

Inflammatorische Chemokine, die HCV-induziert
sezerniert werden, rekrutieren präferenziell
NKG2A-exprimierende CD8(+) T-Zellen

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

Roman Sherzada
aus Kabul/Afghanistan

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Nattermann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Knolle

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.07.2009

Medizinische Klinik und Poliklinik I
Direktor: Prof. Dr. T. Sauerbruch

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

Meinen Eltern & Schwestern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Das Hepatitis C Virus	8
1.1.1 Klinik und Verlauf der HCV Infektion	9
1.2 Virusinfektion und Immunantwort	9
1.3 T-Zellen	10
1.4 NK-Zellen	11
1.5 Chemokine	12
1.6 Chemokinrezeptoren	14
1.7 Fragestellung	18
2. Materialien	19
2.1 Reagenzien für die FACS-Analyse	19
2.2 Reagenzien für die Separation von peripheren Blutlymphozyten	20
2.3 Reagenzien für den Migrationsassay	20
2.4 Reagenzien für den CD107a-Zytotoxizitätsassay	20
2.5 Sonstige Materialien	20
2.6 Laborgeräte	21
2.7 Untersuchungsmaterial	22
3. Methoden	23
3.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-dichtegradientenzentrifugation	23
3.2 Zellzahlbestimmung	24
3.3 Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting)	26
3.4 NKG2A/NKG2C und CCR5/CCR7 Expression auf CD8(+) T-Zellen bzw. die NKG2- und Chemokinrezeptor Ko-Expression	29
3.4.1 Isolierung peripherer Lymphozyten mittels Lysis-Puffer	29
3.4.2 Auswertung bezüglich der phänotypischen Charakterisierung der CD8(+) T-Zellen	31
3.5 Migrationsassay	31
3.5.1 Gewinnung von HCV E2-Überständen für den Migrationsassay	31
3.5.1.1 Stimulationsexperimente mit rekombinantem HCV E2 Protein	32
3.5.2 Protokoll zum Migrationsassay gegen RANTES, HCV E2 stimulierten Überständen und CCL21	32
3.5.3 Auswertung der Migration	34
3.6 Zytotoxizitätsbestimmung anhand des CD107a-Assays	34
3.6.1 Auswertung der Zytotoxizität	36
3.7 Statistik	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Phänotypische Charakterisierung von Subpopulationen CD8(+) T-Zellen	37
4.1.1 Expression von NKG2-Rezeptoren auf CD8(+) T-Zellen	37
4.1.2 Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7	38
4.2 Untersuchung zur Ko-Expression von CC-Chemokin-Rezeptoren und NKG2-Rezeptoren auf CD8(+) T-Zellen	39
4.3 Empfänglichkeit CCR5(+) und CCR7(+) CD8(+) T-Zellen gegenüber einer Hemmung durch NKG2A	43
4.4 Migrationsverhalten NKG2A(+) und NKG2A(-) T-Lymphozyten gegenüber Chemokinen	45
5. Diskussion	48
6. Zusammenfassung	55

7. Literaturverzeichnis	56
8. Danksagung	61
9. Lebenslauf	62

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	engl. bovine serum albumine
cAMP	engl. cyclic adenosine monophosphate
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	engl. cluster of differentiation
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DC	engl. dendritic cell
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FCS	engl. fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl. forward light scatter
g	Erdbeschleunigung
HCV	Hepatitis C-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.v.	intra venös
LAMP	Lysosomen assoziiertes Membran Glycoprotein
MHC	engl. major histocompatibility complex
MI	Migrationsindex
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKR	NK-Zell-Rezeptor
PBMC	engl. peripheral blood mono-nucleated cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
RANTES	engl. regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RNA	engl. ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, dort wurde das Medium entwickelt
Tab.	Tabelle
TH	T-Helferzelle
TCR	T-Zellrezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs	versus
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus

Seit Mitte der siebziger Jahre ist aufgrund klinischer und epidemiologischer Beobachtungen bekannt, dass neben den beiden Hepatitiden A und B eine weitere Form der übertragbaren Hepatitis existieren muss. Diese parenteral, vor allem durch Bluttransfusionen, erworbene Erkrankung wurde zunächst als Posttransfusionshepatitis beziehungsweise als Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichnet (Dienstag et al., 1983).

Erst 1989 gelang es, aus dem Serum artifiziell infizierter Schimpansen mit Hilfe molekularbiologischer Techniken Virus-RNA zu isolieren (Choo et al., 1989). Es zeigte sich, dass 90% der Non-A-Non-B-Hepatitiden auf eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) zurückzuführen sind (Choo et al., 1990).

Anhand von Analysen der RNA-Genomsequenzen, erfolgte die Unterteilung der verschiedenen Isolate in Genotypen. Bisher sind 6 Genotypen mit unterschiedlicher geographischer Verteilung bekannt. Die Genotypen 1, 2 und 3 kommen weltweit vor. In Afrika und in Ägypten wird der Genotyp 4 gefunden. Die Genotypen 5 und 6 kommen überwiegend in Südafrika, Australien und Hongkong vor (Davidson et al., 1995; Heintges und Wands, 1997 Yoshioka et al., 1992).

Da das Virus erst 1989 entdeckt und ein Screening der Blutkonserven erst Anfang der 90er Jahre eingeführt werden konnte, ist ein Großteil der HCV-Infektionen bis zu diesem Zeitpunkt auf kontaminierte Blutprodukte zurückzuführen. Durch die Einführung der Untersuchung von Blutprodukten auf HCV-Kontamination 1990 sank die Zahl transfusionsassoziiierter HCV-Infektionen erheblich.

Den Hauptübertragungsweg stellt heute die Mehrfachanwendung von Spritzbesteck bei i.v.-Drogenabhängigen (das sogenannte "needle sharing") dar. Es wurden aber auch andere Infektionswege, wie häufig wechselnder Sexualkontakt, aber auch die Übertragung von Mutter auf das Kind beschrieben (Zeuzem et al., 1995).

Weltweit sind schätzungsweise 1% der Bevölkerung mit dem Hepatitis C Virus chronisch infiziert. Schätzungen für Europa gehen von 1,2 bis zu 5 Millionen HCV-positiven Personen aus. In der BRD liegt die Durchseuchung bei etwa 0,4%, daraus ergibt sich bezogen auf die Gesamtbevölkerung eine geschätzte Zahl von 320.000 infizierten Personen, zu denen jährlich 5000 Neuinfektionen hinzukommen (RKI, 2006).

1.1.1 Klinik und Verlauf der HCV Infektion

Etwa 75% der HCV-Infektionen verlaufen primär ohne Krankheitszeichen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 8 (2-26) Wochen kommt es temporär zu einem milden Anstieg der Transaminasen. Nur in 10-20% der Fälle wird ein ausgeprägter Anstieg der Leberenzyme oder ein Ikterus beobachtet. Ein Drittel der Patienten klagt in dieser Zeit über grippeartige Symptome. Fulminante Infektionsverläufe mit akutem Leberversagen sind äußerst selten.

In 50-70% der Infektionen geht die Hepatitis C jedoch in eine chronische Verlaufsform über, welche abgesehen von allgemeiner Abgeschlagenheit bis zum Auftreten von Komplikationen der Leberzellschädigung typischerweise asymptomatisch verläuft.

Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion haben ein signifikant erhöhtes Risiko eine Leberzirrhose oder ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (Hoofnagle et al., 1997; Kiyosawa et.al., 1995; Realdi et al., 1982; Zeuzem et al., 1995). So gilt die chronische Hepatitis C als Hauptursache für das hepatozelluläre Karzinom und stellt die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation dar (Montalbano und Neff, 2005).

Die Hepatitis C Infektionen stellen aufgrund ihrer relativen Häufigkeit, vor allem aber wegen ihres langen und chronischen Verlaufs, ein großes medizinisches und gesundheitliches Problem dar. Die Frage, warum das Virus so häufig lebenslang persistiert, ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeit und nur ansatzweise verstanden.

Zahlreiche Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Immunantwort und dem klinischen Verlauf der HCV Infektion.

1.2 Virusinfektion und Immunantwort

Das menschliche Immunsystem hat unterschiedliche Abwehrmechanismen gegen eindringende Pathogene wie Viren entwickelt. Üblicherweise unterscheidet man hierbei zwischen der so genannten angeborenen und der erworbenen Immunantwort. Die initiale, unspezifische Immunantwort wird durch das angeborene Immunsystem vermittelt, welches sowohl zelluläre (z.B. Natürliche Killerzellen (NK) und Makrophagen) als auch lösliche Bestandteile (Zytokine/Chemokine) umfasst. Die erworbene Immunantwort stellt den Antigen-spezifischen Arm des Immunsystems dar und besteht ebenfalls aus zellulären (B- und T-Zellen) und humoralen (Antikörper) Komponenten. Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass es zwischen diesen beiden Bestandteilen des Immunsystems ausgeprägte regulatorische Interaktionen gibt.

Trotz dieser vielfältigen und im allgemeinen sehr effizienten antiviralen Abwehrmechanismen,

gelingt es einigen Viren, der menschlichen Immunantwort zu entgehen, und so eine chronische Infektion zu etablieren. Hierzu zählt das Hepatitis C Virus (HCV), das aufgrund seiner hohen Prävalenz und seiner Humanpathogenität von besonderer Relevanz für den Menschen ist.

Die Mechanismen, über die dieses Virus dem Immunsystem entgeht, sind vielfältig und momentan nur unvollständig verstanden. Jedoch mehren sich die Hinweise, dass eine ineffektive Virus-spezifische CD8(+) T-Zell-Antwort für die Chronifizierung des Virus eine wichtige Rolle spielt.

1.3 T-Zellen

T-Zellen sind ein zentraler Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Hierbei werden CD4(+) T-Helferzellen, CD8(+) T-Suppressorzellen und zytotoxische CD8(+)T-Zellen (CTL) unterschieden. T-Lymphozyten können die Anwesenheit intrazellulärer Krankheitserreger erkennen, da infizierte Zellen den T-Zellen auf ihrer Oberfläche Peptidfragmente präsentieren, die aus den Proteinen der Krankheitserreger stammen. Zytotoxische CD8(+) T-Zellen erkennen hierbei Peptide von 9-11 Aminosäuren, die durch Proteasomen aus den ursprünglich viralen Proteinen geschnitten werden. Spezifische Transporter bringen diese Viruspeptide in der Bindung an Major Histocompatibility Complex (MHC)-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche. Die Erkennung dieser MHC I-Peptid-Komplexe durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) führt zur Aktivierung der CD8(+) T-Zellen mit anschließender Lyse der infizierten Zelle. Daher spielt dieser Zelltyp eine wichtige Rolle für die Elimination von Viren sowie für die Erkennung intrazellulärer Veränderungen.

Zytotoxische CD8(+) T-Zellen wirken durch die Freisetzung von zwei Klassen vorgeformter Zytotoxine. Die so genannten Granzyme vermitteln ihre Wirkung durch Induktion des programmierten Zelltods in der Zielzelle. Perforin ist ein zytolytisches Protein, das in die Zellmembran der Zielzelle eindringt und hier Poren bildet. Durch diese können anschließend die Granzyme in die Zielzelle gelangen und Apoptose induzieren. Diese lytischen Granula sind Membran-gebundene sekretorische Lysosomen, deren Membran Lysosomen assoziierte Membran Glycoproteine (LAMPs) enthält, darunter auch CD107a (LAMP-1). Diese sind normalerweise nicht an der Oberfläche der T-Lymphozyten exprimiert. Nach Aktivierung der CD8(+) T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor kommt es zu einer Fusion der granulären Membran mit der T-Zell-Membran und anschließender Sekretion des zytolytischen Inhaltes der Granula und somit zur CD107a-Expression auf den T-Zellen, welche durchflusszytometrisch als Marker für die

zytolytische Funktion gemessen werden kann.

In Bezug auf die Hepatitis C Infektion konnte gezeigt werden, dass eine inverse Korrelation zwischen dem Ausmaß der CTL-Antwort und der Viruslast vorhanden ist (Hiroishi et al., 1997; Nelson et al., 1997; Rehermann et al., 1996). Folglich scheinen CD8(+) T-Zellen prinzipiell in der Lage, die HCV-Infektion zu kontrollieren (Koziel et al., 1997). Trotzdem entwickelt die Mehrzahl der infizierten Patienten eine chronische Hepatitis C, was auf eine insuffiziente Immunantwort hinweist.

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass die Funktion von CD8(+) T-Zellen nicht nur durch den T-Zell-Rezeptor, sondern auch durch NK Zell-Rezeptoren reguliert wird.

1.4 NK-Zellrezeptoren

NK Zell-Rezeptoren (NKR) umfassen eine heterogene Gruppe oberflächenexprimierter Moleküle, welche spezifische Liganden auf der Oberfläche der Zielzelle binden. Man kann zwischen hemmenden und aktivierenden Rezeptoren unterscheiden. NK- und T-Zellen exprimieren sowohl aktivierende als auch hemmende NKR, wobei ihre Aktivität durch die Balance der hemmenden und aktivierenden Signale, die sie von der Zielzelle über NKR erhalten, bestimmt wird.

Wichtige Vertreter humaner NKR sind die CD94/NKG2 Rezeptoren, die „Natural Cytotoxicity“ Rezeptoren (NCR) sowie die „Killer-Immunglobulin-like“ Rezeptoren (KIR), wobei insbesondere die NKG2-Rezeptoren für die Regulation von T Zell-Funktionen relevant sind.

CD94/NKG2-Rezeptoren und deren Ligand HLA-E

In dieser Gruppe werden integrale NKG2-Membranglycoproteine zusammengefasst. Bis auf den NKG2D-Rezeptor, sind sie alle auf der Oberfläche als Heterodimere mit CD94, einem invarianten Typ II, Lectin-ähnlichen Polypeptid, exprimiert. CD94 besitzt keinen zytoplasmatischen Schwanz und kann daher keine Signale vermitteln, ist jedoch essentiell für die Oberflächenexpression der NKG2-Rezeptoren. Einige Rezeptoren besitzen aktivierende Eigenschaften (NKG2C, NKG2D), während anderen (NKG2A und B) eine hemmende Funktion zukommt.

