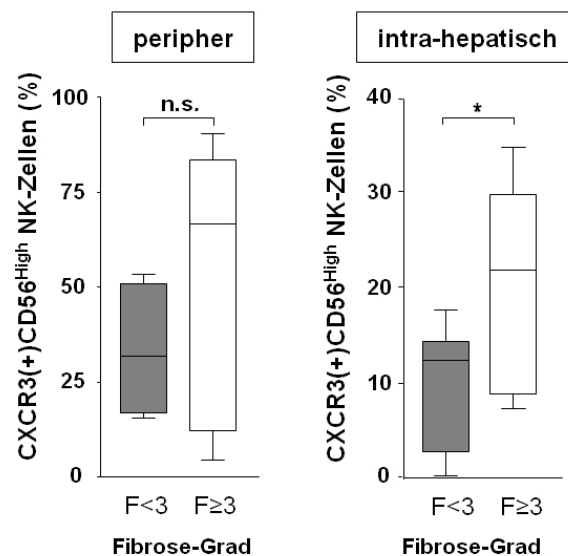


**Abb. 18: HCV Core-induzierte CXCL10-Sekretion führt zu präferentieller Rekrutierung CXCR3(+) NK-Zellen.** (A) Analyse der mRNA Level von Kollagen und  $\alpha$ -SMA nach quantitativer rtPCR von CXCL10-stimulierten bzw unstimulierten HSC (n=2), normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin. (B) Monozyten gesunder Spender (n=6) wurden für 24h mit PGN (1 $\mu$ g/ml), HCV Core (3 $\mu$ g/ml) und HCV NS3-Protein (5 $\mu$ g/ml) stimuliert und die Überstände mittels ELISA auf Anwesenheit von CXCL10 getestet. (C) Migration von NK-Zellen gesunder Probanden (n=3/1) gegen Medium mit CCL5 (100ng/ml), IL-12 (50ng/ml), CXCL10 (100, 600ng/ml), sowie Überständen aus (B) und ohne Chemokin (PBS). (D) Durchflusszytometrische Bestimmung des CXCR3-MFI auf NK-Zellen 60min nach erfolgter Migration. n.s. nicht signifikant, \*p 0.05, \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001

## 2.6 CXCR3(+) NK-Zellen bei der HCV-Infektion

### 2.6.1 Intra-hepatische Akkumulation CXCR3(+) NK-Zellen

Angesichts des starken anti-fibrotischen Potentials der CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zell-Population wurde eine Assoziation zwischen den fortgeschrittenen Stadien einer HCV-assoziierten Leberfibrose und einer geringeren Frequenz dieser Zellen im Lebergewebe vermutet. Intra-hepatische NK-Zellen aus Leberbiopsien HCV-positiver Patienten wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von CXCR3 in der CD56<sup>High</sup> Population untersucht. Dabei wurden die Leberbiopsien nach dem Metavir Fibrose-Score in 2 Klassen unterteilt: F<sub>0</sub> - F<sub>2</sub> und F<sub>3</sub>, 4. Es fand sich ein deutlicher Unterschied zwischen Patienten mit keiner oder milder Fibrose und den Patienten mit deutlich fortgeschrittener Fibrose. Überraschenderweise ließen sich signifikant mehr intra-hepatische CXCR3(+) NK-Zellen bei Patienten mit F<sub>3</sub>/F<sub>4</sub>-Fibrose nachweisen [20.4% ± 4.2 vs 10% ± 2.1; p 0.05] (Abb. 19).



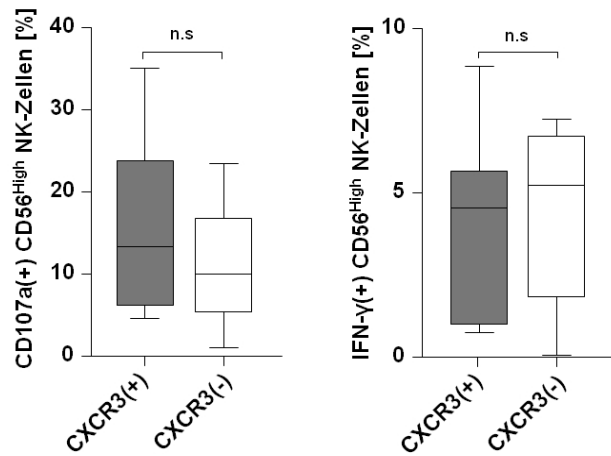
**Abb. 19: Intra-hepatische Akkumulation CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen bei fortgeschrittener Fibrose.** Periphere (Vollblut) und intra-hepatische (Leberbiopsie) CD56<sup>High</sup> NK-Zellen HCV-positiver Patienten wurden bezüglich der Expression von CXCR3 durchflusszytometrisch untersucht und mit dem Grad der Leberfibrose korreliert (milde n=9/ fortgeschrittene Fibrose n=6). Die Aufteilung beider Gruppen erfolgte anhand des Metavir Fibrose-Scores (F<sub>0</sub>-F<sub>2</sub> versus F<sub>3/4</sub>) n.s. nicht signifikant, \*p 0.05

### **2.6.2 Anti-fibrotische Aktivität CXCR3(+) NK-Zellen bei der HCV-Infektion**

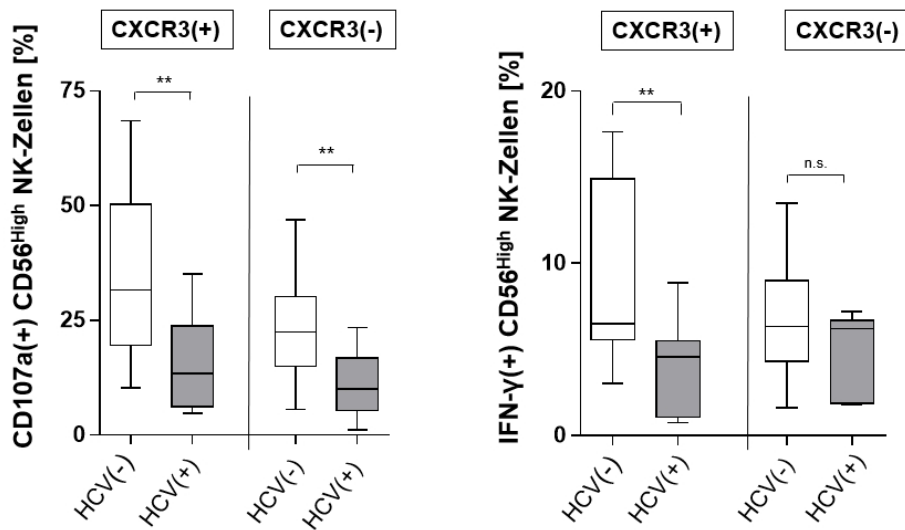
Zur Klärung der unerwarteten Anreicherung CXCR3-positiver NK-Zellen im Lebergewebe wurde die Aktivität von NK-Zellen HCV-infizierter Spender in Ko-Inkubations-Experimenten mit HSC näher betrachtet. Anders als bei NK-Zellen Gesunder (Vgl. Absatz 2.3) ließen sich hier keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich HSC-induzierter Degranulation und IFN- $\gamma$ -Sekretion zwischen den CXCR3(+) und CXCR3(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zell-Populationen nachweisen (Abb. 20A). Auffällig war, dass CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen von Patienten signifikant weniger degranulierten als diejenigen von Gesunden [15.3%  $\pm$  3 vs 34.7%  $\pm$  4.4; p 0.01]. Zudem war die Sekretion von IFN- $\gamma$  im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert [3.9%  $\pm$  0.8 vs 8.7%  $\pm$  1.5; p 0.01] (Abb. 20B). Die gestörte zytotoxische Aktivität trat auch bei CXCR3(-)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen auf, allerdings war die signifikant verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion ein spezifischer Befund für den CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> Subtyp.

## Ergebnisse

A)



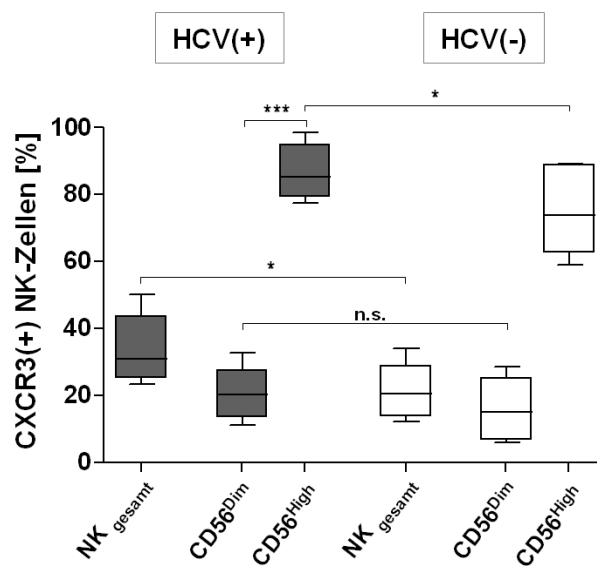
B)



**Abb. 20: Gestörte anti-fibrotische Aktivität von CXCR3(+) CD56<sup>High</sup> NK-Zellen bei der HCV-Infektion.** Degranulation und IFN- $\gamma$ -Sekretion durch CD56<sup>High</sup> NK-Zellen (n=11) von HCV(+) Probanden nach Ko-Inkubation mit HSC (1:1; A). Vergleich der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität zwischen HCV(-) (n=14) und HCV(+) Spendern (n=11) nach Ko-Inkubation mit HSC (B). n.s. nicht signifikant, \*p 0.05, \*\*\*p 0.001

### 2.6.3 Phänotypische Analyse peripherer NK-Zellen

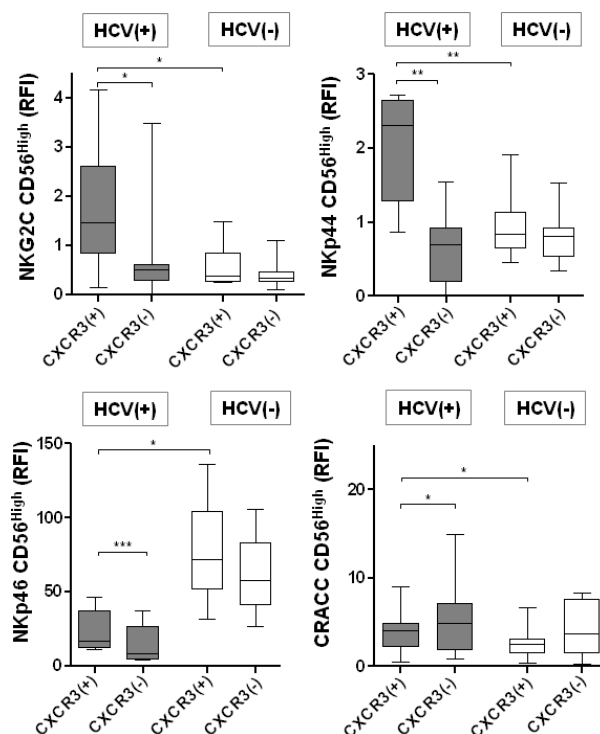
Übereinstimmend mit dem Expressionsmuster auf peripheren NK-Zellen gesunder Spender war die Frequenz CXCR3(+) NK-Zellen bei Patienten in der CD56<sup>High</sup> Population signifikant höher als in der CD56<sup>Dim</sup> Population. Bei Vergleich der Häufigkeit CXCR3-exprimierender NK-Zellen zwischen beiden Gruppen offenbarte sich allerdings ein signifikanter Unterschied. Die HCV-Infektion war mit einer signifikant erhöhten Frequenz CXCR3(+) NK-Zellen assoziiert, die sich maßgeblich auf die CD56<sup>High</sup> Population zurückführen ließ [87.2% ± 2.8 vs 75.1% ± 5.2; p 0.05] (Abb. 21).