In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische NKR NKG2A eine wichtige Rolle in der Regulation der CTL Funktion hat (Braud et al., 2003; Jabri et al., 2002; Moser et al., 2002). So konnten beispielsweise Speiser *et al.* bereits 1999 nachweisen, dass die

schwache zytolytische Aktivität NKG2A-positiver Melanom-spezifischer CTL durch die Blockade des CD94/NKG2A-Rezeptors aufgehoben werden konnte.

Die physiologische Bedeutung der NKG2A-Expression auf T-Zellen ist momentan nicht vollständig verstanden, jedoch wird vermutet, dass NKG2A für die Feineinstellung der CD8(+) T-Zell-Antwort von Bedeutung ist, indem dieser NKR die Schwelle für die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor hoch reguliert (Christopher et al., 2001; D'Andrea et al., 1998; Moser et al., 2002).

Der Ligand für CD94/NKG2A und NKG2C ist das nicht klassische MHC I-Molekül HLA-E (Borrego et al., 1998). HLA-E ist ein nicht-polymorphes MHC Klasse I Molekül, welches in den meisten humanen Zellen transkribiert wird (Ulbrecht et al., 1992, Wei und Orr, 1990). Die Expression von HLA-E an der Zelloberfläche ist abhängig von der Bindung spezifischer Peptide, welche üblicherweise aus der Signalsequenz klassischer MHC Klasse I Moleküle stammen. Diese Peptide werden nach ihrer Prozessierung im Zytosol freigesetzt und anschließend mittels eines „transporters-associated in antigen processing“ (TAP)-abhängigen Mechanismus in das Endoplasmatische Retikulum transportiert (Stevens et al., 2001; Ulbrecht et al., 1998). Hier binden sie an HLA-E. Dadurch wird der Komplex aus β -Mikroglobulin und HLA-E stabilisiert. Dieser wird dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

Interessanterweise konnten wir in Vorarbeiten nachweisen, dass die chronische Hepatitis C mit einer erhöhten intrahepatischen HLA-E Expression assoziiert ist. Als mögliche Erklärung hierfür konnten wir zeigen, dass das Hepatitis C Virus für ein Peptid (HCV-Core₃₅₋₄₄) kodiert, welches an HLA-E binden und dadurch die Expression von HLA-E stabilisieren kann (Nattermann et al., 2005).

1.5 Chemokine

Chemokine (chemotaktische Zytokine) haben eine wichtige Bedeutung für eine effektive Immunantwort, da durch sie die entsprechenden Zellen des Immunsystems an den Ort der Entzündung rekrutiert werden (Furie et al., 1995; Kunkel et al., 1995). Sie bilden eine Gruppe aus immunregulatorischen Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 8 und 12 kDa und enthalten vier konservative Cysteine, die zwei Disulfidbrücken bilden, wodurch sie eine hohe Stabilität erhalten. Der für die biologische Aktivität sehr wichtige N-Terminus ist kurz und flexibel, während der C-Terminus aus einer α -Helix besteht (Clare et al., 1995). Die mehr als 40 bekannten verschiedenen Chemokine werden aufgrund der Position ihrer konservierten Cysteine

in sogenannte CXC- (α -Chemokine), CC- (β -Chemokine), C- (γ -Chemokine) und CX3C- (δ -Chemokine) eingeteilt (Mackay et al., 1997; Prieschl et al., 1995).

Ein vier-Stufen-Modell beschreibt wie Lymphozyten durch Chemokine aus der Blutbahn heraus gelockt werden und in das entzündliche Gewebe migrieren: In einem ersten Schritt kommt es durch eine Selektin/Selektin-Ligand Interaktion zum Rollen der Lymphozyten entlang des Gefäßendothels, im zweiten Schritt gehen Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der Lymphozyten mit Chemokinen eine Bindung ein, die von dem Gefäßendothel präsentiert werden. Dies führt zur Aktivierung von Integrinen und zur Adhäsion der Lymphozyten an die Gefäßwand. Im letzten Schritt folgt die transendotheliale Migration der Zellen aus dem Gefäß in den perivaskulären Raum. Von dort aus migrieren die Zellen entlang eines Chemokinkonzentrationsgradienten in Richtung des entzündeten Gewebes (Baggiolini et al., 1998; Kambayashi et al., 2000)

Bei Patienten mit einem HCV-assoziierten Leberzellschaden findet sich eine erhöhte intrahepatische Sekretion verschiedener inflammatorischer Chemokine wie beispielsweise CCL5 (früher RANTES = regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) (Bonacchi et al., 2003; Kusano et al., 2000; Luther et al., 2001; Narumi et al., 1997; Shields et al., 1999). Inflammatorische Chemokine spielen bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten, Allergieantworten, Entzündungen oder Infektionen eine große Rolle. Ihre Expression wird durch pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1, Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interferon- γ induziert. Bezüglich der Hepatitis C konnten wir anhand von in vitro Experimenten zeigen, dass die Interaktion des HCV E2 Hüll-Proteins mit dem Tetraspanin CD81 zu einer vermehrten CCL5 Freisetzung führt und somit möglicherweise an der erhöhten intrahepatischen CCL5-Expression bei HCV-Patienten beteiligt ist. Im Gegensatz dazu hatte das HCV-Core Protein keinen Einfluss auf die CCL5-Sekretion (Nattermann et al., 2004). Wichtige weitere Mitglieder dieser Chemokinfamilie sind CCL2 und CCL3 (früher: MIP [macrophage inflammatory protein] - 1α und MIP- 1β). Über zelluläre Herkunft und Funktion dieser Chemokine gibt Tabelle 1.1 eine Übersicht.

Lymphatische Chemokine wie beispielsweise CCL21 (auch bekannt als SLC: Secondary lymphoid tissue chemokine oder Exodus 2) werden in verschiedenen Geweben lymphatischer Organe (von hochendothelialen Venolen in Lymphknoten und Peyerschen Plaques sowie von Stromazellen in den T-Zell-Zonen sekundärer lymphatischer Organe), aber auch von spezifischen Zellen außerhalb des lymphatischen Systems konstitutiv exprimiert und sind für die Organisation

spezialisierten Mikroumgebungen mitverantwortlich (Baggiolini und Dahinden, 1994; Baggiolini et al., 1997; Godessart und Kunkel, 2001).

CCL21 steuert während der chronischen HCV-Infektion die Rekrutierung CCR7-positiver Lymphozyten in die entzündete Leber und ist möglicherweise an der Aufstellung eines „tertiären lymphatischen Gewebes“ beteiligt (Kratz et al., 1996; Yoneyama et al., 2001). Chemokinen kommt somit eine zentrale Bedeutung bei der Orchestrierung und Kompartimentalisierung von Immunreaktionen zu.

Tabelle 1: Herkunft und Funktion wichtiger humaner CC-Chemokine

<i>Chemokin</i>	<i>Zelluläre Herkunft</i>	<i>Hauptsächliche Funktionen</i>
RANTES	T-Lymphozyten, Fibroblasten, Monozyten / Makrophagen, Mesangialzellen, verschiedene Zelllinien	Chemotaxis von T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen
MIP-1α	Lymphozyten, Fibroblasten, Monozyten / Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen	Chemotaxis von T-Zellen, Monozyten; hemmt Proliferation hämatopoetischer Stammzellen
MIP-1β	Lymphozyten, Fibroblasten, Monozyten / Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen, Tumorzell Linien	Chemotaxis von T-Zellen, Monozyten; hemmt Proliferation hämatopoetischer Stammzellen
Exodus2=CCL21	Lymphoides Gewebe, dendritische Zellen, Endothel, Hochendotheliale Venolen, Lymphkapillaren	Chemotaxis von z.B naiven T- Zellen in die unterschiedlichen lymphatischen Organe

1.6 Chemokinrezeptoren

Die einzelnen Chemokine werden von speziellen Rezeptoren, den so genannten Chemokinrezeptoren erkannt. Diese befinden sich an der Zelloberfläche und sind G-Protein (heterotrimeres GTP-bindendes Protein) gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die extrazelluläre Signale in das Zellinnere weiterleiten (Murphy et al.,

1994). Die Ligandenbindung an Chemokinrezeptoren bewirkt eine Inhibition der intrazellulären Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf die Beteiligung weiterer intrazellulärer Signaltransduktionswege. Aufgrund der Ligandenspezifität für die verschiedenen Chemokinfamilien können mehrere Chemokinrezeptorfamilien unterschieden werden: C, CC, CXC, CX3C Rezeptoren. Während die Rezeptorfamilien nur Liganden der entsprechenden Chemokinfamilien binden, bestehen innerhalb einer Rezeptorfamilie überlappende Ligandenspezifitäten. So binden etwa CC-Chemokine - mit Ausnahme von Eotaxin (Ligand nur für CCR3) und MIP1 β (Ligand nur für CCR5) - in der Regel an mehrere Chemokinrezeptoren. In Tabelle 1.2 sind die Ligandenspezifitäten der CC-Chemokinrezeptoren zusammengefasst.

In dieser Arbeit befassen wir uns mit den CC-Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7.

Der CCR7 Rezeptor wird hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert. Seine Funktion liegt im Wesentlichen darin, die gerichtete Migration hämatopoetischer Zellen in die lymphatischen Organe zu steuern und damit die Entwicklung der adaptiven Immunantwort zu koordinieren. Mit Hilfe des Rezeptors CCR7 wandern verschiedene Leukozyten-Populationen über die Blut- und Lymphbahn in lymphatische Organe ein.

CCR5 ist der Rezeptor für die Chemokine CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β und CCL5/RANTES. Er wird vor allem von Monozyten und TH1(T-Helferzellen)-Lymphozyten (Loetscher et al., 1998) nicht jedoch von TH2-Lymphozyten exprimiert. TH1/TH2-Zellen sind Subklassen von CD4-positiven T-Zellen und besitzen ein unterschiedliches Zytokinprofil. CCR5 spielt jedoch auch eine wichtige Rolle in der Rekrutierung CD8(+) T-Zellen.

Viele Studien haben nachgewiesen, dass dem CCR5-Rezeptor bezüglich infektiöser Erkrankungen vielfältige Funktionen in der Regulation der Immunantwort zukommen.

Tabelle 2: CC-Chemokinrezeptoren und deren Liganden

<i>Rezeptoren</i>	<i>Liganden</i>
CCR5	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β
CCR1	RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3
CCR7	Exodus2, MIP-3 β
CXCR3	IP10, Mig

Das CCR5-Gen ist von verschiedenen Mutationen betroffen. Hierzu zählt die CCR5 Δ 32 Mutation. Es handelt sich hierbei um eine Deletion von 32 Basenpaaren im offenen Leserahmen des Gens (CCR5 Δ 32). Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters, die zur Expression eines defekten Proteins führt, welches nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird. Auch die Heterozygotie für die CCR5 Δ 32 Mutation (CCR5 WT/ Δ 32), welche bei etwa 10%-20% einer kaukasischen Population vorkommt, führt zu einer signifikant reduzierten CCR5-Oberflächenexpression.

Interessanterweise konnte in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden, dass eine CCR5-Defizienz mit einer deutlich verstärkten T-Zell-Antwort assoziiert ist. So zeigten Versuche an Knockout-Mäusen, bei denen das CCR5-Gen künstlich ausgeschaltet wurde, dass diese Mäuse sich normal entwickelten, aber im Rahmen einer *Listeria monocytogenes* Infektion eine verstärkte Immunantwort auf einen T-Zell-abhängigen Antigenstimulus zeigten (Zhou et al., 1998). CCR5-defiziente Mäuse, die mit dem Mykobakterium-tuberculosis infiziert wurden, zeigten ebenfalls eine verstärkte T-Zell-Antwort (Algood et al., 2004).

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in Mausmodellen einer lymphozytischen Choriomeningitis Virus Infektion sowie bei verstärkten Immunantworten auf eine Melanom-spezifische DC (Dendritic Cell) basierte Impfung (Nansen et al., 2002).

Auch bei nicht-infektiösen Entzündungsreaktionen scheint CCR5 eine wichtige Rolle in der Regulation von T-Zell-Funktionen zu besitzen. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass CCR5 -/- Mäuse, bei denen eine T-Zell-vermittelte Autoimmunhepatitis induziert worden war, einen signifikant stärkeren Leberschaden aufwiesen, als dies in der Vergleichsgruppe mit CCR5 +/+ Mäusen der Fall war (Moreno et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei Mäusen mit einer Cerulin-induzierten akuten Pankreatitis. Auch hier fanden sich bei den CCR5-defizienten Tieren eine deutlich ausgeprägtere Organveränderung als bei den Wildtyp-Mäusen (Moreno et al., 2006).

In Bezug auf die HCV-Infektion konnte gezeigt werden, dass die CCR5 Δ 32 Mutation mit einer spontanen Elimination des Virus assoziiert ist. Zudem konnte hier nachgewiesen werden, dass bei Trägern der CCR5 Δ 32 Mutation die hepatische Entzündungsreaktion geringer ausgeprägt war als bei Personen, die eine Homozygotie für den Wild-Typ (CCR5 WT7WT) zeigten (Goulding et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei der Hepatitis B-Infektion. Auch hier war der Δ 32-Polymorphismus mit einer spontanen Ausheilung assoziiert (Thio et al., 2006).

Allerdings ist momentan noch nicht verstanden, wie CCR5 die zelluläre Immunantwort beeinflusst.

Hier können grundsätzlich zwei Mechanismen diskutiert werden. Zum einen ist vorstellbar, dass CCR5 selbst Signale vermittelt, die zu einer Änderung des Aktivierungsstatus der Immunantwort führen.

Zum anderen könnte CCR5 eine spezifische Subpopulation von CD8(+) T-Zellen definieren, die beispielsweise durch die Expression bestimmter NK Zell-Rezeptoren charakterisiert ist – und hierdurch spezifisch reguliert wird.

Dies wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Insbesondere wurde untersucht, ob es eine Ko-Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 mit den NK-Rezeptoren NKG2A bzw. NKG2C gibt und welche funktionelle Bedeutung dies hat.

1.7 Fragestellung

Das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem übt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort aus. Ob dabei das Zusammenspiel mit NK-Rezeptoren für die Regulation der T-Zell-Antwort von Bedeutung ist sollte anhand dieser Arbeit untersucht werden.

Im einzelnen sollten folgende 4 Punkte beantwortet werden:

1. Unterscheiden sich CD8(+) T-Zellen von Therapie-naiven HCV-Patienten, HCV(+) Patienten während einer antiviralen Therapie und einer gesunden Kontrollgruppe hinsichtlich der Expression der NK Zell-Rezeptoren NKG2A und NKG2C bzw. der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7?
2. Gibt es eine spezifische Ko-Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 bzw. CCR7 mit den NK-Zell-Rezeptoren NKG2A bzw. NKG2C? Unterscheiden sich diesbezüglich Lymphozyten von HCV(+) und HCV(-) Personen?
3. Welchen funktionellen Einfluss hat der NKG2A-Rezeptor auf die zytotoxische Aktivität CCR5(+)CD8(+) T-Zellen im Vergleich zu CCR7(+)CD8(+) T-Zellen? Unterscheiden sich diesbezüglich Lymphozyten von HCV(+) und HCV(-) Personen?
4. Unterscheiden sich NKG2A-positive und NKG2A-negative CD8(+) T-Zellen hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens in Richtung des inflammatorischen Chemokins CCL5 bzw. in Richtung des lymphatischen Chemokins CCL21? Unterscheiden sich diesbezüglich Lymphozyten von HCV(+) und HCV(-) Personen?

2 Material

2.1 Reagenzien für die FACS-Analyse

- Ampuwa Fa. Fresenius AG, Bad Homburg
- Lysis Puffer Fa. BD Biosciences, San Jose, CA
- Fixierlösung (CellFix) Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- PBS (pH 7,4) Apotheke des Universitätsklinikum Bonn
- Antikörper siehe Tabelle 2.1
(CD3-PerCP, CD8-APC, CCR5-FITC, CCR7-FITC, NKG2A-PE, NKG2C-PE)

Tabelle 3: Antikörper, die zur Darstellung der untersuchten Zelloberflächen-Antigene verwendet wurden

Antikörper	Firma	Typ	Ig-Subfrkt	Klon	Kat.Nr.	Verw. AK
CD3 PerCP	BD Biosciences	Monokl. Maus	IgG1	SK7	345766	I, II,
CD8 APC	BD Biosciences	Monokl. Maus	IgG1	SK1	345775	I, II, III
NKG2C PE	Beckmann Coulter Immunotech		IgG			I
NKG2A PE	Beckmann Coulter Immunotech		IgG			I, II, III
CCR5 FITC	BD Biosciences	Monokl. Maus	IgG2a	2D7	555992	I
CCR7 FITC	R&D Systems	Monokl. Maus	IgG2a	150503	FAB197F	I
Iso-PE	Beckmann Coulter Immunotech		IgG			O
Iso-FITC	R&D Systems		IgG			O

I : verwendeter Antikörper für Phänotyp. Facsanalyse

II: verwendeter Antikörper für den Migrationsassay

III: verwendeter Antikörper für den CD107a-Assay

O: Isotypenkontrolle

2.2 Reagenzien für die Separation von peripheren Blutlymphozyten

- Ficoll-Separationsmedium
(D = 1,077g/cm³) Fa. Biochrom, Berlin
- PBS (pH 7,4) Apotheke des Universitätsklinikum Bonn

2.3 Reagenzien für den Migrationsassay

- RPMI 1640 Medium Fa. Biochrom, Berlin od Pasching Austria
- CCL5 (rHu RANTES) Fa. PromoKine, Heidelberg
- FCS (Fetales Kälberserum) Fa. PAA Laboratories, Pasching, Austria
- CCL21 (rHu Exodus) Fa. PromoKine, Heidelberg
- PBS (pH 7,4) Apotheke des Universitätsklinikum Bonn
- Antikörper siehe Tabelle 2.1
- unmarkierte CD81 Antikörper Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- rekomb. HCV E2-Glykoprotein Genotyp1a Fa. Chiron, Emeryville, USA
- Carbonat-Puffer (pH 9,6) Fa. Merck, Darmstadt
15 mM Na₂CO₃ und 35 mM NaHCO₃ in Ampuwa lösen und sterilfiltrieren
(CD3-PerCP, CD8-APC, NKG2A-PE, NKG2C-PE)

2.4 Reagenzien für den CD107a -Zytotoxizitätsassay

- RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin Fa. PAA Laboratories, Pasching, Austria
- OKT3 Fa. Janssen-Cilag, Neuss
- NKG2A-PE Fa. Beckmann Coulter Immunotech, Paris
- CD107a-FITC Fa. BD Pharmingen, Heidelberg
- Monensin Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- PBS (pH 7,4) Apotheke des Universitätsklinikum Bonn
- Antikörper siehe Tabelle 2.1
- HCV-Core Überstände
(CD3-PerCP, CD8-APC)

2.5 Sonstige Materialien

- Polystyren-FACS-Röhrchen, 6 ml Fa. Falcon / Becton Dickinson, Heidelberg
- Einweg-Pipettenspitzen Fa. Biozym, Oldendorf

10µl, 100µl, 200µl, 1000µl

- Polypropylen-Röhrchen 15 und 50ml Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Einweg-Handschuhe, Satin plus Fa. SafeSkin, Californien
- Pasteurpipetten Fa. Brand, Wertheim
- Auslaufpipetten 5ml,10ml Fa. BD Biosciences
- Trypanblau Fa. Merck, Darmstadt
- Neubauer-Zählkammer improved Fa. Eich, Heidelberg
- Migrationsplatte Fa. ClemoTx, USA
- Desinfektionsmittel
- Eppendorf-Cups 2 ml Fa. Eppendorf, hamburg
- S-Monovette für heparinisiertes Blut, 10 ml Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Mikrotiterplatten 12 bis 96 well Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
- FCS (Fetales Kälberserum) Fa. Biochrom, Berlin
- Penicillin/Streptomycin Fa. PAA, Cölbe

2.6 Laborgeräte

- Zentrifuge GS-6KR Fa. Beckman, München
- Absauggerät
- Vortex Genie 2 Fa. Scientific Industries
- Brutschrank Modell 3111 Fa. Life Sciences Int., Frankfurt
- Kühlschrank Fa. Liebherr
- Sterilbank Gelaire Fa. Flow Laboratories, Meckenheim
- Durchflusszytometer FACSCalibur Fa. Becton Dickinson, San Jose, Californien
USA
mit CELL Quest Software
- Invers-Lichtmikroskop Typ DM IL Fa. Leica, Wetzlar
- Pipetten 10µl, 100µl, 200µl,
1000µl Fa. Eppendorf, Hamburg

2.7 Untersuchungsmaterial

Für die folgende Arbeit wurden jeweils 10 ml heparinisieretes Blut von 37 kaukasischen Patienten durch die Hepatologische Ambulanz der Medizinischen Klinik I zur Verfügung gestellt (Tab. 4).

Die Patienten wurden in drei Gruppen aufgeteilt: mit dem Hepatitis C Virus chronisch infizierte Patienten, die sich zu diesem Zeitpunkt unter keiner medizinischen Therapie befanden und als naiv bezeichnet werden. Desweiteren wurden Patienten während und nach einer antiviralen Therapie untersucht. Als Vergleichskollektiv diente eine Gruppe von 30 gesunden Kontrollen.

Die Studie entsprach den Ethik-Richtlinien der Deklaration von Helsinki und wurde ordnungsgemäß entsprechend dem Ethikantrag „Untersuchung der NK-Zell-Rezeptorexpression in der HCV-Infektion“ (Prof. Dr. U. Spengler, 027/05) durchgeführt.

Tabelle 4: Anzahl und klinische Daten von Patienten dieser Studie

	HCV RNA(+)	HCV RNA (-) ^{a)}	HCV RNA (-) ^{b)}	Kontrollgruppe
Anzahl	20	10	7	30
weiblich ^{c)}	11 (55%)	1 (10%)	3 (43%)	19 (63,3%)
Alter ^{d)}	47,1 (21 - 64)	42,5 (23 - 68)	46,9 (25 - 63)	24,4 (22 - 50)
Klin. Daten				
ALT U/L ^{d)}	89,2 (28 - 276)	46,1 (21 - 122)	50,3 (14 - 116)	n.a. ^{e)}
γ-GT ^{d)}	52,5 (13 - 287)	43,6 (16 - 69)	23,9 (16 - 38)	n.a.
Viruslast ^{d)} (x 10 ⁶ Kopien/ml)	4,5 (y - 23,4) ^{f)}	0,56 (0 - 4,2)	0,7 (0 - 3,7)	-

a) Patienten während Therapie

d) Mittelwert

b) Patienten nach Therapie

e) n.a. = nicht analysiert

c) Anzahl (Anzahl/Gesamtzahl in %)

f) y steht für < 200.000 Kopien/ml

3 Methoden

3.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden nach der von Böyum (Böyum, 1968) entwickelten Methode aus heparinisiertem Blut separiert.

Das synthetische Polysaccharid Ficoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemonomeren, die über Epichlorhydrin kreuzvernetzt sind. Die Ficoll-Lösung besteht aus 5,7 g Ficoll 400 und 9 g Natriumdiatrizoat auf 100 ml Wasser, woraus sich eine Dichte von 1,077 g/ml ergibt. Das Natriumdiatrizoat dient der Erhöhung der Dichte von Ficoll. Zusätzlich bewirkt Ficoll die Agglutination von Erythrozyten und Granulozyten und beschleunigt so deren Sedimentation.

Zur Fraktionierung von peripherem Blut wird das mit Medium verdünnte Blut vorsichtig auf eine Ficollschicht gegeben. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass sich die beiden Phasen während des Überschichtens nicht vermischen. Da die Dichte der Ficoll-Hypaque-Lösung größer ist als die der Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber geringer als die von Erythrozyten und der meisten Granulozyten, pelletieren letztere durch die anschließende Zentrifugation am Boden des Zentrifugenöhrchens. Lymphozyten und Monozyten können aufgrund ihres spezifischen Gewichts nicht in die Ficolltrennlösung eindringen. Sie bilden einen schmalen, milchigen Ring an der Grenzschicht zum Ficoll. Im Überstand sammeln sich Plasma, Thrombozyten und PBS. Auf die Bremse sollte verzichtet werden, da es beim Bremsvorgang zu einer Vermischung der vorher getrennten Phasen kommen kann. Die PBMC-Schicht wird vorsichtig abpipettiert, so dass möglichst kein Ficoll überführt wird, da es in gewissem Grade zytotoxisch wirkt (Abb. 1).

Die Separation der Lymphozyten erfolgt unter sterilen Bedingungen nach folgendem Protokoll:

- 9 ml antikoaguliertes Blut 1:1 mit PBS verdünnen
- 15 ml Ficoll in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen vorlegen
- vorsichtig mit verdünntem Blut überschichten
- Zentrifugieren (25 min, 2400 g, ohne Bremse, bei Raumtemperatur)
- PBMC-Ring (Interphase) vorsichtig mit einer Pipette abnehmen, in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit PBS auffüllen
- Zentrifugieren (10 min, 1350 g, low Bremse, bei Raumtemperatur)
- ist der Überstand noch stark getrübt, werden die Waschschrirte wiederholt
- Überstand abnehmen und Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium resuspendieren
- Bestimmung der Zellzahl

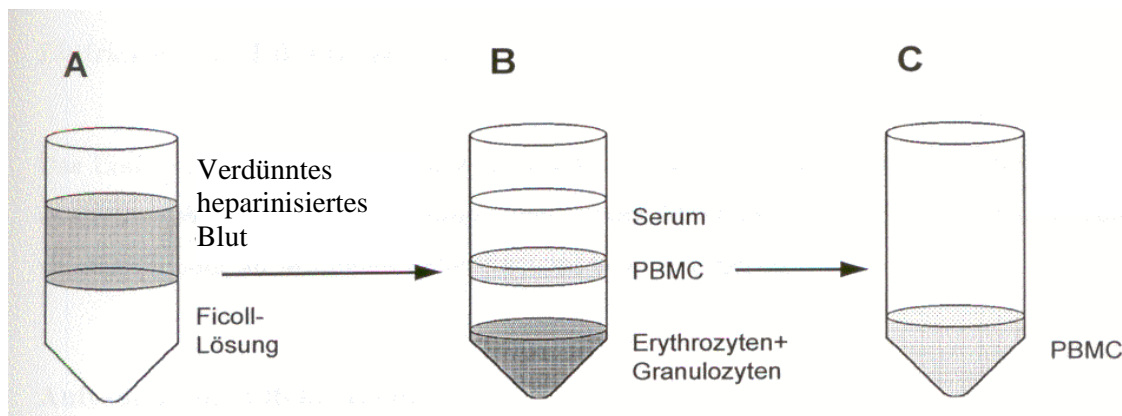


Abb. 1: Separation peripherer Blutlymphozyten mit Ficoll-Lösung

3.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl der aufgereinigten Lymphozyten wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Abb. 2). Der Boden einer Zählkammer ist mit jeweils zwei rechtwinkligen Zählnetzen versehen, die aus Linien in definierten Abständen bestehen. Durch das Aufbringen eines Deckglases auf zwei Stegen wird über der Bodenfläche ein Raum abgegrenzt, in dem die Zellen einer Suspension mikroskopisch ausgezählt werden können. Die Zählnetze sind unterhalb des Kammerbodens eingraviert und bestehen aus 4 Großquadraten mit allseitig dreifachen Begrenzungslinien (Abb. 3). Jedes dieser Großquadrate mit einer Seitenlänge von 1 mm ist zusätzlich in 16 Kleinquadrate mit einfachen Begrenzungslinien unterteilt. Ein Großquadrat hat

ein Volumen von 0,1µl. Das Volumen ergibt sich aus der Fläche von 1mm² und einer Tiefe von 0,1 mm.