**Abb. 21: Frequenz CXCR3(+) NK-Zellen bei HCV(+) und HCV(-) Probanden.** Periphere NK-Zellen von HCV(+) (n=10) und HCV(-) Spendern (n=6) wurden durchflusszytometrisch bezüglich der Expression von CXCR3 untersucht. . n.s. nicht signifikant, \*p 0.05, \*\*\*p 0.001

Da CXCR3(+) NK-Zellen aus Patienten mit HCV-Infektion offensichtlich funktionell gestört sind, wurde der Phänotyp von NK-Zellen bei HCV(+) Patienten mit dem gesunder Probanden (s. Absatz 2.2) verglichen, um dadurch einen Hinweis auf die Ursache der unterschiedlichen NK-Zell-Funktionalität zu erhalten.

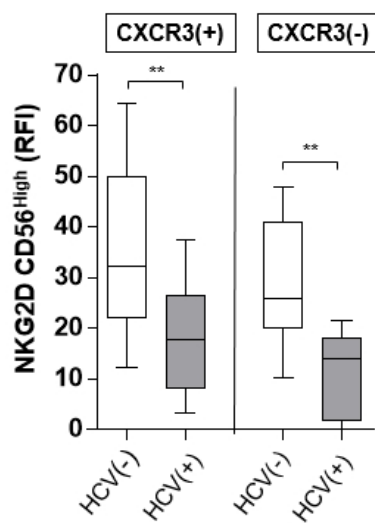
CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen von Erkrankten unterschieden sich nicht erheblich hinsichtlich der Expression von Differenzierungs-/Adhäsionsmarkern von denen Gesunder (Daten nicht gezeigt). Unterschiede ließen sich allerdings im Vergleich der Expression von NK-Zell-Rezeptoren nachweisen. Bei HCV(+) Probanden fand sich eine höhere Dichte des hemmenden NKG2C Rezeptors auf der Oberfläche der CXCR3(+) NK-Zellen [RFI  $1.9 \pm 0.4$  vs  $0.6 \pm 0.2$ ; p 0.05], sowie eine signifikant verringerte Expression des aktivierenden NKp46 Rezeptors [RFI  $22 \pm 5.4$  vs  $78 \pm 21.5$ ; p 0.05]. Allerdings wiesen CXCR3(+) NK-Zellen von Spendern mit chronischer Hepatitis C-Infektion eine höhere Expression von NKp44 [RFI  $2 \pm 0.2$  vs  $1 \pm 0.2$ ; p 0.01] und CRACC [RFI  $3.9 \pm 0.4$  vs  $2.5 \pm 0.3$ ; p 0.05] auf (Abb. 22).



**Abb. 22: Veränderte Rezeptor-Expression auf NK-Zellen HCV(+) Patienten.** Vergleich der mit CXCR3 ko-exprimierten Rezeptoren (RFI) auf peripheren NK-Zellen HCV(+) und HCV(-) Probanden (n = 8) nach durchflusszytometrischer Untersuchung. \*p 0.05, \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001

## Ergebnisse

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, hat der NKG2D-Rezeptor großen Einfluss auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen. Somit schien es naheliegend, dass Veränderungen bezüglich dieses Rezeptors auch für eine veränderte Aktivität von CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen bei der HCV-Infektion bedeutsam sind. Nach Analyse der Expression von NKG2D auf peripheren NK-Zellen aus HCV-infizierten Spendern ließ sich im Vergleich mit NK-Zellen Gesunder eine signifikant verringerte Expression beobachten [RFI  $17.9 \pm 3.4$  vs  $34.8 \pm 4$ ; p 0.01] (Abb. 23). Die verminderte NKG2D-Expression ließ sich auch bei CXCR3(-)CD56<sup>High</sup> Zellen nachweisen [RFI  $11 \pm 2.7$  vs  $28 \pm 3$ ; p 0.01].



**Abb. 23: Verminderte Expression von NKG2D auf NK-Zellen HCV(+) Patienten.** Periphere NK-Zellen Gesunder (n=4), sowie von Patienten (n=7) wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression des NKG2D Rezeptors untersucht. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität. \*\*p 0.01

## V. Diskussion

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus führt in der Mehrheit der Fälle zu einer chronischen Erkrankung, die im weiteren Verlauf häufig mit einer progredienten Leberzellschädigung und der Ausbildung einer Leberfibrose assoziiert ist. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nur teilweise verstanden.

Eine zunehmende Anzahl von Arbeiten deutet jedoch darauf hin, dass NK-Zellen in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zukommt, da diese Lymphozyten-Population sowohl anti-virale Eigenschaften besitzt als auch anti-fibrotisch wirken kann.

Hierbei ist zu erwähnen, dass NK-Zellen eine heterogene Population darstellen, die aus phänotypisch und funktionell unterschiedlichen Subpopulationen besteht. Allerdings sind diese Subpopulationen momentan nur unzureichend charakterisiert. Zudem ist die Bedeutung der einzelnen NK-Zell-Subtypen im Kontext der HCV-Infektion noch völlig unklar. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Zellpopulationen, die anhand der Oberflächenexpression von CD27 bzw. CXCR3 definiert wurden, hinsichtlich ihrer Rolle für den Verlauf der Hepatitis C Virus-Infektion untersucht. Hierbei standen die anti-virale und anti-fibrotische Aktivität dieser Zell-Populationen im Vordergrund.

## 1 Definition von NK-Zell-Subpopulationen anhand der CD27-Expression

Die Funktion von NK-Zellen wird durch eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Daneben scheinen ko-stimulatorische Moleküle deren Funktion direkt oder indirekt zu modulieren. Experimentelle Daten lassen vermuten, dass die Interaktion von CD27, ein Mitglied der TNFR-Familie, mit seinem Rezeptor CD70 die Aktivität von NK-Zellen moduliert<sup>68,69</sup>. Daneben existieren Hinweise, dass die Stimulation von NK-Zellen über CD27 in die Immunantwort von NK-Zellen involviert ist<sup>70</sup>. Da NK-Zellen die erste Barriere des angeborenen Immunsystems zur Abwehr von Viren darstellen, erscheint CD27 besonders im Kontext der HCV-Infektion interessant.

Bei Analyse des Expressionsmusters von CD27 auf peripheren NK-Zellen ergab sich eine vorwiegende Expression auf CD56<sup>High</sup> NK-Zellen. Die Unterscheidung distinkter NK-Zellen anhand der CD27-Expression deckt sich mit früheren Berichten in Mensch und Maus, in denen CD27-exprimierende Zellen hauptsächlich im CD56<sup>High</sup> NK-Zell-Subtyp nachgewiesen werden konnten<sup>71,72,88</sup>.

Die Funktionalität von CD27-positiven bzw.-negativen NK-Zellen wurde anhand von Ko-Inkubationsexperimenten mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen untersucht. Dabei stellten sich isolierte CD27(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen als signifikant zytotoxisch aktiver im Vergleich zu CD27(-) NK-Zellen heraus. Neben einer stärkeren Degranulation war auch die IFN- $\gamma$ -Sekretion durch CD27(+) Zellen signifikant höher. Diese Ergebnisse ließen sich anhand durchflusszytometrisch gesorteter Zellen bestätigen. Andere Arbeiten, die das Potential zur Zytokinsekretion von humanen CD27(+) und CD27(-) NK-Zellen verglichen, beschrieben übereinstimmend CD27-exprimierende Zellen als die potentere Population. In diesen Experimenten sezernierten CD27(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen nach Zytokinstimulation (IL-12/15 bzw. IL-12/18) größere Mengen an IFN- $\gamma$ <sup>72</sup>. Auch nach PMA/Ionomycin-Stimulation verfügten CD27(+) NK-Zellen über eine stärkere Fähigkeit zur Produktion inflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ <sup>88</sup>. Widersprüchlich gestalten sich die Befunde hinsichtlich des Degranulationspotentials der durch CD27 definierten NK-Zell-Subpopulationen. Während Ergebnisse aus Maus-Experimenten ebenfalls CD27(+) NK-Zellen als zytotoxisch aktiver charakterisierten, definierte die Gruppe um van Lier CD27(-) NK-

Zellen als die zytolytisch wirkungsvollere Population <sup>71,72</sup>. Dabei untersuchten sie die Wirksamkeit mit einem <sup>51</sup>Chromium release assay gegen die myeloische Leukämie-Zelllinie K562 und nicht - wie in der vorliegenden Arbeit - gegen Leberzellen (primäre HSC und HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen). Die unterschiedlichen Beobachtungen könnten methodischen Ursprungs sein, wie Hinweise einer weiteren Veröffentlichung, in der humane NK-Zellen im Zusammenhang mit der Expression von CD27 untersucht wurden, vermuten lassen <sup>88</sup>. Hierbei konnte für CD27(+) NK-Zellen nach Kontakt mit K562 Zellen eine geringere zytotoxische Aktivität als für ihr CD27-negatives Pendant nachgewiesen werden. Nach Ko-Inkubation mit MICA-transfizierten P815 Zellen (NKG2D-spezifisches zytotoxisches Potential) war dieser funktionelle Unterschied zwischen beiden NK-Zell-Populationen allerdings nicht mehr vorhanden. CD27(+) NK-Zellen wiesen hierbei ähnliche zytotoxische Kapazität auf, bzw. überstiegen noch jene der CD27-negativen NK-Zellen. Möglicherweise scheint für die Bewertung der zytotoxischen Aktivität von CD27-Subpopulationen bedeutsam zu sein, mit welcher Zielzelle und über welche Signale sie aktiviert werden. Daher könnte eine unterschiedliche Stimulation der NK-Zellen über verschiedene Signalwege zu Differenzen in der NK-Zell-Aktivierbarkeit je nach untersuchten Zielzellen beitragen. Für ein insgesamt stärkeres zytotoxisches Potential der CD27(+) NK-Zellen spricht allerdings auch die höhere Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, NKp44 und NKp46, wohingegen auf CD27(-) NK-Zellen mehr CD158a/b (inhibitorische KIR) detektiert wurde <sup>72,88</sup>.