Aus dem Volumen eines Großquadraten und dem Verdünnungsfaktor ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Zellkonzentration:

$$\text{Zellzahl in einem Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

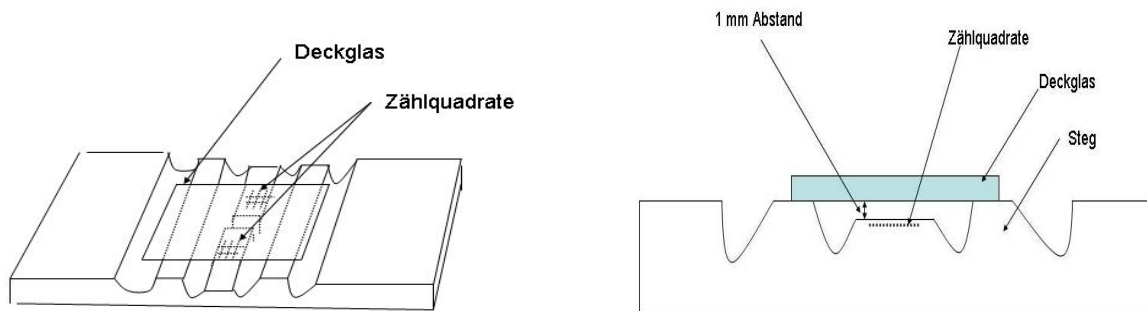


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer

Durchführung:

- 10 µl Zellsuspension 1:10 mit 0,25 %iger Trypanblau-Lösung verdünnen (markiert beschädigte / tote Zellen)
- Deckglas durch Anhauchen leicht befeuchten und vorsichtig auf die Stege der Zählkammer schieben
(es müssen Newtonsche-Ringe sichtbar werden)
- 1-2 Tropfen der verdünnten Zellsuspension an den Rand des Deckglases pipettieren
- Auszählen der lebenden Zellen eines Großquadrates im Lichtmikroskop
- Berechnen der Zellkonzentration mit oben genannter Formel

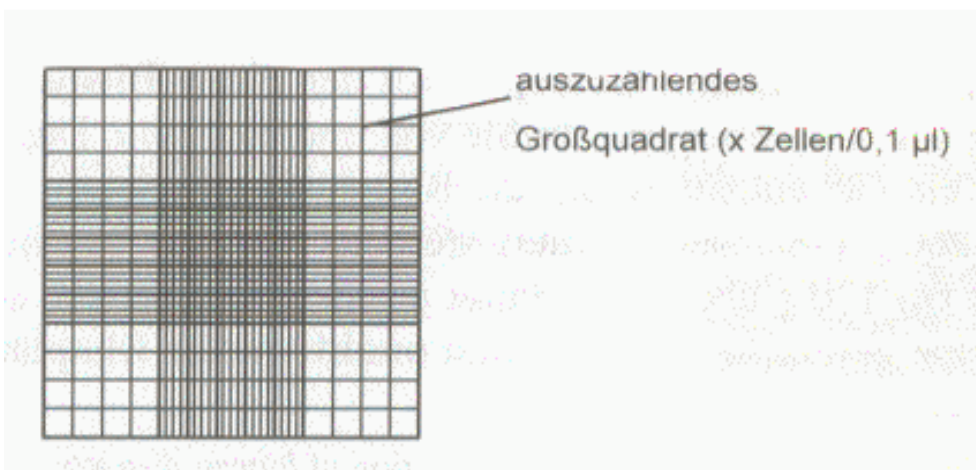


Abb. 3: Aufbau des Zählfeldes einer Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Lymphozytenzahl

Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 1% FCS und 5% Penicillin/Streptomycin-Zusatz aufgenommen (1Mio. Zellen /ml) und über Nacht in einer Mikrotiterplatte in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (10 min, 1350 g, low Bremse, bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml RPMI-Medium mit 10% FCS und 5% PenStrep resuspendiert und nach dem oben beschriebenen Verfahren erneut gezählt.

3.3 Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting)

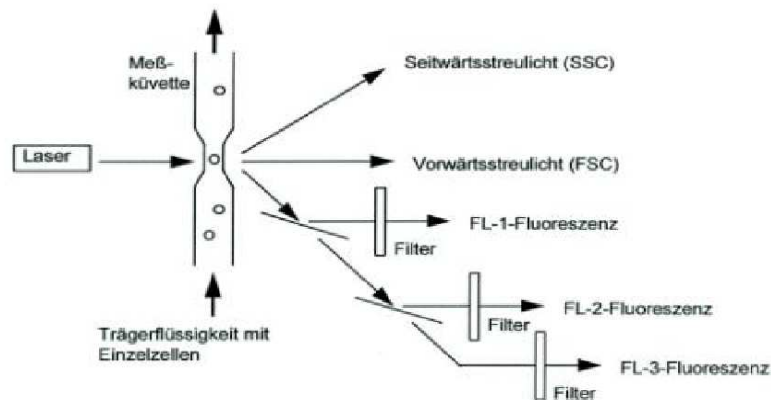
Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Messung unterschiedlicher Eigenschaften einzelner Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Jede Zelle interagiert dabei mit dem Laserlicht, was zu einer Streuung des Lichtes führt. Die Streuung wird durch verschiedene zellbiologische Parameter wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und Granularität beeinflusst. Darüber hinaus können Zelloberflächen-Antigene und intrazelluläre Strukturen durch Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Man unterscheidet dabei zwischen direkter und indirekter Fluoreszenzfärbung. Bei der direkten Fluoreszenzfärbung sind die spezifischen Antikörper direkt mit einem Fluorophor konjugiert, während bei der indirekten Immunfluoreszenz ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper an den ersten, spezifischen Antikörper bindet. Die mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen versetzte Zellsuspension wird aus dem Proberöhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette überführt. Durch die umgebende Trägerflüssigkeit werden die Zellen beschleunigt und zum Analysepunkt transportiert. Dieses Prinzip wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Als Lichtquelle dient ein luftgekühlter Argon-Ionenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Das von uns verwendete Durchflusszytometer Facscalibur ermöglicht die gleichzeitige Messung folgender optischer Parameter:

1. Vorwärtsstreulicht („forward light scatter“, FSC) entlang der Richtung des einfallenden Lichtes, welches ein Maß für die Größe der zu untersuchenden Zelle darstellt.
2. Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC), welches sich im rechten Winkel zum einfallenden Strahl ausbreitet und Aussagen über die intrazelluläre Granularität erlaubt.
3. Fluoreszenz, welche ebenfalls im Seitwärtsstreulicht erfasst wird und durch spezielle Spiegel und Filtersysteme in die verschiedenen Spektralbereiche zerlegt wird (siehe Abbildung 4a). Dies ermöglicht eine gleichzeitige Analyse von bis zu vier verschiedenen Zielantigenen.

Die Abbildung 4b zeigt die Bandbreite der Detektionskanäle FL1-FL4 und die Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE, APC und PerCP. Die optischen Signale werden mittels Photomultiplier und Photodioden in elektrische Signale umgewandelt, die dann mit Hilfe der Software Cell Quest Pro graphisch dargestellt und ausgewertet werden können.

Vor jeder Messung müssen die Geräteeinstellungen an die jeweils verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper angepasst werden. Dies geschieht mit Hilfe von sogenannten Isotypkontrollen, die nur aus dem konstanten Anteil des Antikörpers (Fc-Fragment) und dem jeweiligen Fluorophor bestehen. Es werden dabei die Messschwelle, die Fluoreszenzsignalverstärkung und die Kompensationseinstellungen festgelegt. Diese sind notwendig, um die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren. Dabei wird der jeweils in das benachbarte Spektrum reichende Farbanteil von dem ursprünglichen Signal subtrahiert.

a)



b)

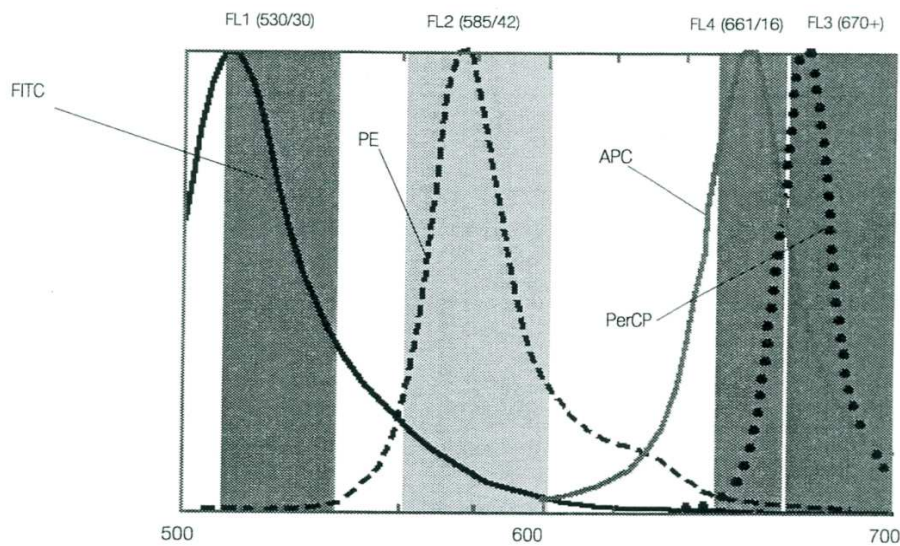


Abb. 4: Durchflusszytometrie

(nach BD Biosciences, Einführung in die Durchflusszytometrie, 2000)

- a. Arbeitsweise und Strahlengang
- b. Bandbreite der Detektionskanäle und Emissionsspektren der Fluorophore

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die NKG2- und die Chemokinrezeptorexpression sowie deren Ko-Expression auf CD8(+) T-Lymphozyten der verschiedenen Studiengruppen untersucht.

CD8(+) T-Lymphozyten wurden durch Fluorochrom-Antikörper (später aufgeführt) markiert und phänotypisch untersucht.

3.4 NKG2A/NKG2C und CCR5/CCR7 Expression auf CD8(+) T-Zellen bzw. die NKG2- und Chemokinrezeptor Ko-Expression

Aus den PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) der 3 Studiengruppen (HCV RNA(+) Patienten, HCV RNA(-) gesundes Vergleichskollektiv sowie Patienten unter einer pegylierten IFN/Ribavirin Therapie) wurde die Expression des hemmenden NKG2A- und des aktivierenden NKG2C-Rezeptors sowie die Expression der Chemokine CCR5 und CCR7 auf CD8(+) T Zellen in separaten Versuchen durchflusszytometrisch bestimmt. In einem darauffolgenden Schritt ist die Ko-Expression der NK-Rezeptoren mit den beiden Chemokinrezeptoren auf CD8(+) T-Zellen HCV-infizierten Patienten und gesunden Probanden untersucht worden.

3.4.1 Isolierung peripherer Lymphozyten mittels Lysis-Puffer

Die Separation der Lymphozyten erfolgte aus Vollblut-Analysen nach folgendem Protokoll:

- 9 ml Heparin Blut
- 5 FACS-Röhrchen (6 ml) mit jeweils 200 µl Blut füllen
- zu jedem FACS-Röhrchen jeweils 1800µl Lysis-Puffer hinzugeben (1:10 verdünnt)
- gut vortexen und 10 min unter der Sterilbank stehen lassen
- FACS-Röhrchen bis zum Rand mit PBS füllen und mischen
- Zentrifugieren (10 min, 1200 g, geringer Bremse, bei Raumtemperatur)
- Überstand verwerfen
- Sediment in 3 ml PBS resuspendieren
- Zentrifugieren (10 min, 1200g, low Bremse, bei Raumtemperatur)
- Überstand verwerfen

Die in 3.4.1 angefertigten 5 FACS-Röhrchen wurden für die separate Bestimmung des NKG2A- und NKG2C-Rezeptors sowie des CCR5 und CCR7 nach folgenden Schema weiter vorbereitet:

1. CD8/NKG2A
2. CD8/CCR5
3. CD8/CCR7
4. CD8/Isotypkontrolle-PE
5. CD8/Isotypkontrolle-FITC

Nun folgte die Zugabe der Antikörper:

Röhrchen 1 → jeweils 10µl antiCD3 PerCP, antiCD8 APC, antiNKG2A PE,

Röhrchen 2 → jeweils 10µl antiCD3PerCP, antiCD8 APC, antiCCR5-FITC

Röhrchen 3 → jeweils 10µl antiCD3 PerCP, antiCD8 APC, antiCCR7-FITC

Röhrchen 4 → jeweils 5µl antiCD3 PerCP, antiCD8 APC, anti Mouse IgG-Pe,

Röhrchen 5 → jeweils 5µl antiCD3 PerCP, antiCD8 APC, anti-Mouse IgG-FITC

(dasselbe in einem separaten Versuch mit antiNKG2C PE)

Ähnlich erfolgte die Bestimmung der Ko-Expression der NKG2-Rezeptoren und der Chemokinrezeptoren:

Die in 3.4.1 angefertigten FACS-Röhrchen beschriften:

1. CD8/CCR5
2. CD8/CCR7
3. CD8/Isotypkontrolle

Nun folgte die Zugabe der Antikörper:

Röhrchen 1 → jeweils 10µl antiCD3 PerCP, antiCD8 APC, antiNKG2A PE, antiCCR5-FITC

Röhrchen 2 → jeweils 10µl antiCD3PerCP, antiCD8 APC, antiNKG2A PE, antiCCR7-FITC

Röhrchen 3 → jeweils 5µl antiCD3 PerCP, antiCD8 APC, anti Mouse IgG-Pe, anti-Mouse IgG-FITC

(dasselbe in einem separaten Versuch mit antiNKG2C PE)

- 15 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
- in jeweils 2ml PBS waschen
- Zentrifugieren (10 min, 1200g, low Bremse, bei Raumtemperatur)
- Überstand abgießen
- Zellpellet in 200µl Fixierlösung (CellFix) resuspendieren
- bis zur FACS-Analyse bei 4°C aufbewahren

3.4.2 Auswertung bezüglich der phänotypischen Charakterisierung der CD8 T-Zellen

Nach Markieren der Oberflächenantigene mit den spezifischen Fluorochrom-Antikörpern wurde die oberflächliche Expression von Rezeptoren am FACS-Gerät gemessen. Dabei wurde der Rezeptorbesatz prozentual angegeben. Anhand dieser Prozentwerte wurden im GraphPad-Programm für jede Studiengruppe statistische Graphen erstellt.