Für eine Beurteilung der NK-Zell-Funktion im Zusammenhang mit der Hepatitis C-Infektion bedeutsam sind insbesondere die mittels Luciferase-Assays generierten Daten, die zeigen, dass auch das anti-virale Potential der NK-Zell-Subpopulationen gegenüber einem HCV-Replikon deutlich differierte. CD27(+) Zellen besitzen demnach eine starke anti-virale Wirkung. Durch CD27(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen wurde eine wesentlich stärkere *in vitro*-Hemmung der HCV RNA-Replikation ausgelöst als durch Zellen ohne CD27-Expression. Dieser Hemmungs-Effekt ließ sich zwar auch in der CD27-defizienten Population nachweisen, war aber geringer ausgeprägt. Somit scheint die Expression von CD27 funktionell distinkte NK-Zell-Populationen zu reflektieren, die positiv mit der anti-viralen *in vitro*-Aktivität korreliert. IFN- stellt eines der Schlüsselzytokine der NK-Zell-Funktion dar <sup>165</sup>. *In vitro* konnte es als essentiell für

die anti-virale Aktivität von NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden <sup>90,99,169</sup>. Neben der Wichtigkeit als Komponente der angeborenen Immunantwort ist die Produktion von Zytokinen für die Induktion der sich anschließenden adaptiven Immunantwort von Bedeutung. Anhand von Blockierungsexperimenten mit neutralisierendem Antikörper gegen IFN- $\gamma$  wurde die Wichtigkeit dieses Zytokins für die anti-virale Wirkung von CD27(+) NK-Zellen belegt. Dies unterstreicht weiter eine mögliche Bedeutung von CD27(+) NK-Zellen und lässt vermuten, dass sie durch eine frühe Produktion von IFN- $\gamma$  (und möglicherweise weiterer Zytokine) zur Kontrolle von Virusinfektionen, wie beispielsweise durch Hepatitis C, beitragen.

Durch Prä-Stimulation von NK-Zellen mit einem aktivierenden CD27-Antikörper konnte die Fähigkeit zur Hemmung der viralen Replikation bei gesorteten CD27(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen noch weiter gesteigert werden. Dies weist auf eine möglicherweise direkte Rolle von CD27 für die Effektor-Funktionen der NK-Zellen hin. Die beobachtete Steigerung der NK-Zell-Aktivität durch CD27-Prä-Stimulation deckt sich mit Daten aus dem Mausmodell, bei der diese auf einen IFN- $\gamma$ -abhängigen Mechanismus zurückgeführt worden war. Die Veränderungen der IFN- $\gamma$ -Produktion hatten allerdings in diesen Versuchen keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen <sup>70</sup>.

CD27 wurde bisher auf NK-Zellen hauptsächlich als Reifungsmarker betrachtet. Dabei galten NK-Zellen, die CD27 exprimieren, als eher unreife Population <sup>89</sup>. Da das Expressionsprofil dieses Markers dem von CD56 ähnelt und auf CD56<sup>Dim</sup> NK-Zellen nur geringe Mengen von CD27 nachweisbar waren, liegt ein CD56-ähnliches Reifungsprofil nahe (CD56<sup>High</sup>→CD56<sup>Dim</sup>) <sup>75</sup>. Es ist anzunehmen, dass die Expression von CD27 während der NK-Zell-Reifung herunterreguliert wird. Möglicherweise verändert sich daher auch die Aktivierbarkeit der Zellen im Verlauf der Reifung.

Neben der Charakterisierung des Reifungszustandes von NK-Zellen hat CD27 zusätzliches Interesse dadurch erlangt, dass es durch Interaktion mit CD70 wesentlich an Prozessen der Immunitäts-/Toleranz-Regulation beteiligt sein soll <sup>170</sup>. CD70 stellt den bisher einzig im Menschen bekannten Bindungspartner von CD27 dar <sup>64</sup>. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der CD27/CD70-Interaktion für die anti-HCV-Aktivität von NK-Zellen untersucht. Die Blockade von CD70 auf HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen resultierte lediglich in einer leichten Reduktion der HCV-Replikations-Hemmung. Die anti-virale Wirkung von NK-Zellen scheint daher nicht zwangsläufig an

eine direkte CD27/CD70-Interaktion gebunden zu sein. Alternativ könnte eine basale Aktivität von NK-Zellen vorliegen, die unabhängig von CD27/CD70 ist. Vermutlich wird das CD27-Molekül an sich nicht für die anti-HCV-Aktivität der NK-Zellen benötigt. Vielmehr scheint die Expression von CD27 eher jene NK-Zellen zu kennzeichnen, die per se über ein starkes anti-virales Potential verfügen. Die Bedeutung von CD27(+) NK-Zellen wird auch in Versuchen mit knockout-Mäusen erkennbar <sup>92</sup>. Zwar blieb die Anzahl von NK-Zellen bei den CD27<sup>-/-</sup> -Mäusen unbeeinflusst und die NK-Zellen erreichten eine volle phänotypische Reife, allerdings wiesen die NK-Zellen bei diesen Tieren eine erhöhte Expression inhibitorischer Rezeptoren auf, die sich im ruhenden Zustand nicht auf die basalen Effektor-Funktionen der NK-Zellen auswirkte. Unter Stimulation wiesen NK-Zellen aus CD27<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch eine verringerte zytolytische Aktivität und Zytokin-Produktion auf. Die Befunde aus CD27-defizienten Mäusen deuten darauf hin, dass CD27 für die Entwicklung von NK-Zellen weniger wichtig zu sein scheint, aber für deren Aktivierung und Funktionalität hingegen eine bedeutende Rolle spielt. Dies deckt sich mit der in der vorliegenden Arbeit gefundenen höheren Aktivität humaner CD27-exprimierender NK-Zellen.

Zur Untersuchung der *in vivo*-Relevanz CD27-exprimierender NK-Zellen wurde deren Häufigkeit im Blut von Patienten untersucht. Beim Vergleich der Häufigkeit CD27-positiver NK-Zellen bei unterschiedlichen Patienten, beispielsweise solcher mit akuter oder chronischer HCV/HIV-Ko-Infektion, HIV-mono-Infizierten und Gesunden offenbarten sich keine relevanten Unterschiede. Allerdings ließ sich bei akuter Hepatitis C-Infektion von HIV-positiven Patienten ein Unterschied feststellen zwischen den Patienten, die das Hepatitis C Virus spontan ausheilten und jenen, bei denen sich eine chronische Infektion entwickelte. Bei den Ausheilern war eine signifikant höhere Frequenz CD27(+) NK-Zellen nachweisbar. Darüber hinaus korrelierte in dieser Gruppe die Frequenz CD27(+) NK-Zellen sowohl mit der Sekretion von IFN- als auch mit der NK-Zell-vermittelten Hemmung der HCV-Replikation. Eine hohe Anzahl CD27-exprimierender NK-Zellen scheint demnach mit der spontanen Ausheilung einer akuten HCV-Infektion in HIV(+) Probanden assoziiert zu sein. CD27(+) NK-Zellen verfügen neben einer hohen Degranulationspotenz auch über eine starke IFN- -vermittelte anti-virale Kapazität. Im Hinblick auf eine effektive Virusbekämpfung bei einer akuten Hepatitis C-Infektion scheint es also naheliegend, dass ein erhöhtes

Vorkommen dieses aktiven NK-Zell-Subtyps u.a. als frühe Quelle von IFN- und möglicherweise anderer Zytokine, wesentlich zur Viruseliminierung beiträgt.

Neben der Wichtigkeit für die Funktion von NK-Zellen ist CD27 auch bedeutend für die Funktion weiterer Zelltypen. Andere Arbeiten im Zusammenhang mit der chronischen HCV-Infektion berichten vom Verlust CD27-exprimierender Lymphozyten als Folge der chronischen Immunaktivierung. Damit deckt sich die Beobachtung, dass kontinuierliche Stimulation über CD27 zu einem signifikanten Abfall der NK-Zell-Zahl *in vivo* führt<sup>171</sup>. Ebenso wurde von einem Zusammenhang zwischen dem Verlust der CD27(+) B-Zell-Population und der gestörten Aktivierung von B-Zellen bei fortgeschrittenen Stadien der HCV-induzierten Leberfibrose-/zirrhose berichtet<sup>172</sup>. Auch der „cross-talk“ von NK-Zellen mit Dendritischen Zellen (DC), der eine bedeutungsvolle Rolle im Zuge angeborener Immunantworten hat und zur Sekretion von IFN- durch NK-Zellen führt, wird durch die Expression von CD27 beeinflusst<sup>88,173</sup>. In Experimenten mit murinen NK-Zellen verfügten CD27(+) NK-Zellen über ein deutlich höheres Potential zur IFN- -Produktion als CD27(-) NK-Zellen, wenn diese mit DC inkubiert wurden. Möglicherweise spielen CD27-exprimierende NK-Zellen eine entscheidende Rolle beim frühen „cross-talk“ zwischen NK-Zellen und DC in den lymphatischen Organen. Für diese Vermutung spricht auch der Befund, dass CD27(+) NK-Zellen gegenüber CD27(-) NK-Zellen in den Lymphorganen als vorherrschende Population identifiziert wurden<sup>88</sup>. Da besonders die TH<sub>1</sub> -Antwort durch NK-Zell-sezernierte Zytokine unterstützt wird, ergibt sich hier eine Verknüpfung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Im Hinblick auf die starke IFN- -Sekretion könnte der CD27(+) NK-Zell-Subtyp für das sogenannte Priming der adaptiven Immunität relevant sein.

## 2 Die Bedeutung CXCR3-exprimierender Natürlicher Killer-Zellen

Die Rekrutierung von NK-Zellen in die Leber wird wesentlich durch Chemokine und Chemokin-Rezeptoren reguliert. Dabei ist der Chemokin-Rezeptor CXCR3 in die Rekrutierung aktivierter Lymphozyten in die entzündete Leber involviert. Er spielt wahrscheinlich auch eine Schlüsselrolle für die Regulation der Immunzell-Kompartimentierung zwischen Leber und Blut während der HCV-Infektion. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR3 und zugehöriger Liganden mit dem Fibrosestadium assoziiert sind<sup>145–147</sup>. Dies ließ vermuten, dass auch CXCR3-exprimierende NK-Zellen eine Rolle in der HCV-assoziierten Leberschädigung spielen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Anhand der Expression von CXCR3 war eine Unterteilung von NK-Zellen in distinkte Subpopulationen möglich, die sowohl phänotypisch als auch funktionell voneinander abgrenzbar sind.

Die Charakterisierung peripherer NK-Zellen hinsichtlich der Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR3 ergab, dass sowohl in den CD56<sup>Dim</sup> als auch in den CD56<sup>High</sup> NK-Zellen CXCR3(+) Zellen vorkommen. Dabei war die Häufigkeit CXCR3(+) NK-Zellen beim CD56<sup>High</sup> Subtyp deutlich erhöht. Anhand der CXCR3-Expression ließen sich vier NK-Zell-Subpopulationen definieren: CXCR3(+)CD56<sup>High</sup>, CXCR3(-)CD56<sup>High</sup>, CXCR3(+)CD56<sup>Dim</sup> und CXCR3(-)CD56<sup>Dim</sup>. Bei der weiteren phänotypischen Charakterisierung konnte eine stufenweise Abnahme der Expression von Reifungsmarkern (CD27, CD127 und CD62L) von CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> über CXCR3(-)CD56<sup>High</sup> nach CXCR3(+)CD56<sup>Dim</sup> bis hin zu CXCR3(-)CD56<sup>Dim</sup> NK-Zellen nachgewiesen werden. Das Modell der NK-Zell-Reifung von CD56<sup>High</sup> zu CD56<sup>Dim</sup> Zellen ist von Veränderungen der Expression anderer Oberflächenmarker begleitet<sup>75</sup>. Dementsprechend ist eine Identifikation unterschiedlicher Reifungsstadien anhand der Expression bestimmter Marker möglich. CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen scheinen die unreifste der vier CXCR3-Subpopulationen zu repräsentieren, da auf ihnen die höchste Expression von CD27, CD127 und CD62L – allesamt Marker unreifer NK-Zellen – nachgewiesen wurden<sup>72,84,87,88</sup>. Auf den CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen war zudem die Expressionsdichte von CD94 am höchsten. Passend dazu wurde beschrieben, dass die Expression von CD94 im Laufe der Reifung von CD56<sup>High</sup> zu CD56<sup>Dim</sup> NK-Zellen

herunterreguliert wird <sup>73,174,175</sup>. Eine dynamische Regulation der CXCR3-Expression während der NK-Zell-Reifung erscheint daher naheliegend.

Da die Expression von NK-Zell-Rezeptoren eng mit der Entwicklung und Funktion von NK-Zellen im Zusammenhang steht, wurde die Anwesenheit unterschiedlicher NK-Zell-Rezeptor-Familien auf den CXCR3-Subpopulationen untersucht <sup>167</sup>. Dabei offenbarten sich deutliche Unterschiede: CXCR3(+) NK-Zellen exprimierten signifikant mehr NKG2A, NKG2D und NKp44 als CXCR3(-) Zellen. Bezüglich Ko-Expression von NK-Zell-Rezeptoren der SLAM-Rezeptor-Familie war die Assoziation mit CXCR3 entgegengesetzt; hier war die Expression der SLAM-Rezeptoren auf CXCR3(+) NK-Zellen deutlich niedriger als auf CXCR3(-) Zellen.

Aufgrund der unterschiedlichen Expression von NK-Zell-Rezeptoren waren funktionelle Unterschiede zwischen CXCR3-exprimierenden und -negativen NK-Zell-Subtypen anzunehmen, die mittels Ko-Inkubationsexperimenten bestätigt werden konnten. Bei Analyse der NK-Zell-Effektor-Funktionen mit MHC-defizienten K562 Zellen als Zielzellen ergab sich kein relevanter Unterschied im zytotoxischen Potential zwischen CXCR3(+) und CXCR3(-) NK-Zellen. Allerdings war die Sekretion von IFN- durch CXCR3(+) Zellen deutlich geringer. Da K562 Zellen eher zur Untersuchung von NK-Zell-Funktionen im Zusammenhang mit hämatologischen Fragestellungen dienen, wurden sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit als nicht geeignet gehalten, um NK-Zellen im Zusammenhang mit Fibrose und der HCV-Infektion zu untersuchen. Als besseres Modell zur Untersuchung der Effektor-Funktionen bei Hepatitis C boten sich HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen an, die es zusätzlich ermöglichen, anti-virale Funktionen von NK-Zellen zu beurteilen. Tatsächlich ergaben sich zwischen CXCR3(+) und CXCR3(-) NK-Zellen mit diesen Zielzellen deutliche Unterschiede: CXCR3-exprimierende NK-Zellen wiesen ein signifikant stärkeres zytotoxisches Potential auf und sezernierten wesentlich mehr IFN- . IFN- hat sich als bedeutsames Zytokin für die anti-virale Funktion von NK-Zellen herausgestellt <sup>165</sup>. Passend dazu ergab sich anhand des Luciferase-Assays mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen eine signifikant stärkere Hemmung der *in vitro*-HCV Replikation durch CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen als durch CXCR3(-) NK-Zellen. Das höhere anti-virale Potential CXCR3(+) NK-Zellen lässt sich durch die beobachtete stärkere Sekretion von IFN- im Vergleich zu CXCR3(-) NK-Zellen

erklären, da bereits nachgewiesen werden konnte, dass IFN-  $\gamma$  essentiell für die anti-virale Aktivität von NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* ist <sup>90,99,169</sup>.

Daten zur Expression von CXCR3 im Zusammenhang mit HCV beziehen sich überwiegend auf Prozesse der Entzündung und Fibrose. Interessanterweise konnte ein Zusammenhang zwischen CXCR3-Liganden, insbesondere CXCL10, und dem Therapieansprechen hergestellt werden. Hohe Level von CXCL10 während der akuten HCV-Infektion waren mit einer geringeren Chance einer spontanen Ausheilung assoziiert <sup>176</sup>. Als Konsequenz aus diesen Beobachtungen wurde von den Autoren ein Schwellenwert von CXCL10 bei akuter Hepatitis C-Infektion zur therapeutischen Intervention postuliert. Alternativ wurde die Kombination der CXCL10-Spiegel im Serum mit bestimmten SNPs im IL28B-Gen vorgeschlagen, um jene Patienten mit akuter HCV-Infektion, bei denen aller Voraussicht nach eine spontane Eliminierung des Virus erfolgen wird, von denen mit frühem Therapiebedarf zu unterscheiden <sup>177</sup>. Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurde in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei akuter HCV-Infektion ebenso ein hoher CXCL10-Plasmaspiegel vor Behandlungsbeginn als Prädiktor für das Nicht-Ansprechen auf eine anti-virale Therapie beschrieben <sup>178,179</sup>.

Durch Ko-Inkubationsexperimente mit aktivierten HSC, die ein Modell für die Vorgänge während des fibrotischen Umbaus der Leber darstellen, wurde das anti-fibrotische Potential von CXCR3(+) und CXCR3(-) NK-Zellen bestimmt. Analog zu den Daten mit HUH7<sub>Replikon</sub> Zellen stellten sich CXCR3(+) NK-Zellen als die potentere NK-Zell-Population heraus. Sowohl hinsichtlich Degranulation als auch IFN-  $\gamma$ -Sekretion wiesen sie ein signifikant höheres Potential als CXCR3(-) NK-Zellen auf, aktivierte hepatische Sternzellen zu eliminieren. Dabei bestätigte die Untersuchung bei verschiedenen Effektor:Target-Verhältnissen die Spezifität der Befunde. CXCR3(+) NK-Zellen verfügen demnach über ein ausgeprägtes anti-fibrotisches Potential. Interessanterweise zeigten die vier phänotypisch unterschiedlichen CXCR3-NK-Zell-Subpopulationen auch hinsichtlich einer Induktion des Zelltods in aktivierten humanen HSC die gleichen funktionellen Unterschiede: CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen wiesen die stärkste Aktivität gegen HSC auf. Ähnlich zur stufenweisen Abnahme der Reifungsmarker-Expression wurde eine progressive Abnahme der Degranulation und IFN-  $\gamma$ -Sekretion von CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen hin zu CXCR3(-)CD56<sup>Dim</sup> NK-

Zellen beobachtet. Die starke Aktivität gegen HSC lässt sich mit den Resultaten der phänotypischen Untersuchungen verknüpfen.

Da die Expression der SLAM-Moleküle invers mit den funktionellen Unterschieden der NK-Zell-Aktivität korrelierte, ist anzunehmen, dass diese Ko-Rezeptoren für die anti-fibrotische Aktivität der verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen von geringerer Bedeutung sind. Möglicherweise beeinflussen sie aber den NK-Zell-Kontakt zu benachbarten Zellen.

Auf CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen konnten die höchsten Expressionsdichten der aktivierenden Rezeptoren NKG2D und NKp44 nachgewiesen werden. Versuche im Mausmodell hatten zudem gezeigt, dass aktivierte HSC durch NK-Zellen über NKG2D-Aktivierung eliminiert werden <sup>120</sup>. Übereinstimmend damit konnte der Einfluss von NKG2D auf die Funktion humaner NK-Zellen bestätigt werden. Die Blockierung von NKG2D führte zu einer starken Reduktion der NK-Zell-Degranulation und zur Aufhebung des funktionellen Unterschiedes zwischen CXCR3(+) und CXCR3(-) NK-Zellen nach Aktivierung durch primäre humane HSC. Die funktionelle Relevanz von NKG2D konnte weiterhin durch die eigene Beobachtung gestützt werden, dass dieser Rezeptor bei der NK-Zell-vermittelten Induktion der Apoptose in HSC beteiligt ist <sup>126</sup>. Insgesamt untermauerten diese Befunde die bedeutende Rolle von NK-Zellen für die Regulation fibrotischer Umbauprozesse in der Leber. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass HCV-Proteine humane hepatische Sternzellen direkt aktivieren können <sup>180</sup>. Wie durch unsere Gruppe nachgewiesen, resultierte die Stimulation von HSC mit dem HCV Core-Protein in einem signifikanten Anstieg der Expression der pro-fibrotischen Proteine TIMP2 (Tissue inhibitor of Metalloproteinase 2), MMP2 (Matrixmetalloproteinase 2) und Col1 1 (Kollagen Typ 1 alpha 1) <sup>181</sup>. Der Aktivierungsprozess wird hierbei durch Bindung von HCV Core an TLR2 (Toll-like-Rezeptor 2) vermittelt <sup>182</sup>. Eine effektive Eliminierung aktivierter HSC durch CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen könnte daher eine wichtige Bedeutung für die Regulation der fibrotischen Veränderungen bei einer chronischen HCV-Infektion haben. Befunde aus CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen liefern weitere Hinweise, dass CXCR3 als anti-fibrotischer Regulator in der Leber fungiert <sup>183</sup>. Wie Arbeiten der letzten Jahre zeigen, ist eine hohe Expression der Liganden von CXCR3, insbesondere CXCL10, mit einer progressiven Leberschädigung und Fibrose assoziiert <sup>147,148,151</sup>. Diese