3.5 Migrationsassay

Mit dem Migrationsassay ist es möglich die Migrationsfähigkeit von Zellen gegenüber bestimmten chemotaktischen Reizen nachzuweisen. Die Zahl der migrierten Zellen kann mit dem Durchflusszytometer bestimmt werden. Gleichzeitig kann von der migrierten Zellpopulation die Zahl derjenigen Zellen bestimmt werden, die den zu untersuchenden Rezeptor tragen. In diesem Ansatz migrierten PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) gegen CCL5 (=RANTES), HCV E2 stimulierten Lymphozytenüberständen und gegen CCL21.

Nach 4 stündiger Migrationszeit wurde sowohl die Anzahl aller migrierten Zellen als auch die Anzahl der NKG2A positiven migrierten Zellen innerhalb von einer Minute durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden CD8(+) T-Zellen zunächst durch Oberflächenmarker markiert und hervorgehoben.

3.5.1 Gewinnung von HCV E2-Überständen für den Migrationsassay

In diesem Versuch sollte die Migration der CD8(+) T-Zellen gegen HCV E2-Überstände beobachtet werden und mit der Migration gegen HCV-Core Überstände und unstimulierten Überständen verglichen werden. Dafür wurden zunächst Stimulationsexperimente mit CD81-spezifischen Antikörpern und mit rekombinantem HCV E2-Protein an PBMC durchgeführt. Die Bindung von HCV E2 führt in vivo zur Quervernetzung von CD81. Um diese Quervernetzung in vitro nachzuahmen, können auch auf Platten immobilisierte Antikörper bzw. immobilisiertes HCV E2-Protein verwendet werden. Für diesen Versuchsteil wurden T-Zellen mit immobilisierten CD81-spezifischen Antikörpern über Nacht stimuliert und anschließend funktionell bzw. phänotypisch charakterisiert. Das Immobilisieren der CD81-spezifischen Antikörper erfolgte mit Hilfe eines Carbonatpuffers nach dem Protokoll von Wack (Wack et al., 2001).

Durchführung:

- je 100 µl CD81-spezifische Antikörper (5 µg/ml) in Carbonatpuffer (pH 9,6) in eine 96 Well-Platte pipettieren
- Inkubation über Nacht bei 4 °C
- 2x mit 200 µl PBS waschen
- Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch Zugabe von 200 µl FCS
- Inkubation 30 Minuten bei 37 °C
- Waschen mit 200 µl PBS
- jeweils 1 x 10⁵ PBMC Zellen in 200 µl RPMI zupipettieren
- über Nacht Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂
- Analyse der Zellen (siehe unten)

3.5.1.1 Stimulationsexperimente mit rekombinantem HCV E2-Protein

Bei folgendem Versuchsteil wurden jeweils 1 x 10⁵ T-Zellen von gesunden, HCV-negativen Spendern mit immobilisiertem rekombinantem HCV E2-Protein stimuliert. Dazu wurden in einem ersten Schritt HCV E2-spezifische Antikörper in einer 96 Well-Platte immobilisiert und anschließend für 1 h bei 37 °C mit HCV E2-Protein (10 µg) beschichtet. Die Stimulation erfolgte wie unter Kapitel 3.4.4 über Nacht im Brutschrank. Für die Gewinnung der HCV E2-Überstände wurde die Platte zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Der Migrationsversuch erfolgte wie in 3.4.3 beschrieben.

(Gewinnung von HCV-Core-Überständen analog)

3.5.2 Protokoll zum Migrationsassay gegen CCL5, HCV E2 stimulierten Überständen und CCL21

Die Migration erfolgt in einer 5 µm Nitrocellulose-Platte. Je nach Anzahl der verwendeten wells und der Zellmenge, wurden die Zellen in einem bestimmten Volumen RPMI-Medium aufgenommen (hier: ca. 800000 Zellen/30µl Zellsuspension/well). Diese wurden im oberen Kompartiment der Migratonsplatte aufgetragen.

Die Zellen migrierten gegen eine Chemokinlösung mit einer Konzentration von 25ng / 300µl PBS.

In 6 wells fand die Migration gegen Chemokin statt. Als Leerwert diente die Migration gegen PBS.

Das folgende Protokoll beschreibt die Migration am Beispiel eines der oben aufgeführten Chemokine:

- 1 ml Zellsuspension nach Zellzahlbestimmung zentrifugieren (10 min, 1350 g, low Bremse, bei Raumtemperatur)
- Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig absaugen
- Zellen in (12x30) 360 µl RPMI-Medium mit 10% FCS und 5% PenStrep resuspendieren
- in einem FACS-Röhrchen PBS mit rHu RANTES so verdünnen, dass eine Konzentration von 150 ng / 1800 µl (RANTES / PBS) vorliegt
- jeweils 300 µl dieser Lösung in 6 wells der Migrationsplatte pipettieren (es müssen kleine Tropfen entstehen, sodass die Migrationsmembran fest anhaften kann)
- Migrationsmembran anbringen
- pro well 30 µl Zellsuspension auf die Membran pipettieren
- Deckel auflegen und Migrationsplatte für 4h in den Brutschrank(4°C) stellen
- nach 4h Migrationsplatte zentrifugieren (10 min, 1350 g, low Bremse, bei Raumtemperatur)
- Überstand vorsichtig abpipettieren und verwerfen
- 1 Eppendorfer-Reaktionsgefäße mit CD8 beschriften und einen Antikörper Mastermix herstellen: jeweils (6 x 5 µl) 30 µl antiNKG2A-PE, antiCD3-PerCP und antiCD8-APC in 240 µl PBS verdünnen
- CD8er well-Reihe mit je 55µl Mastermixlösung aus dem CD8-Eppendorfergefäß resuspendieren
- Inkubation 15 min im Dunkeln
- Wells mit PBS auffüllen
- Zentrifugieren (10 min, 1350 g, low Bremse, bei Raumtemperatur)
- Überstand abpipettieren
- Wells mit 200µl PBS resuspendieren und in FACS-Rörchen überführen
- Zahl der migrierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmen.

3.5.3 Auswertung der Migration

Die Bestimmung der gewanderten Zellen erfolgte nach Markierung der Zellen am FACS-Gerät. Die Zellzahl wurde innerhalb einer Minute bestimmt. Die graphische Darstellung ergab sich aus dem Quotienten der gewanderten Zellen gegen Chemokin und der gewanderten Zellen gegen dem Medium-Ansatz ohne Chemokin. Für jedes Experiment wurden drei Migrationsindices angegeben:

1. alle gewanderten Zellen gegen Chemokin / alle gewanderten Zellen gegen Medium-Ansatz ohne Chemokin
2. NKG2A(+) gewanderte Zellen gegen Chemokin / NKG2A(+) gewanderten Zellen im Medium-Ansatz ohne Chemokin
3. NKG2A(-) gewanderte Zellen gegen Chemokin / NKG2A(-) gewanderte Zellen Im Medium-Ansatz ohne Chemokin

Alle Experimente erfolgten mindestens im Dreifach-Ansatz.

3.6 Zytotoxizitätsbestimmung anhand des CD107a-Assays

Nachdem die Zellen gegen Chemokin und PBS gewandert sind, wurde ihre zytotoxische/funktionelle Aktivität mit Hilfe des CD107a-Assays untersucht.

Zytotoxische CD8(+) T-Lymphozyten vermitteln die Lyse ihrer Zielzellen unter anderem über den zytotoxischen Inhalt ihrer Granula (Perforin, Granzym). Diese lytischen Granula besitzen eine Lipiddoppelschicht in der verschiedene Glycoproteine verankert sind (LAMP=lysosomal associated membrane glycoproteins), darunter auch das CD107a-Glycoprotein (LAMP-1). Die Sekretion erfolgt durch Bindung der granulären Membran an die zelluläre Membran. Dadurch erscheint das CD107a-Protein auf der Oberfläche der Effektorzelle. Ohne Antigenpräsentation und anschließende CD8 T-Zell Aktivierung kommen diese Proteine auf der Oberfläche von T-Zellen normalerweise nicht vor. Mit Hilfe dieses Assays kann die Expression des granulären Membranproteins CD107a auf der Oberfläche von CD8-Zellen durchflusszytometrisch gemessen werden und damit die zytotoxische Aktivität bestimmt werden.

Die zytotoxische Aktivität gewanderter Zellen wurde nach dem folgenden Protokoll bestimmt:

Die folgenden Versuchsschritte wurden in den vorherigen Protokollen ausführlich beschrieben:

- PBMCs wurden aus 30 ml heparinisertem Blut über Ficolllichtegradientenzentrifugation gewonnen
- die Zellen migrierten 4h gegen RANTES (10 wells) und PBS (10 wells). In 4 wells befanden sich Zellen, die nicht migrierten
- nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen im RPMI 1640-Medium + 1% FCS über Nacht im Brutschrank bei 37°C gelagert (1Mio. Zellen/ml Medium)

Protokoll zum CD107a-Assay:

In drei Ansätzen wurden 100000 Zellen in 150 µl RPMI 1640 Medium ohne FCS aufgenommen. Im ersten Ansatz wurden CD8 T-Lymphozyten durch die stimulatorische Wirkung von antiCD3 aktiviert. In einem zweiten Ansatz sollte diese stimulierende Wirkung durch die hemmende Wirkung von antiNKG2A vermindert werden. Der dritte Ansatz war eine Negativkontrolle und sollte dazu dienen eine mögliche CD107a-Spontanexpression zu untersuchen. Um eine vorzeitige Rezirkulation der Granula zurück in das Cytoplasma zu verhindern, wurde nach 1h Monensin (Golgistop) hinzugegeben. Nach weiteren 4h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen antiCD8 markiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der CD107a-Expression.

- Zellen aus dem Brutschrank entnehmen, gut mischen und Zellzahl bestimmen
- Zellen in RPMI 1640-Medium ohne FCS so verdünnen, dass 100000 Zellen in 150µl Volumen vorkommen
- in einer 96er well Flachbodenplatte jeweils drei Ansätze für die gewanderten Zellen und die Zellen ohne Migration vorbereiten, hier am Beispiel der gegen RANTES gewanderten Zellen dargestellt:
 1. Well→ 100000 Zellen/150 µl + 1 µl OKT3 + 5 µl anti CD107a
Hier werden die Zellen durch anti CD3 positiv stimuliert
 2. Well→ 100000 Zellen/150 µl + 1 µl OKT3 + 5 µl anti CD107a-FITC + 8 µl anti NKG2A-PE
Hier wird die stimulatorische Wirkung von OKT3 durch die inhibitorische Wirkung von antiNKG2A vermindert
 3. Well→ 100000 Zellen/150 µl + 5 µl antiCD107a-FITC
Dies dient der Negativkontrolle

Dasselbe wird für die Migration gegen PBS und dem Ansatz ohne Migration vorbereitet

- Zellen bei 37°C in den Brutschrank stellen
- nach 1h 1 µl Monensin in allen wells hinzupipettieren
- wieder 4h bei 37°C in den Brutschrank stellen
- Zellen aus dem Brutschrank entnehmen und in allen wells jeweils 5 µl anti CD8-APC und anti CD3-PerCP hinzupipettieren
- 15 min im Dunkeln inkubieren
- Überall 200 µl PBS hinzugeben
- Zentrifugieren (10 min, 1350g, low Bremse, bei Raumtemperatur)
- Überstand abpipettieren
- Zellen in 230 µl PBS resuspendieren und in vorbeschriftete FACS-Röhrchen überführen
- durchflusszytometrisch die CD107a-Expression auf CD8 T-Lymphozyten und auf NKG2A+ CD8 Zellen bestimmen

Zudem erfolgte die Bestimmung der HCV-spezifischen zytolytischen Aktivität der CD8(+) T-Zellen nach Hinzugabe von HCV-Core Protein. Protokoll siehe Gewinnung von HCV E2-Überständen im Migrationsteil (Kapitel 3.5.1).

3.6.1 Auswertung der Zytotoxizität

Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität ergab sich aus dem während der durchflusszytometrischen Messung angegebenen prozentualen Anteile der CD107a positiven Zellen verglichen in drei Ansätzen :

- 1) positiv Stimulation
- 2) positiv + negativ Stimulation
- 3) keine Stimulation

3.7 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 2.01. In dieser Arbeit wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die mit der Software erstellten Balkendiagramme zeigen jeweils Mittelwert und Standardfehler. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypische Charakterisierung von Subpopulationen CD8(+) T-Lymphozyten

4.1.1 Expression von NKG2-Rezeptoren auf CD8(+) T Zellen

Die Expression des inhibitorischen NK-Zellrezeptors NKG2A auf CD3(+)/CD8(+) T-Lymphozyten des peripheren Blutes wurde durchflusszytometrisch bei HCV RNA(+) Patienten mit chronischer Infektion (n=15), HCV-Patienten während einer Therapie mit pegyliertem IFN/Ribavirin (n=7) sowie bei einer HCV(-) gesunden Kontrollgruppe (n=20) untersucht (Abb. 5).

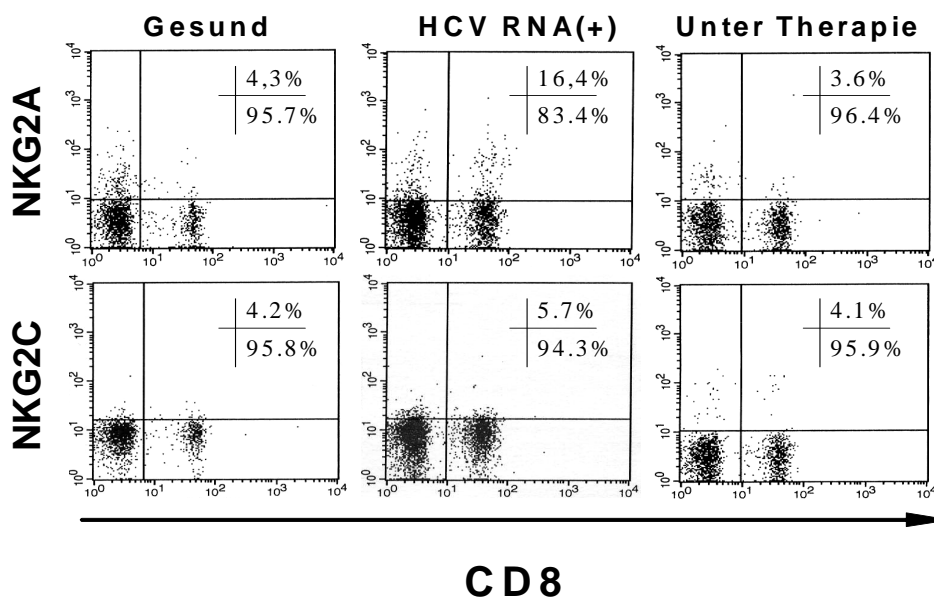


Abb. 5: Beispielhafte Darstellung durchflusszytometrischer Analysen der NKG2-Expression auf CD3(+)/CD8(+) T-Zellen

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors sowie des aktivierenden NKG2C-Rezeptors auf CD8(+) T-Lymphozyten bestimmt. Untersucht wurden hierbei Zellen bei einer HCV(-) gesunden Kontrollgruppe, HCV RNA(+) Patienten mit chronischer Infektion sowie HCV-Patienten während einer Therapie mit pegIFN/Ribavirin.