widersprüchlichen Befunde können zum Teil durch die Identifikation einer antagonistischen Form von CXCL10 bei HCV(+) Patienten erklärt werden <sup>155</sup>. DDP4 (Dipeptidylpeptidase IV) bewirkt eine N-terminale Trunkierung von CXCL10, die zur Bildung einer dominant negativen Form des Proteins führt. Trunkiertes CXCL10 kann zwar noch an CXCR3 binden, induziert allerdings keine Signalübertragung <sup>153,155</sup>. Infolgedessen wird die CXCR3-vermittelte Rekrutierung immunkompetenter Zellen in die Leber behindert, was in einer extra-hepatischen Akkumulation CXCR3-exprimierender Zellen resultieren könnte. Tatsächlich ließ sich in unseren Untersuchungen eine Assoziation der HCV-Infektion mit einer signifikant erhöhten Frequenz peripherer CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen nachweisen. Im Hinblick auf die starke anti-fibrotische Aktivität dieses NK-Zell-Subtyps lässt dies auf eine mögliche Assoziation fortgeschrittener Fibroestadien bei chronischer HCV-Infektion mit einer geringeren Anzahl CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen in der Leber schließen. Entgegen diesen Erwartungen war stattdessen die Häufigkeit intra-hepatischer CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittener Fibrose jedoch erhöht. Die daraufhin veranlassten funktionellen Untersuchungen von NK-Zellen bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion ergaben eine spezifisch für den CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> Subtyp gegenüber gesunden Probanden verringerte Degranulation und IFN- $\gamma$ -Sekretion in der Ko-Kultur mit aktivierten humanen HSC. Unter dem Einfluss einer chronischen Infektion mit HCV scheint demzufolge die anti-fibrotische Aktivität von CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen beeinträchtigt zu sein.

Leider war die Anzahl intra-hepatischer CXCR3(+) NK-Zellen aufgrund des nur begrenzt verfügbaren Lebergewebes aus Biopsien für funktionelle Versuche nicht ausreichend. Es herrscht daher noch Klärungsbedarf, inwieweit intra-hepatische CXCR3(+) NK-Zellen tatsächlich in ihrer Aktivität gestört sind oder gar pro-fibrotische Effekte ausüben. Allerdings konnten wesentliche Mechanismen, die einer gestörten Aktivität peripherer CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen bei der HCV-Infektion zugrunde liegen, teilweise aufgeklärt werden. Während die NK-Zell-Reifungsmarker bei Gesunden und Patienten in ähnlichem Umfang exprimiert wurden, differierte die Expression der NK-Zell-Rezeptoren. Auf CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen von Patienten mit chronischer HCV-Infektion waren signifikant höhere Mengen des hemmenden Rezeptors NKG2C aber eine reduzierte Expression des aktivierenden Rezeptors

NKp46 vorhanden. Durch diesen Unterschied ließ sich eine funktionelle Beeinträchtigung dieses NK-Zell-Subtyps erklären. Die höhere Expression von NKp44 und CRACC auf Patientenzellen korrelierte aber nicht mit der veränderten Funktion der NK-Zellen in diesen Untersuchungen. Möglicherweise sind diese Rezeptoren nicht maßgeblich an der anti-fibrotischen Aktivität von NK-Zellen beteiligt. Diese Vermutung sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Als wichtiges Ergebnis wird durch die Experimente mit Ko-Kultur verschiedener Zielzellen die Relevanz von NKp46(+) NK-Zellen dahingehend gestärkt, dass durch diesen Rezeptor eine Subpopulation von NK-Zellen definiert wird, die sowohl supprimierend auf die HCV-Replikation wirkt, als auch effektiv zur Beseitigung aktivierter HSC beiträgt <sup>90</sup>. Darüber hinaus weisen die NK-Zellen von Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion eine deutlich verringerte Expression von NKG2D auf. Diese Befunde könnten ebenfalls eine Erklärung für die beobachtete reduzierte anti-fibrotische NK-Zell-Aktivität bei chronischer Hepatitis C liefern. Im Einklang damit stehen die Daten von Sène und Kollegen, die Unterschiede zwischen Patienten mit chronischer HCV-Infektion und gesunden Probanden nur hinsichtlich der Expressionsstärke von NKG2D, nicht aber in der Häufigkeit NKG2D-positiver Zellen fanden <sup>184</sup>. Von anderen Arbeitsgruppen wurde allerdings auch von einer erhöhten NKG2D-Expression unter HCV-Einfluss berichtet <sup>110,185</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität von NK-Zellen unter chronischem HCV-Einfluss durch komplexe Mechanismen verändert wird.

Eine Reduktion der NKG2D-Expression auf NK-Zellen konnte bei Patienten mit Lungen- und Kolonkrebs durch den Einfluss von TGF- nachgewiesen werden. Dieses Zytokin führte zu einer Verringerung der lytischen Aktivität der NK-Zellen <sup>186</sup>. Des Weiteren ist beschrieben, dass die Serumspiegel von TGF- bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion mit dem Grad der Leberfibroseprogression korrelieren <sup>187</sup>. TGF- stellt ein Schlüsselzytokin der Leberfibrogenese dar und wirkt hemmend auf die Funktion von NK-Zellen. Dies könnte möglicherweise auch in den vorliegenden Ergebnissen zur reduzierten Funktion CXCR3(+) NK-Zellen bei HCV(+) Patienten beitragen <sup>188</sup>. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wurde berichtet, dass die HC Viruslast invers mit dem TGF- -Spiegel korreliert <sup>189</sup>. Wie Takehara und Kollegen zeigen konnten, ist bei chronischer Hepatitis C die Induktion der NKG2D-Liganden MICA/B auf Dendritischen Zellen verringert und führt zu einer schwächeren Interaktion

mit NKG2D auf den NK-Zellen <sup>106</sup>. Da unsere Beobachtungen einer verringerten Expression von NKG2D bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion nicht spezifisch für den CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> Subtyp waren, scheinen weitere Mechanismen für die Beeinträchtigung der NK-Zell-Aktivität unter HCV-Einfluss eine Rolle zu spielen. IFN- $\beta$  beispielsweise steuert die Zytokin- und Chemokin-Produktion von NK-Zellen, sowie deren Zytotoxizität. Möglich wäre, dass die funktionellen Defekte auf einer viralen Interferenz mit IFN- $\beta$ -Signalwegen beruhen und zu einer reduzierten Aktivierung von NK-Zellen von HCV(+) Patienten mit geringerer Lysekapazität führen <sup>190</sup>. Als weiterer wichtiger Faktor für die Aktivierung, Proliferation und das Überleben von NK-Zellen wurde IL-15 beschrieben <sup>191</sup>. Im Lebergewebe HCV-positiver Patienten liegt IL-15 signifikant erhöht vor <sup>192</sup>. Dieses IL-15 könnte an Rezeptoren auf NK-Zellen binden und zu deren Herunterregulation und Internalisierung führen. Somit wären die Rezeptoren für eine nachfolgende Stimulation nicht mehr verfügbar. An Bedeutung gewinnt dieser Gedanke durch die Tatsache, dass IL-15 einen Teil des IL-2 Rezeptors (IL-2R $\beta$ ) von NK-Zellen bindet und damit die Aktivierung von NK-Zellen über dieses Zytokin eingeschränkt sein könnte <sup>193</sup>. Tatsächlich konnte unsere Arbeitsgruppe für die HCV/HIV Ko-Infektion nachweisen, dass eine gestörte Sekretion von IL-2 durch Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer ineffektiven Stimulation der NK-Zell-Funktion führt <sup>194</sup>.

Die beobachtete intra-hepatische Akkumulation CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen bei HCV(+) Patienten mit fortgeschrittener Fibrose könnte an der Progression der HCV-induzierten Leberfibrose beteiligt sein. Denkbar wäre, dass eine verstärkte Rekrutierung CXCR3(+)CD56<sup>High</sup> NK-Zellen in die Leber erfolgt, um die HCV-Replikation in infizierten Leberzellen zu hemmen und die fibrotischen Umbauprozesse durch Eliminierung aktivierter HSC in der Leber einzudämmen. Da dieser NK-Zell-Subtyp bei HCV(+) Patienten jedoch funktionell beeinträchtigt zu sein scheint, ist diese Rekrutierung ineffizient. Tatsächlich konnten in Lebern HCV-infizierter Patienten deutlich erhöhte mRNA-Level der CXCR3 Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 im Vergleich mit Gesunden nachgewiesen werden. Insbesondere die Transkripte für CXCL10 stiegen mit dem Grad der Inflammation und Leberfibrose an. Durch Immunfärbung konnte die Expression von CXCL10 in Biopsien HCV(+) Patienten besonders in Hepatozyten nachgewiesen werden, während CXCL10 in gesunden Lebern nicht detektierbar war <sup>146</sup>. CXCL10 scheint demnach für die HCV-induzierte

Nekroinflammation und Fibrose von Bedeutung zu sein. Untermuert wird diese Hypothese durch die in der hier vorliegenden Arbeit an Monozyten generierten Daten. Diese ergaben, dass HCV Core eine effektive Sekretion von CXCL10 induziert, wodurch ein funktioneller Chemokin-Gradient gebildet wird. In den *in vitro* Migrationsexperimenten resultierte dies in einer präferentiellen Rekrutierung von CXCR3(+) NK-Zellen. Im Mausmodell wurde beobachtet, dass auch HSC nach IFN- $\gamma$ -Stimulation zur Sekretion von CXCL10 fähig sind <sup>195</sup>. Werden diese Beobachtungen auf die Situation in der humanen Leber mit HCV-Infektion übertragen, so kann angenommen werden, dass die durch HCV induzierte Bildung von CXCL10 durch HSC zu einer weiteren funktionell relevanten Steigerung der ohnehin großen Mengen an CXCR3-Liganden führt, was sich mit den Daten von Zeremski und Kollegen deckt <sup>146</sup>. Dies könnte zu einer weiteren Rekrutierung CXCR3(+) NK-Zellen führen, welche jedoch für die Kontrolle der HSC keine Bedeutung hätte, da diese NK-Zellen in ihrer Funktion gestört sind. Darüber hinaus könnte auch die HCV-induzierte Expression von CXCL10 zusätzliche inflammatorische CXCR3(+) Lymphozyten anlocken, die durch Expression pro-inflammatorischer Zytokine die Entzündung und Nekrose in der Leber weiter intensivieren könnten <sup>139</sup>. Ähnliches konnte bereits für isolierte T-Zellen aus Lebern HCV(+) Patienten beobachtet werden <sup>196</sup>. Diese waren u.a. bezüglich ihres Potentials zur IFN- $\gamma$ -Produktion beeinträchtigt und nur zu einer ineffektiven Hemmung des HC Virus fähig. Allerdings produzierten die funktionell gestörten CD4(+) T-Zellen selbst weiterhin Chemokine und Zytokine und stimulierten wiederum andere Zellen zur Zytokin-Produktion.