Wie in Abb.6 dargestellt, zeigte sich hierbei eine signifikant erhöhte NKG2A-Expression auf T-Zellen unbehandelter HCV(+) Patienten (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes: 6.9% \pm 1.1%) im Vergleich zu den Zellen der gesunden Kontrollen (4.2% \pm 0.5%, $p=0,0170$) sowie auch im Vergleich zu den T-Zellen der Patienten während einer antiviralen Therapie (3,3% \pm 0,3%,

p=0,0444).

Demgegenüber ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der NKG2C-Expression zwischen HCV RNA(+) Patienten und der gesunden Kontrollgruppe nachweisen (5,3% ± 1,2% vs. 6,0% ± 0,8%, p>0.05). CD8(+) T-Zellen von Patienten unter einer Therapie zeigten eine signifikant geringere NKG2C-Expression als die der HCV RNA(+) Patienten (p=0,037) und der gesunden Kontrollgruppe (p=0,001) (Abb. 6).

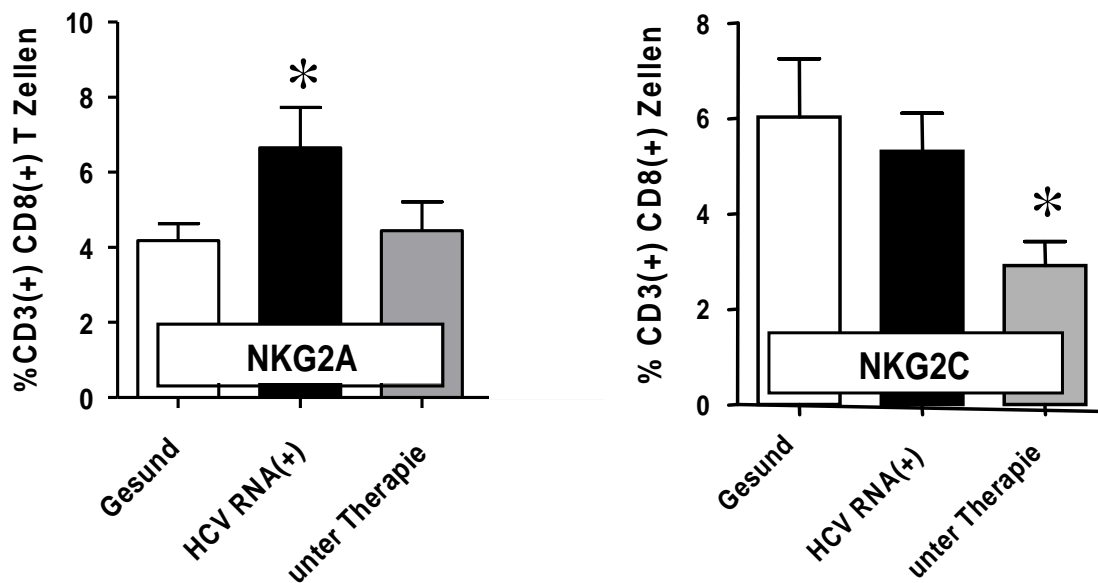


Abb. 6: NKG2-Expression auf CD8 Zellen

Die Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors (linkes Säulendiagramm) sowie des aktivierenden NKG2C-Rezeptors (rechtes Säulendiagramm) auf CD8(+) T-Lymphozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden hierbei Zellen bei einer HCV(-) gesunden Kontrollgruppe (weiße Säule), HCV RNA(+) Patienten mit chronischer Infektion (schwarze Säulen) sowie HCV-Patienten während einer Therapie mit pegIFN/Ribavirin (graue Säule).

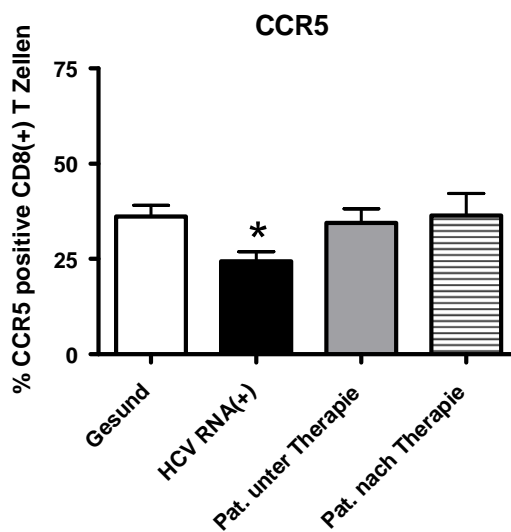
Die Säulen geben den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an. * p < 0.05 vs. gesunde Kontrollgruppe.

4.1.2 Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7

Die durchflusszytometrische Untersuchung der CCR5-Expression ergab, dass bei HCV RNA(+) Patienten (n=16) ein signifikant niedriger Anteil CCR5-positiver CD8(+) T-Zellen nachweisbar war als bei dem gesunden Vergleichskollektiv (n=20) (24,4% ± 2,5% vs. 36,2% ± 3,0%, p=0,0432). HCV-Patienten während einer Therapie mit pegyliertem IFN/Ribavirin (n=10) und die erfolgreich therapierte Patientengruppe (n=10) zeigten vergleichbare Werte wie die HCV RNA(-) Gesunden (34,5% ± 3,7% und 36,4% ± 5,8%) (Abb. 7a). Zudem erfolgte die

durchflusszytometrische Bestimmung der CCR7-Expression bei 20 HCV RNA(+) Patienten, 25 RNA(-) Gesunden, 10 Patienten unter Therapie und weiteren 10 Patienten nach erfolgreicher Therapie. Diese Untersuchung zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den HCV RNA (+) Patienten und den anderen Studiengruppen (HCV $40,6\% \pm 4,6\%$ vs. Gesund $45,3\% \pm 3,3\%$, $p=0,287$; vs. unter Therapie $38,7\% \pm 4,2\%$, $p=0,912$; vs. nach Therapie $35,4\% \pm 5,0\%$, $p=0,552$) (Abb. 7b).

a)



b)

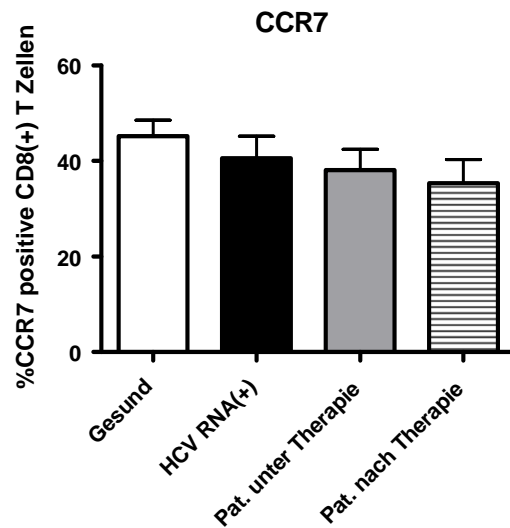


Abb. 7: Chemokinrezeptorexpression auf CD8(+) T Zellen

Die Bestimmung der Expression von CCR5 (a) und CCR7 (b) erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Untersucht wurden hierbei Zellen von HCV RNA(+) Patienten mit chronischer Infektion (schwarze Säulen), HCV-Patienten während einer Therapie mit pegIFN/Ribavirin (graue Säulen), erfolgreich therapierten Patienten (waagrecht gestrichelte Säulen) sowie bei einer HCV(-) gesunden Kontrollgruppe (weiße Säulen).

Die Säulen geben den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an. * $p < 0,05$ vs. gesunde Kontrollgruppe.

4.2 Untersuchungen zur Ko-Expression von CC-Chemokin-Rezeptoren und NKG2-Rezeptoren auf CD8(+) T-Zellen

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen analysierten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression der NK-Zellrezeptoren NKG2A bzw. NKG2C und der Expression der CC-Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CCR7 (Abb. 8) in den vier Studiengruppen.

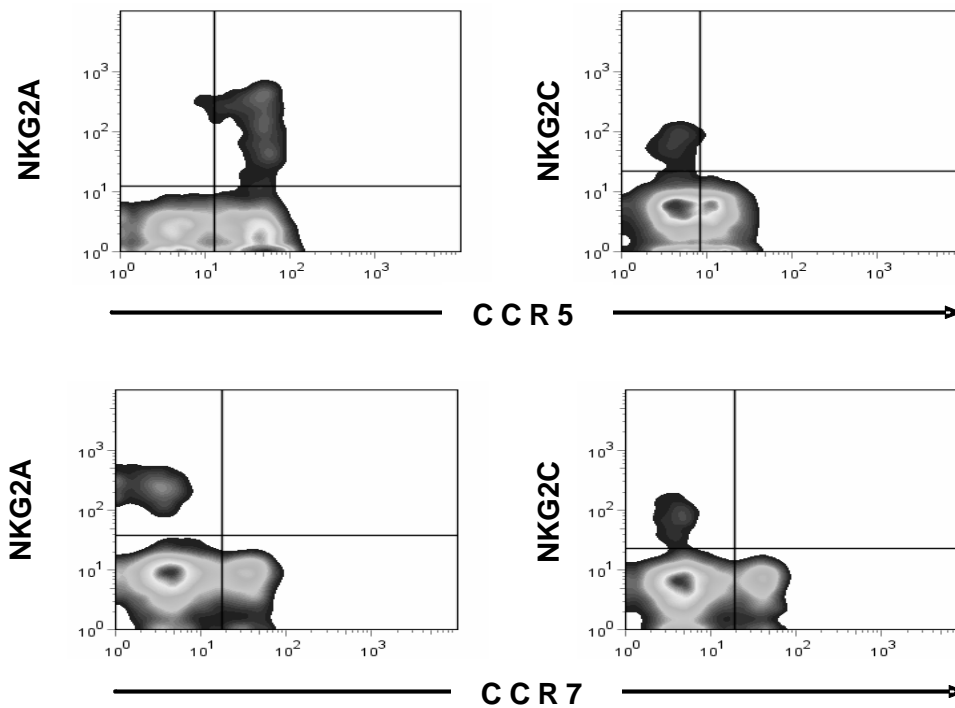


Abb. 8: Analyse der Ko-Expression der NK Zell-Rezeptoren NKG2A/NKG2C und der CC-Chemokin-Rezeptorn CCR5 und CCR7 auf CD8(+) T Zellen

Die „dot blots“ zeigen beispielhaft die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression des hemmenden NKG2A- und des aktivierenden NKG2C-Rezeptors im Verhältnis zur Expression von CCR5 (obere Graphik) bzw. CCR7 (untere Graphik) auf CD8(+) T-Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab in der Gruppe der HCV RNA(+) Patienten eine signifikant höhere NKG2A-Expression auf CCR5-positiven CD8(+) T-Zellen als auf CCR5-negativen T-Zellen ($8,4\% \pm 1,4\%$ vs. $3,7\% \pm 0,8\%$; $p=0,0007$). Vergleichbare Unterschiede waren auch bei den gesunden Kontrollen ($13\% \pm 1,7\%$ vs. $4,7\% \pm 0,8\%$; $p<0,0001$), den Patienten unter Therapie ($10,9\% \pm 2,6\%$ vs. $3,7\% \pm 1,7\%$; $p=0,0046$) sowie den Patienten nach Behandlung ($6,4\% \pm 1,2\%$ vs. $2,4\% \pm 1,3\%$; $p<0,0001$) nachweisbar (Abb. 9).

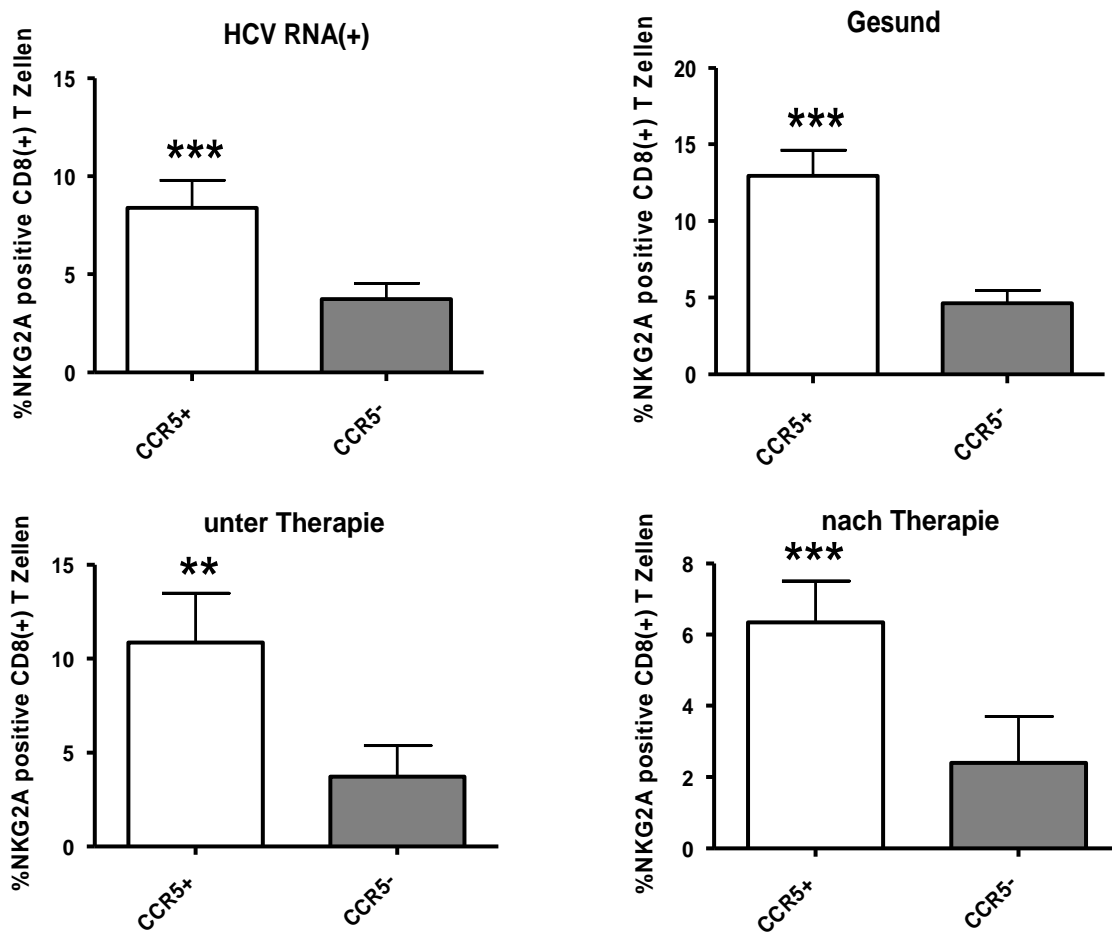


Abb. 9: Expression des NKG2A-Rezeptors auf CCR5 exprimierenden CD8(+) T Zellen

Die Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors auf CCR5 positiven (weiße Säulen) und CCR5 negativen (graue Säulen) CD8(+) T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei wurden CCR5-exprimierende CD8(+) T Zellen bei HCV RNA(+) Patienten (Säulendiagramm oben links), bei einer HCV RNA(-) gesunden Kontrollgruppe (Säulendiagramm oben rechts), bei Patienten während einer pegIFN/Ribavirin Therapie (Säulendiagramm unten links) und bei Patienten nach erfolgreicher Behandlung (Säulendiagramm unten rechts) untersucht. ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs. CCR5(-) T-Zellen

Die Analyse der NKG2A-Expression auf CCR7-exprimierenden T-Zellen zeigte, dass es hier einen markanten Unterschied zu den CCR5-exprimierenden Zellen gibt. Im Gegensatz zu CCR5(+) T-Zellen war auf CCR7(+) T-Zellen der hemmende NKG2A-Rezeptor nur gering exprimiert. Dagegen fand sich auf CCR7(-) T-Zellen eine hohe Expression (Abb. 10). Die Expression von NKG2A auf CCR7(+) und CCR7(-) CD8(+) T-Zellen unterschied sich hierbei signifikant in der Gruppe der HCV RNA(+) ($1,9\% \pm 0,7\%$ vs. $6,4\% \pm 1,2\%$, $p < 0,0001$), der Gesunden ($1,6\% \pm 0,3\%$ vs. $12,9\% \pm 2,0\%$, $p < 0,0001$), der Patienten unter Therapie ($0,9\% \pm 0,2\%$ vs. $5,8\% \pm 1,4\%$, $p = 0,0005$) und der Patienten nach einer erfolgreichen Therapie ($1,2\% \pm$

0,1% vs. 8,7% ± 3,6%, p<0,0001).

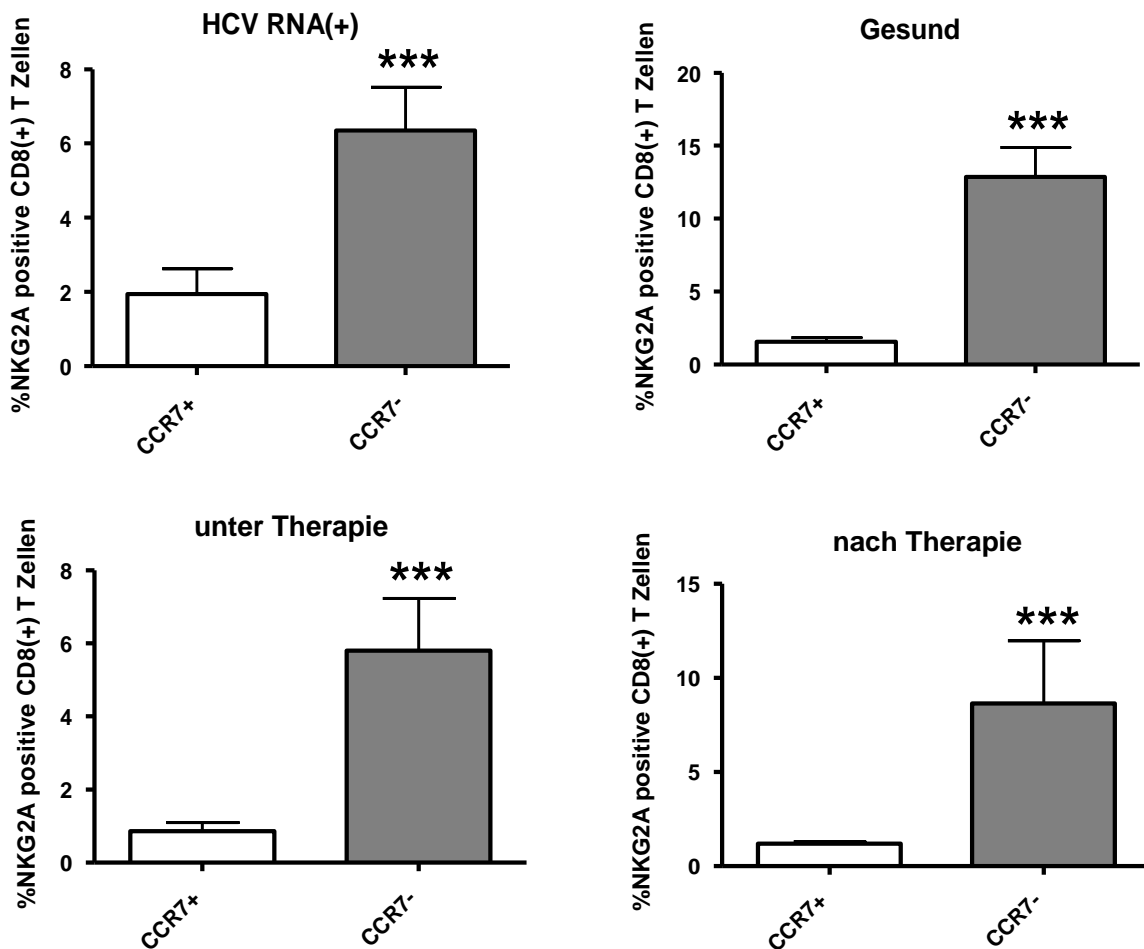


Abb. 10: Expression des NKG2A-Rezeptors auf CCR7 exprimierenden CD8(+) T Zellen

Die Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors auf CCR7 positiven (weiße Säulen) und CCR7 negativen (graue Säulen) CD8(+) T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei wurden CCR5-exprimierende CD8(+) T-Zellen bei HCV RNA(+) Patienten (Säulendiagramm oben links), bei einer HCV RNA(-) gesunden Kontrollgruppe (Säulendiagramm oben rechts), bei Patienten während einer pegIFN/Ribavirin Therapie (Säulendiagramm unten links) und bei Patienten nach erfolgreicher Behandlung (Säulendiagramm unten rechts) untersucht.

Die Säulen geben den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes gemäß dem Mann-Whitney Test an. . *** p<0,001 vs. CCR7(+) T-Zellen.

Zudem untersuchten wir in der Gruppe der HCV(+) Patienten die NKG2C-Expression auf CCR5(+) und CCR5(-) bzw. auf CCR7(+) und CCR7(-) CD8(+) T-Zellen. Hierbei zeigte der aktivierende NKG2C-Rezeptor im Gegensatz zum hemmenden NKG2A-Rezeptor eine signifikant höhere Expression auf CCR5- und CCR7-negativen T-Lymphozyten als auf den Chemokinrezeptor-exprimierenden T-Zellen (Abb.11).

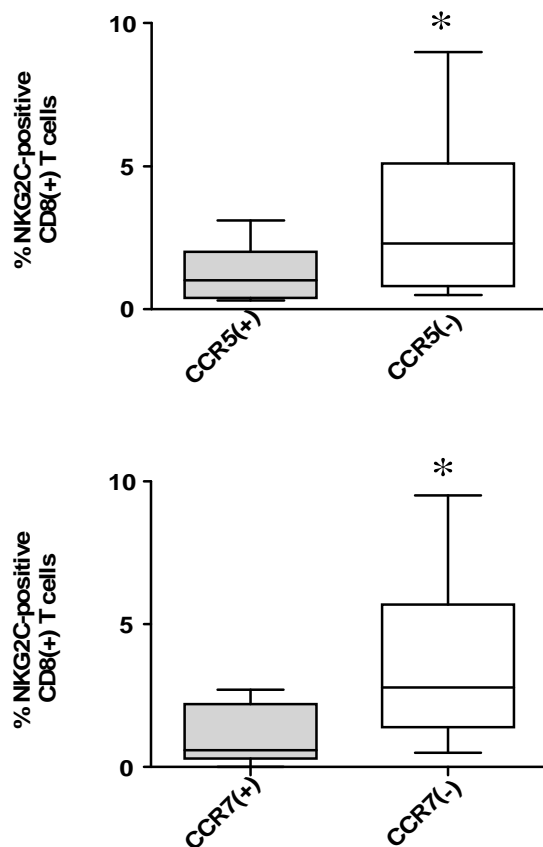


Abb. 11: NKG2C-Expression in Bezug auf die CCR5 und CCR7 Expression

Die Boxplots stellen zusammenfassend die durchflusszytometrisch gemessene Expression des NKG2C-Rezeptors auf CCR5-exprimierenden (oben) und CCR7-exprimierenden T-Zellen (unten) am Beispiel der HCV RNA(+) Patientengruppe gegenüber. Die Boxplots markieren 10-, 25-, 75- und 90-Perzentile. * $p < 0,05$ vs. CCR5(+) T-Zellen (oberer Graph) und vs. CCR7(+) T-Zellen (unterer Graph).

4.3 Empfänglichkeit CCR5(+) und CCR7(+) CD8(+) T-Zellen gegenüber einer Hemmung durch NKG2A

In weiteren Experimenten untersuchten wir den funktionellen Einfluss des NKG2A-Rezeptors auf die Zytotoxizität CCR5(+) vs. CCR7(+) CD8(+) T-Zellen. Dazu verwendeten wir den CD107a-Assay. Hierbei fand sich bei alleiniger Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit Anti-CD3 kein Unterschied in der CD107a-Expression zwischen CCR5(+) und CCR7(+) CD8(+) T-Lymphozyten (Abb. 12a). Bei der im nächsten Schritt durchgeführten Ko-Stimulation mit Anti-NKG2A zusätzlich zur Anti-CD3-Stimulation fand sich eine signifikante Reduktion der zytotoxischen Aktivität der CCR5-exprimierenden CD8(+) T-Zellen. Im Gegensatz dazu führte die T-Zell-Rezeptor/NKG2A Ko-Stimulation bei CCR7-positiven CD8(+) T-Zellen zu vernachlässigbar geringen Hemmung der zytotoxischen Aktivität (Abb. 12a).

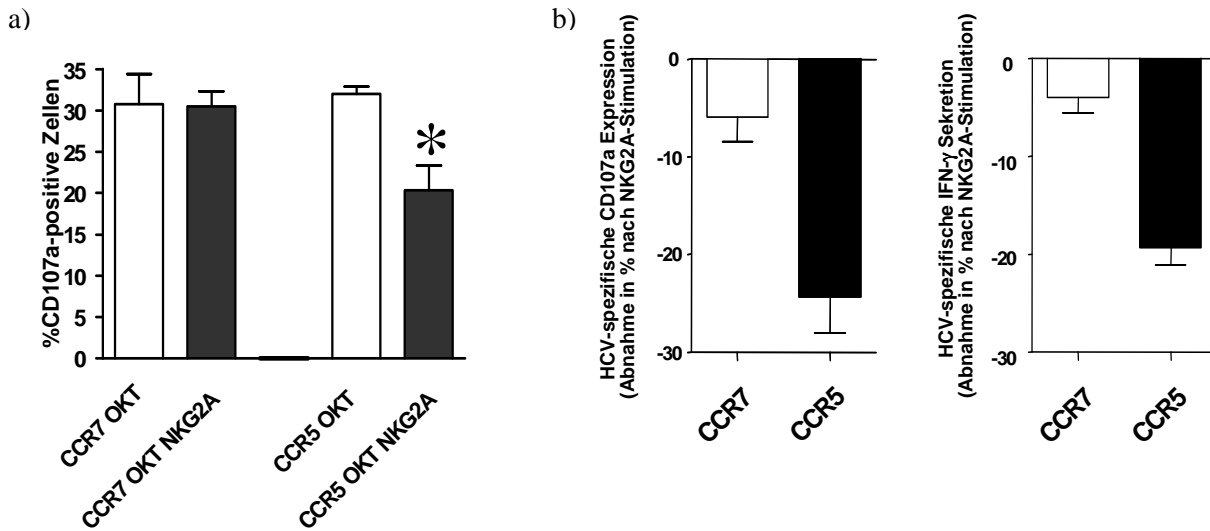


Abb. 12: Zytolytische Aktivität CD8(+) T Zellen

Die zytolytische Aktivität CD8(+) T-Zellen erfolgte anhand der durchflusszytometrischen Messung der CD107a-Expression. Abb. 12a zeigt die CD107a-Expression CCR5- und CCR7-positiver Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 (OKT3) (weiße Säulen) und nach Ko-Stimulation zusammen mit NKG2A (schwarze Säulen). * $p < 0,05$ vs. alleiniger Stimulation des T-Zell-Rezeptors. Abb. 12b zeigt neben der durchflusszytometrischen Bestimmung der CD107a-Expression auch die IFN- γ Sekretion CCR5- (schwarze Säule) und CCR7-positiver CD8(+) T-Zellen (weiße Säule) nach Stimulation mit dem HCV-Core Peptid und NKG2A.