Neben der Leber sind CXCR3-exprimierende NK-Zellen auch bei fibrotischen Umbauprozessen anderer Organe von Bedeutung. Hier wird CXCR3, analog zu unseren Befunden bei Gesunden, anti-fibrotische Wirkung zugeschrieben. Mittels unilateraler Ureter-Obstruktion bei CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen bzw. Einsatz von CXCL10-neutralisierenden Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von CXCL10/CXCR3 wesentlich zum Fortschreiten der Nierenfibrose beiträgt <sup>197</sup>. Bei der pulmonalen Fibrose, die zur Zerstörung des Lungengewebes mit Funktionsverlust führt, scheint CXCR3 ebenfalls für die Regulation dieser Prozesse wichtig zu sein und reguliert speziell die Bildung von IFN- $\gamma$  <sup>198</sup>. Versuche an CXCR3 k.o.-Mäusen wiesen nach Bleomycin-induzierter pulmonaler Fibrose auf einen selektiven Defekt bei der Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten und NK-Zellen in die Lunge hin. Dies führte zu

einer deutlichen Verminderung der frühen IFN- $\gamma$ -Antwort und einer verringerten Expression von CXCL10 in der bronchoalveolaren Lavage. Des Weiteren ließ sich eine drastische Abnahme der NK-Zell-Zahl, auch in unbehandelten Mäusen ohne Bleomycin-Gabe, nachweisen. Bei diesen Tieren schien CXCR3 für die NK-Zell-Homöostase notwendig zu sein. Die Experimente zur pulmonalen Fibrose belegen, dass CXCR3-exprimierende Zellen -speziell pulmonale NK-Zellen- notwendig und ausreichend für die Produktion von IFN- $\gamma$  sind. IFN- $\gamma$  stellte hier den entscheidenden Faktor für die Polarisierung der Immunantwort vielmehr in Richtung Aufhebung der Fibrose als zu deren Progression dar.

## VI. Anhang

### 1 Literaturverzeichnis

1. Farci, P. 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 viral hepatitis genome [Science 1989;244:359–362]. *Journal of Hepatology* **36**, 582–585 (2002).
2. Lai, W. K. *et al.* Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on Human Sinusoidal Endothelium: A Role for Capturing Hepatitis C Virus Particles. *The American journal of pathology* **169**, 200–208 (2006).
3. Pham, T. N. Q. *et al.* Hepatitis C Virus Replicates in the Same Immune Cell Subsets in Chronic Hepatitis C and Occult Infection. *Gastroenterology* **134**, 812–822 (2008).
4. GHP\_framework.pdf. at <[http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/GHP\\_framework.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/GHP_framework.pdf)>
5. Forns, X., Purcell, R. H. & Bukh, J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in Microbiology* **7**, 402–410 (1999).
6. Simmonds, P. *et al.* A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* **19**, 1321–1324 (1994).
7. Simmonds, P. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962–973 (2005).
8. Fried, M. W. *et al.* Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* **347**, 975–982 (2002).
9. Manns, M. P. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *The Lancet* **358**, 958–965 (2001).
10. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002—June 10-12, 2002. *Hepatology* **36**, s3–s20 (2002).
11. Di Bisceglie, A. M. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **26**, 34S–38S (1997).
12. Adam, R. *et al.* Evolution of liver transplantation in Europe: Report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* **9**, 1231–1243 (2003).
13. Castello, G., Scala, S., Palmieri, G., Curley, S. A. & Izzo, F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clinical Immunology* **134**, 237–250 (2010).
14. Friedman, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655–1669 (2008).
15. Popper, H. & Udenfriend, S. Hepatic fibrosis: Correlation of biochemical and morphologic investigations. *The American Journal of Medicine* **49**, 707–721 (1970).
16. Friedman, S. L., Roll, F. J., Boyles, J. & Bissell, D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 8681–8685 (1985).
17. Marra, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *Journal of hepatology* **31**, 1106–1119 (1999).

18. Arthur, M. J. P. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**, G245–G249 (2000).
19. Hammel, P. *et al.* Regression of Liver Fibrosis after Biliary Drainage in Patients with Chronic Pancreatitis and Stenosis of the Common Bile Duct. *N Engl J Med* **344**, 418–423 (2001).
20. Issa, R. *et al.* Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: Evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* **126**, 1795–1808 (2004).
21. Dixon, J. B., Bhathal, P. S., Hughes, N. R. & O'Brien, P. E. Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* **39**, 1647–1654 (2004).
22. Parés, A., Caballería, J., Bruguera, M., Torres, M. & Rodés, J. Histological course of alcoholic hepatitis: influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. *Journal of hepatology* **2**, 33–42 (1986).
23. Arthur, M. J. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* **122**, 1525–1528 (2002).
24. Friedman, S. L. & Arthur, M. J. Reversing hepatic fibrosis. *Sci Med* **8**, 194–205 (2002).
25. Afdhal, N. H. & Nunes, D. Evaluation of Liver Fibrosis: A Concise Review. *Am J Gastroenterol* **99**, 1160–1174 (2004).
26. Global surveillance and control of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* **6**, 35–47 (1999).
27. Asselah, T. *et al.* Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver International* **30**, 1259–1269 (2010).
28. Sarrazin, C. *et al.* Expertenempfehlungen zur Triple-Therapie der HCV-Infektion mit Boceprevir und Telaprevir. *Z Gastroenterol* **50**, 57–72 (5).
29. Soto, B. *et al.* Human immunodeficiency virus infection modified the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *Journal of Hepatology* **26**, 1–5 (1997).
30. Benhamou, Y. *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. *Hepatology* **30**, 1054–1058 (1999).
31. Macías, J. *et al.* Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology* **50**, 1056–1063 (2009).
32. Pineda, J. A. *et al.* HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology* **41**, 779–789 (2005).
33. Danta, M. *et al.* Impact of HIV on Host-Virus Interactions during Early Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases* **197**, 1558–1566 (2008).
34. Garcia-Samaniego, J. *et al.* Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* **96**, 179–183 (2001).
35. Troisi, C. *et al.* A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* **81**, 412–418 (1993).
36. Yee, T. T., Griffioen, A., Sabin, C. A., Dusheiko, G. & Lee, C. A. The natural history of HCV in a cohort of haemophilic patients infected between 1961 and 1985. *Gut* **47**, 845–851 (2000).
37. Rockstroh, J. K. & Spengler, U. HIV and hepatitis C virus co-infection. *The Lancet Infectious Diseases* **4**, 437–444 (2004).
38. Winnock, M., Salmon-Céron, D., Dabis, F. & Chêne, G. Interaction between HIV-1 and HCV infections: towards a new entity? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**, 936–946 (2004).

39. Yamagiwa, S., Kamimura, H. & Ichida, T. Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. *Med Mol Morphol* **42**, 1–8 (2009).
40. Krueger, P. D., Lassen, M. G., Qiao, H. & Hahn, Y. S. Regulation of NK Cell Repertoire and Function in the Liver. **31**, 43–52 (2011).
41. Bryceson, Y. T. & Long, E. O. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Current Opinion in Immunology* **20**, 344–352 (2008).
42. Lanier, L. L. NK CELL RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–274 (2004).
43. Lowin, B., Peitsch, M. C. & Tschopp, J. Perforin and Granzymes: Crucial Effector Molecules in Cytolytic T Lymphocyte and Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *Pathways for Cytolysis* **198**, 1–24 (1995).
44. Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S. & Miyazaki, S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *The Journal of Immunology* **157**, 2909–2915 (1996).
45. Bluman, E. M., Bartynski, K. J., Avalos, B. R. & Caligiuri, M. A. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest* **97**, 2722–2727 (1996).
46. Cuturi, M. C. *et al.* Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* **169**, 569–583 (1989).
47. Warren, H. S., Kinnear, B. F., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *The Journal of Immunology* **154**, 5144–5152 (1995).
48. Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G. & Long, E. O. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological Reviews* **214**, 73–91 (2006).
49. Orange, J. S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **8**, 713–725 (2008).
50. Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* **3**, 781–790 (2003).
51. Moretta, A. *et al.* ACTIVATING RECEPTORS AND CORECEPTORS INVOLVED IN HUMAN NATURAL KILLER CELL-MEDIATED CYTOLYSIS. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 197–223 (2001).
52. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I. & Steinle, A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol* **7**, 1334–1342 (2006).
53. Mandelboim, O. *et al.* Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **409**, 1055–1060 (2001).
54. Veillette, A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunological Reviews* **214**, 22–34 (2006).
55. Flaig, R. M., Stark, S. & Watzl, C. Cutting Edge: NTB-A Activates NK Cells via Homophilic Interaction. *The Journal of Immunology* **172**, 6524–6527 (2004).
56. Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C. & Moretta, A. Natural Killer Cells: A Mystery No More. *Scandinavian Journal of Immunology* **55**, 229–232 (2002).
57. Cruz-Munoz, M.-E., Dong, Z., Shi, X., Zhang, S. & Veillette, A. Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nat Immunol* **10**, 297–305 (2009).

58. Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., Coligan, J. E. & Brooks, A. G. Recognition of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-E Complexed with HLA Class I Signal Sequence–derived Peptides by CD94/NKG2 Confers Protection from Natural Killer Cell–mediated Lysis. *The Journal of Experimental Medicine* **187**, 813–818 (1998).
59. Lee, N. *et al.* HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 5199–5204 (1998).
60. Rajagopalan, S. & Long, E. O. A Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G–specific Receptor Expressed on All Natural Killer Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **189**, 1093–1100 (1999).
61. Nandi, D., Gross, J. A. & Allison, J. P. CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells. *The Journal of Immunology* **152**, 3361–3369 (1994).
62. Chambers, B. J., Salcedo, M. & Ljunggren, H.-G. Triggering of Natural Killer Cells by the Costimulatory Molecule CD80 (B7-1). *Immunity* **5**, 311–317 (1996).
63. Akiba, H. *et al.* CD27, a Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Activates NF- $\kappa$ B and Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- $\kappa$ B-inducing Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 13353–13358 (1998).
64. Borst, J., Hendriks, J. & Xiao, Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Current Opinion in Immunology* **17**, 275–281 (2005).
65. Hendriks, J. *et al.* CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature immunology* **1**, 433–440 (2000).
66. Agematsu, K. *et al.* Generation of Plasma Cells From Peripheral Blood Memory B Cells: Synergistic Effect of Interleukin-10 and CD27/CD70 Interaction. *Blood* **91**, 173–180 (1998).
67. Agematsu, K. *et al.* CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2825–2829 (1995).
68. Lens, S. M. A., Tesselaar, K., van Oers, M. H. J. & van Lier, R. A. W. Control of lymphocyte function through CD27–CD70 interactions. *Seminars in Immunology* **10**, 491–499 (1998).
69. Tesselaar, K. *et al.* Expression of the Murine CD27 Ligand CD70 In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology* **170**, 33–40 (2003).
70. Takeda, K. *et al.* CD27-Mediated Activation of Murine NK Cells. *The Journal of Immunology* **164**, 1741–1745 (2000).
71. Hayakawa, Y. & Smyth, M. J. CD27 Dissects Mature NK Cells into Two Subsets with Distinct Responsiveness and Migratory Capacity. *The Journal of Immunology* **176**, 1517–1524 (2006).
72. Vossen, M. T. M. *et al.* CD27 Defines Phenotypically and Functionally Different Human NK Cell Subsets. *The Journal of Immunology* **180**, 3739–3745 (2008).
73. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* **22**, 633–640 (2001).
74. Sedlmayr, P. *et al.* Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations. *International archives of allergy and immunology* **110**, 308–313 (1996).
75. Chan, A. *et al.* CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *The Journal of Immunology* **179**, 89–94 (2007).

76. Romagnani, C. *et al.* CD56brightCD16<sup>-</sup> Killer Ig-Like Receptor<sup>-</sup> NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation. *The Journal of Immunology* **178**, 4947–4955 (2007).
77. Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. & Phillips, J. H. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Immunology* **136**, 4480–4486 (1986).
78. Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S. & Phillips, J. H. Comparative studies of human FcR111-positive and negative natural killer cells. *The Journal of Immunology* **143**, 3183–3191 (1989).
79. Poli, A. *et al.* CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* **126**, 458–465 (2009).
80. Nagler, A., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **171**, 1527–1533 (1990).
81. Carson, W. E., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. CD56bright natural killer cell subsets: Characterization of distinct functional responses to interleukin 2 and the c kit ligand. *European journal of immunology* **27**, 354–360 (1997).
82. Caligiuri, M. A. *et al.* Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *The Journal of Experimental Medicine* **171**, 1509–1526 (1990).
83. Berahovich, R. D., Lai, N. L., Wei, Z., Lanier, L. L. & Schall, T. J. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *The Journal of Immunology* **177**, 7833–7840 (2006).
84. Juelke, K. *et al.* CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood* **116**, 1299–1307 (2010).
85. Lopez-Vergès, S. *et al.* CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16<sup>+</sup> NK-cell subset. *Blood* **116**, 3865–3874 (2010).
86. Vanherberghen, B. *et al.* Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response. *Blood* (2013).doi:10.1182/blood-2012-06-439851
87. Frey, M. *et al.* Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *The Journal of Immunology* **161**, 400–408 (1998).
88. Silva, A., Andrews, D. M., Brooks, A. G., Smyth, M. J. & Hayakawa, Y. Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets. *International Immunology* **20**, 625–630 (2008).
89. Yu, J. *et al.* CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood* **115**, 274–281 (2010).
90. Krämer, B. *et al.* Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology* **56**, 1201–1213 (2012).
91. Krämer, B. *et al.* Expression von NK-Zell- und Chemokinrezeptoren auf Natürlichen Killerzellen in der Leber und im peripherem Blut bei chronischen Lebererkrankungen. *Z Gastroenterol* **48**, P4\_27 (2010).
92. De Colvenaer, V. *et al.* CD27-deficient mice show normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunol Cell Biol* **89**, 803–811 (2011).
93. Knapp, S. *et al.* Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* **51**, 1168–1175 (2010).

94. Rauch, A. *et al.* Influence of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors and their HLA-C ligands on resolving hepatitis C virus infection. *Tissue Antigens* **69**, 237–240 (2007).
95. Khakoo, S. I. *et al.* HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. *Science* **305**, 872–874 (2004).
96. Jamil, K. M. & Khakoo, S. I. KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *BioMed Research International* **2011**, (2011).
97. Amadei, B. *et al.* Activation of Natural Killer Cells During Acute Infection With Hepatitis C Virus. *Gastroenterology* **138**, 1536–1545 (2010).
98. Pelletier, S. *et al.* Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *Journal of Hepatology* **53**, 805–816 (2010).
99. Kokordelis, P. *et al.* An effective IFN- mediated inhibition of HCV replication by NK cells is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C in HIV(+) patients. *Hepatology* n/a–n/a (2013).doi:10.1002/hep.26782
100. Bonorino, P. *et al.* Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *Journal of Hepatology* **51**, 458–467 (2009).
101. Golden-Mason, L. *et al.* Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* **57**, 1121–1128 (2008).
102. Morishima, C. *et al.* Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* **43**, 573–580 (2006).
103. Takehara, T. & Hayashi, N. Natural Killer Cells in Hepatitis C Virus Infection: From Innate Immunity to Adaptive Immunity. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **3**, Supplement 2, S78–S81 (2005).
104. Nattermann, J. *et al.* Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* **55**, 869–877 (2006).
105. Meier, U.-C. *et al.* Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *Journal of virology* **79**, 12365–12374 (2005).
106. Jinushi, M. *et al.* Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *The Journal of Immunology* **171**, 5423–5429 (2003).
107. Nattermann, J. *et al.* The HLA-A2 Restricted T Cell Epitope HCV Core< sub> 35–44</sub> Stabilizes HLA-E Expression and Inhibits Cytolysis Mediated by Natural Killer Cells. *The American journal of pathology* **166**, 443–453 (2005).
108. Ahlenstiel, G. *et al.* Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* **138**, 325–335.e1–2 (2010).
109. Dessouki, O. *et al.* Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **393**, 331–337 (2010).
110. Oliviero, B. *et al.* Natural Killer Cell Functional Dichotomy in Chronic Hepatitis B and Chronic Hepatitis C Virus Infections. *Gastroenterology* **137**, 1151–1160.e7 (2009).
111. Yoon, J. C., Lim, J.-B., Park, J. H. & Lee, J. M. Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells. *Journal of virology* **85**, 12557–12569 (2011).

112. De Maria, A. *et al.* Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur. J. Immunol.* **37**, 445–455 (2007).
113. Duesberg, U. *et al.* Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* **35**, 650–657 (2001).
114. Jinushi, M. *et al.* 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. *The Journal of Immunology* **173**, 6072–6081 (2004).
115. Thomas, D. L. *et al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**, 798–801 (2009).
116. Ge, D. *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399–401 (2009).
117. Suppiah, V. *et al.* IL28B, HLA-C, and KIR variants additively predict response to therapy in chronic hepatitis C virus infection in a European Cohort: a cross-sectional study. *PLoS medicine* **8**, e1001092 (2011).
118. Naggie, S. *et al.* Dysregulation of innate immunity in hepatitis C virus genotype 1 IL28B-unfavorable genotype patients: Impaired viral kinetics and therapeutic response. *Hepatology* **56**, 444–454 (2012).
119. Melhem, A. *et al.* Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *Journal of Hepatology* **45**, 60–71 (2006).
120. Radaeva, S. *et al.* Natural Killer Cells Ameliorate Liver Fibrosis by Killing Activated Stellate Cells in NKG2D-Dependent and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Dependent Manners. *Gastroenterology* **130**, 435–452 (2006).
121. Jeong, W.-I. *et al.* Suppression of innate immunity (natural killer cell/interferon- $\gamma$ ) in the advanced stages of liver fibrosis in mice. *Hepatology* **53**, 1342–1351 (2011).
122. Muhanna, N. *et al.* Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut* **60**, 90–98 (2011).
123. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* **134**, 657–667 (2008).
124. Taimr, P. *et al.* Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* **37**, 87–95 (2003).
125. Dong, Z. *et al.* Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *Journal of Hepatology* **41**, 966–973 (2004).
126. Glassner, A. *et al.* NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab Invest* **92**, 967–977 (2012).
127. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987–995 (2004).
128. Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity* **25**, 373–381 (2006).
129. Yoneyama, M. & Fujita, T. Function of RIG-I-like Receptors in Antiviral Innate Immunity. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 15315–15318 (2007).
130. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730–737 (2004).

131. Crotta, S. *et al.* Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein. *The Journal of Experimental Medicine* **195**, 35–42 (2002).
132. Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J. & Ploegh, H. L. Viral Subversion of the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 861–926 (2000).
133. Tseng, C.-T. K. & Klimpel, G. R. Binding of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Inhibits Natural Killer Cell Functions. *The Journal of Experimental Medicine* **195**, 43–50 (2002).
134. Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y. & Kumagai, K. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *The Journal of Immunology* **130**, 988–992 (1983).
135. Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E. & Gillis, S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* **291**, 335–338 (1981).
136. Granucci, F. *et al.* Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nature immunology* **2**, 882–888 (2001).
137. Yui, M. A., Sharp, L. L., Havran, W. L. & Rothenberg, E. V. Preferential Activation of an IL-2 Regulatory Sequence Transgene in TCR and NKT Cells: Subset-Specific Differences in IL-2 Regulation. *The Journal of Immunology* **172**, 4691–4699 (2004).
138. Malek, T. R. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 453–479 (2008).
139. Zeremski, M., Petrovic, L. M. & Talal, A. H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* **14**, 675–687 (2007).
140. Cruise, M. W. *et al.* Fas Ligand Is Responsible for CXCR3 Chemokine Induction in CD4+ T Cell-Dependent Liver Damage. *The Journal of Immunology* **176**, 6235–6244 (2006).
141. Norris, S. *et al.* Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* **28**, 84–90 (1998).
142. Freeman, A. J. *et al.* Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **34**, 809–816 (2001).
143. Freeman, A. J., Marinos, G., French, R. A. & Lloyd, A. R. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunology and cell biology* **79**, 515–536 (2001).
144. Heydtmann, M., Shields, P., McCaughan, G. & Adams, D. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Current opinion in infectious diseases* **14**, 279–287 (2001).
145. Apolinario, A. *et al.* Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol* **97**, 2861–2870 (2002).
146. Zeremski, M. *et al.* Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* **48**, 1440–1450 (2008).
147. Zeremski, M. *et al.* Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis* **200**, 1774–1780 (2009).
148. Harvey, C. E. *et al.* Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* **74**, 360–369 (2003).
149. Shields, P. L. *et al.* Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol* **163**, 6236–6243 (1999).

150. Murai, M. *et al.* Active participation of CCR5+ CD8+ T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Investigation* **104**, 49–57 (1999).
151. Helbig, K. J. *et al.* Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation. *Hepatology* **39**, 1220–1229 (2004).
152. Romero, A. I. *et al.* Interferon (IFN)- $\alpha$  Inducible Protein-10: Association with Histological Results, Viral Kinetics, and Outcome during Treatment with Pegylated IFN- $\alpha$  2a and Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases* **194**, 895–903 (2006).
153. Proost, P. *et al.* Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis, while preserving antiangiogenic properties. *Blood* **98**, 3554–3561 (2001).
154. Andrieu, T. *et al.* Similar increased serum dipeptidyl peptidase IV activity in chronic hepatitis C and other viral infections. *Journal of Clinical Virology* **27**, 59–68 (2003).
155. Casrouge, A. *et al.* Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* **121**, 308–317 (2011).
156. Farber, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* **61**, 246–257 (1997).
157. Qin, S. *et al.* The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *Journal of Clinical Investigation* **101**, 746 (1998).
158. Wald, O., Weiss, I. D., Galun, E. & Peled, A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* **39**, 50–62 (2007).
159. Asselah, T. *et al.* Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **129**, 2064–2075 (2005).
160. Bièche, I. *et al.* Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* **332**, 130–144 (2005).
161. Lohmann, V. *et al.* Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* **285**, 110–113 (1999).
162. Krieger, N., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *Journal of virology* **75**, 4614–4624 (2001).
163. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* **97**, 77 (1968).
164. Boyden, S. THE CHEMOTACTIC EFFECT OF MIXTURES OF ANTIBODY AND ANTIGEN ON POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES. *The Journal of Experimental Medicine* **115**, 453–466 (1962).
165. Haller, O. & Weber, F. Pathogenic Viruses: Smart Manipulators of the Interferon System. *Interferon: The 50th Anniversary* **316**, 315–334 (2007).
166. Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews* **214**, 56–72 (2006).
167. Freud, A. G. *et al.* Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 1033–1043 (2006).
168. Moroso, V. *et al.* Liver grafts contain a unique subset of natural killer cells that are transferred into the recipient after liver transplantation. *Liver Transpl* **16**, 895–908 (2010).

169. Jo, J. *et al.* Analysis of CD8+ T-Cell-Mediated Inhibition of Hepatitis C Virus Replication Using a Novel Immunological Model. *Gastroenterology* **136**, 1391–1401 (2009).
170. Denoed, J. & Moser, M. Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 195–203 (2011).
171. De Colvenaer, V. *et al.* Continuous CD27 triggering in vivo strongly reduces NK cell numbers. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1107–1117 (2010).
172. Doi, H. *et al.* Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-Positive B-cell population. *Hepatology* **55**, 709–719 (2012).
173. Moretta, L., Ferlazzo, G., Mingari, M. C., Melioli, G. & Moretta, A. Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine* **21**, Supplement 2, S38–S42 (2003).
174. Yu, J. *et al.* CD94 defines phenotypically and functionally distinct mouse NK cell subsets. *J. Immunol* **183**, 4968–4974 (2009).
175. Voss, S. D., Daley, J., Ritz, J. & Robertson, M. J. Participation of the CD94 Receptor Complex in Costimulation of Human Natural Killer Cells. *The Journal of Immunology* **160**, 1618–1626 (1998).
176. Grebely, J. *et al.* Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) levels during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* n/a–n/a (2013).doi:10.1002/hep.26263
177. Beinhardt, S. *et al.* Serum Level of IP-10 Increases Predictive Value of IL28B Polymorphisms for Spontaneous Clearance of Acute HCV Infection. *Gastroenterology* **142**, 78–85.e2 (2012).
178. Butera, D. *et al.* Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* **106**, 1175–1182 (2005).
179. Askarieh, G. *et al.* Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* **51**, 1523–1530 (2010).
180. Bataller, R., Paik, Y., Lindquist, J. N., Lemasters, J. J. & Brenner, D. A. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **126**, 529–540 (2004).
181. Coenen, M. *et al.* Hepatitis C virus core protein induces fibrogenic actions of hepatic stellate cells via toll-like receptor 2. *Lab Invest* **91**, 1375–1382 (2011).
182. Dolganiuc A, Oak S & Kodys K Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* **127**, 1513–1524 (2004).
183. Wasmuth, H. E. *et al.* Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology* **137**, 309–319. e3 (2009).
184. Sène, D. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS pathogens* **6**, e1001184 (2010).
185. Varchetta, S. *et al.* Prospective study of natural killer cell phenotype in recurrent hepatitis C virus infection following liver transplantation. *Journal of Hepatology* **50**, 314–322 (2009).
186. Lee, J.-C., Lee, K.-M., Kim, D.-W. & Heo, D. S. Elevated TGF- $\beta$ 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *The Journal of Immunology* **172**, 7335–7340 (2004).
187. Kanzler, S. *et al.* Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor  $\beta$ . *Journal of viral hepatitis* **8**, 430–437 (2001).

188. Dasgupta, S., Bhattacharya-Chatterjee, M., O'Malley, B. W. & Chatterjee, S. K. Inhibition of NK Cell Activity through TGF- $\beta$  1 by Down-Regulation of NKG2D in a Murine Model of Head and Neck Cancer. *The Journal of Immunology* **175**, 5541–5550 (2005).
189. CALABRESE, F. *et al.* Parenchymal transforming growth factor beta-1: Its type II receptor and Smad signaling pathway correlate with inflammation and fibrosis in chronic liver disease of viral etiology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **18**, 1302–1308 (2003).
190. de Lucas, S., Bartolomé, J. & Carreño, V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *Journal of Infectious Diseases* **191**, 93–99 (2005).
191. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* **17**, 189–220 (1999).
192. GOLDEN MASON, L. *et al.* Hepatic interleukin 15 (IL-15) expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development. *Clinical & Experimental Immunology* **138**, 94–101 (2004).
193. Giri, J. G. *et al.* Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *The EMBO journal* **13**, 2822 (1994).
194. Glässner, A. *et al.* Impaired CD4<sup>+</sup> T cell stimulation of NK cell anti-fibrotic activity may contribute to accelerated liver fibrosis progression in HIV/HCV patients. *Journal of Hepatology* **59**, 427–433 (2013).
195. Hintermann, E., Bayer, M., Pfeilschifter, J. M., Luster, A. D. & Christen, U. CXCL10 promotes liver fibrosis by prevention of NK cell mediated hepatic stellate cell inactivation. *Journal of Autoimmunity* **35**, 424–435 (2010).
196. Dustin, L. B. & Rice, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 71–99 (2007).
197. Nakaya, I. *et al.* Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis. *Nephron Experimental nephrology* **107**, e12–e21 (2007).
198. Jiang, D. *et al.* Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J. Clin. Invest* **114**, 291–299 (2004).

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	m	Milli, Meter
ADCC	<i>engl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>	$\mu$	Mikro
ALT	Alanin-Aminotransferase	MACS	Magnetische Zellsortierung ( <i>engl. magnetic activated cell sorter</i> )
APC	Allophycocyanin	MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
-SMA	<i>engl. -smooth muscle actin</i>	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; <i>engl. major histocompatibility complex</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase	min	Minute
BFA	Brefeldin A	MMP	Matrixmetalloproteinase
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl. bovine serum albumine</i> )	MSM	<i>engl. men who have sex with men</i>
bzw.	beziehungsweise	n	nano, Anzahl
Caspase	Cystein abhängige Aspartat-spezifische Protease	NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren ( <i>engl. natural cytotoxicity receptors</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>engl. complementary DNA</i> )	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
CD	<i>engl. cluster of differentiation</i>	n.s.	nicht signifikant
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor	NS	nicht-Struktur Protein
Da	Dalton	OD	optische Dichte
DMEM	<i>engl. Dulbecco's modified eagle's medium</i>	p	statistische Wahrscheinlichkeit
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBMC	<i>engl. peripheral blood mononuclear cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
ELISA	<i>engl. Enzyme-linked-Immunesorbent assay</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
engl.	englisch	PE	Phycoerythrin
<i>et al.</i>	und andere ( <i>lat. et aliter</i> )	PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
Fa.	Firma	PFA	Paraformaldehyd
FACS	<i>engl. fluorescence activated cell sorting</i>	PGN	Peptidoglykan
FasL	Fas-Ligand	pH	<i>lat. potentia Hydrogenii</i>
F <sub>c</sub>	konstante Region eines Immunglobulins	PHA	Phytohemagglutinin
FCS	fötale Kälberserum ( <i>engl. fetal calf serum</i> )	RBV	Ribavirin
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	RFI	relative Fluoreszenzintensität
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>engl. forward scatter</i> )	rh	rekombinant human
g	Gramm	RNA	<i>engl. ribonucleic acid</i>
		RT	Raumtemperatur
		s	Sekunde
		SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>engl. standard error of mean</i> )

## Anhang

GT	Glutamyl-Transferase	SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>engl. side scatter</i> )
h	Stunde	SVR	dauerhaftes virologisches Ansprechen ( <i>engl. sustained virological response</i> )
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie	Tab.	Tabelle
HBV	Hepatitis B Virus	TCR	<i>engl. T cell receptor</i>
	Hepatozelluläres Karzinom ( <i>engl. hepatocellular carcinoma</i> )	TGF	transformierender Wachstumsfaktor ( <i>engl. transforming growth factor</i> )
HCV	Hepatitis C Virus	TIMP	<i>engl. tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
HIV	humanes Immundefizienz Virus	TLR	<i>engl. toll-like receptor</i>
HLA	humanes Leukozyten-Antigen	TNF	Tumornekrosefaktor
HSC	hepatische Sternzellen	TRAIL	<i>engl. TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
IFN	Interferon	U	Unit(s), Einheit der Enzymaktivität
Ig	Immunglobulin	ULBP1-6	UL16 bindendes Protein 1-6
IL	Interleukin	z.B.	zum Beispiel
IU	internationale Einheiten ( <i>engl. international units</i> )	°C	Grad Celsius
K	kilo		
KIR	<i>engl. killer cell immunoglobulin like receptors</i>		
l	Liter		
LAMP-1	Lysosomen assoziiertes Membran-Protein-1		
LPS	Lipopolysaccharid		

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbstständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Köln, den 15.01.2014

Marianne Eisenhardt