Zusätzlich untersuchten wir, ob die Empfänglichkeit von CCR5(+) und CCR7(+) T-Zellen gegenüber einer Hemmung durch NKG2A auch bei Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten von Bedeutung ist. Hierfür analysierten wir die Hepatitis C-spezifische CD8(+) T-Zell-Antwort nach Stimulation dieser Zellen mit einem HCV Core Peptid-Pool in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von Anti-NKG2A. Auch bei diesen Experimenten fanden sich ohne NKG2A-Stimulation keine signifikanten Unterschiede der T-Zell-Antworten zwischen CCR5 (+) und CCR7(+) CD8(+) T-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

Die Ko-Stimulation mit Anti-NKG2A führte jedoch bei den CCR5(+) T-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der HCV-spezifischen IFN- γ -Sekretion bzw. CD107a-Expression. Im Gegensatz dazu hatte die Ko-Inkubation mit Anti-NKG2A im Falle der CCR7(+) T-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die T-Zell-Antwort (Abb. 12b).

4.4 Migrationsverhalten NKG2A(+) und NKG2A(-) T-Lymphozyten gegenüber Chemokinen

Desweiteren untersuchten wir das Migrationsverhalten NKG2A(+) und (-) CD8(+) T-Zellen in Richtung des CCR5-Liganden CCL5 (=RANTES) und des CCR7-Liganden CCL21. Hierdurch sollte geklärt werden, ob die unterschiedliche Chemokinrezeptor-Expression einen Einfluss auf die Rekrutierung dieser Zellpopulationen besitzt.

Der Migrationsassay erfolgte bei einer HCV RNA(+) unbehandelten Patientengruppe (n=4) und einem gesunden Vergleichskollektiv (n=35). Hierbei zeigte der Migrationsversuch gegen CCL5 ein ähnliches Migrationsverhalten in beiden Studiengruppen: NKG2A-exprimierende CD8(+) T-Zellen migrierten in einem signifikant stärkeren Ausmaß gegen CCL5 als NKG2A negative Zellen (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes der HCV RNA(+): $4\% \pm 0,9\%$ vs. $2,1\% \pm 0,3\%$, $p=0,0221$; gesunde Kontrollgruppe: $3,9\% \pm 0,3\%$ vs. $2,5\% \pm 0,2\%$, $p=0,002$)(Abb. 13a).

Die Analyse der Migration gegen das lymphatische Chemokin CCL21 zeigte, dass vor allem NKG2A(-) CD8(+) T-Zellen von diesem Chemokin rekrutiert wurden (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes der HCV RNA(+): $2,9\% \pm 0,5\%$ vs. $3,6\% \pm 0,5\%$, $p=n.s.$; gesunde Kontrollgruppe: $1,7\% \pm 0,2\%$ vs. $2,4\% \pm 0,3\%$, $p=0,039$) (Abb. 13b).

Die chronische Hepatitis C ist mit einer erhöhten intrahepatischen Expression des inflammatorischen Chemokins CCL5 assoziiert. Als einen möglichen Mechanismus hierfür konnte unsere Arbeitsgruppe in früheren Untersuchungen nachweisen, dass die Bindung des HCV E2 Hüll-Proteins an T-Lymphozyten zu einer verstärkten CCL5-Freisetzung führt. Daher untersuchten wir in weiteren Experimenten die Rekrutierung von NKG2A(+) und NKG2A(-) T-Zellen durch HCV E2-stimulierte Lymphozyten-Überstände. Als Kontrolle ließen wir die Zellen gegen HCV Core Überstände (= keine Induktion einer CCL5- Sekretion) und gegen unstimulierte Zellen wandern. Hierbei zeigte sich, dass NKG2A-exprimierende T-Zellen vor allem von den Überständen rekrutiert wurden, die HCV E2-stimuliert waren. Dies führte zu einer Akkumulation NKG2A-positiver T-Zellen in der Population der migrierten Lymphozyten (Abb. 14).

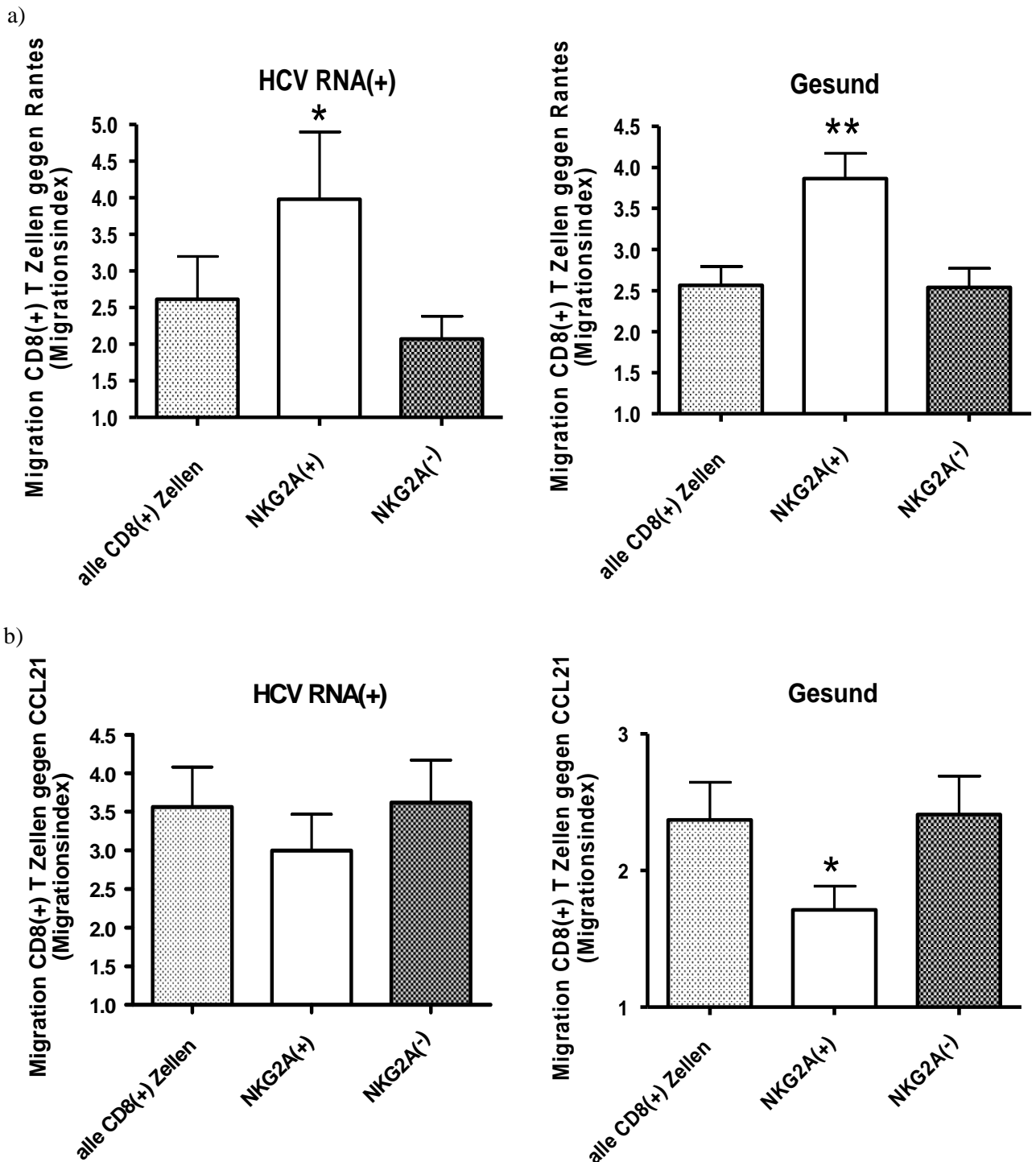


Abb. 13: Migration NKG2A-exprimierender CD8(+) T Zellen gegen RANTES und CCL21

Nach dem Migrationsassay wurde der Anteil migrierter Zellen gegen RANTES (obere Graphen) und CCL21 (untere Graphen) durchflusszytometrisch bestimmt. Hierbei wurde der Anteil aller migrierter CD8(+) T-Zellen mit dem der NKG2A(+) und (-) verglichen. Abbildung (a) zeigt die Migration gegen RANTES und (b) gegen CCL21. Die Ergebnisse sind als Migrationsindex dargestellt (wie im Material und Methodenteil beschrieben). Die Säulen geben den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes nach dem Mann-Whitney Test an. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. NKG2A(-) CD8(+) T-Zellen

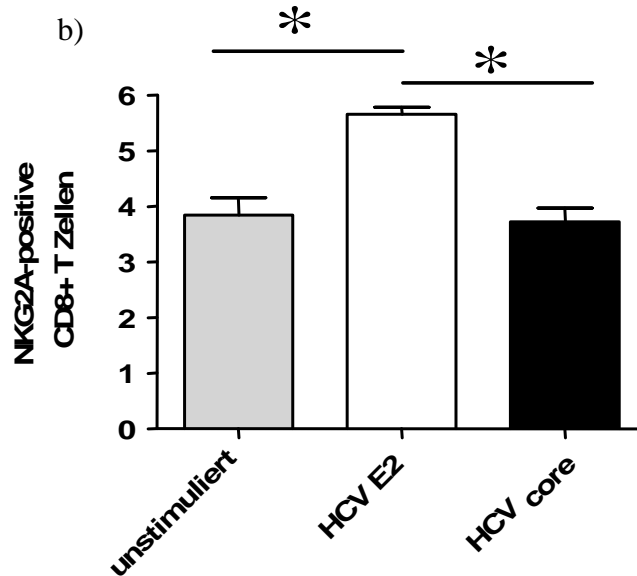
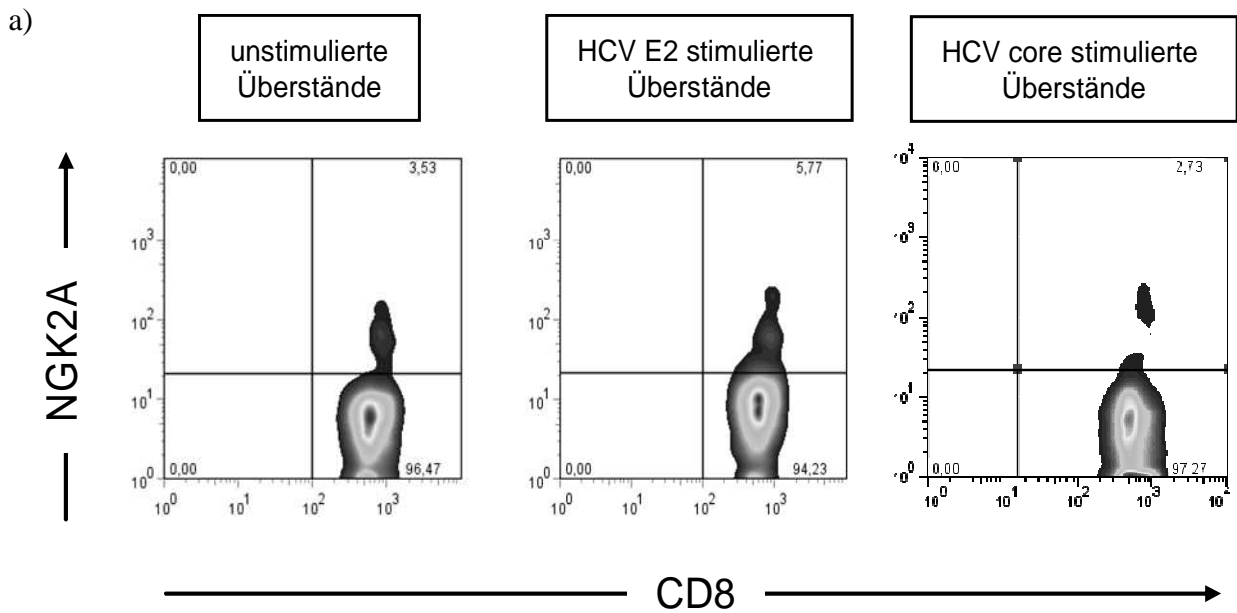


Abb. 14: Migration NKG2A-exprimierender CD8(+) T-Zellen gegen HCV E2 stimulierte Überstände

CD8(+) T-Zellen wanderten gegen Überstände, die von CD8(+) T-Zellen gewonnen wurden, welche entweder mit oder ohne HCV E2 und HCV-Core Peptid stimuliert wurden. Abb. 14a zeigt, dass besonders gegen HCV E2 stimulierte CD8 Zellen NKG2A-positive Zellen gewandert sind. Abb. 14b verdeutlicht dies noch mal anhand der Säulendiagramme.

Die Ergebnisse sind als Migrationsindex dargestellt (wie im Material und Methodenteil beschrieben). Die Säulen geben den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes nach dem Mann-Whitney Test an.
* p < 0,05

5 Diskussion

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus verläuft in den meisten Fällen chronisch, mit einem hieraus resultierenden erhöhten Risiko eine Leberfibrose bzw. eine Leberzirrhose zu entwickeln. Die Ursachen hierfür sind bislang nur unzureichend verstanden. Viele Studien zeigten, dass eine Fehlregulation der HCV-spezifischen T-Zell-Antwort hierbei eine wichtige Rolle spielt. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass Arbeiten der letzten Jahre an verschiedenen Mausmodellen zeigen konnten, dass der Chemokinrezeptor CCR5 offensichtlich eine wichtige Rolle in der Regulation einer T-Zell-vermittelten Immunantwort spielt (Algood et al., 2004; Nansen et al., 2002).

Epidemiologische Studien bei HCV-infizierten Patienten lassen vermuten, dass CCR5 auch hier möglicherweise eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort spielt. So konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer CCR5 Δ 32-Mutation, die zu einem Verlust der CCR5-Oberflächenexpression führt, eine spontane Elimination des Virus signifikant häufiger vorkommt als bei Patienten mit einem CCR5 Wildtyp (CCR5 WT/WT) (Goulding et al., 2005).

Unklar blieb jedoch, über welche Mechanismen CCR5 die Funktion von T-Zellen reguliert. Grundsätzlich könnte dies darin begründet sein, dass CCR5 einen direkten immunmodulatorischen Einfluss auf CD8(+) T-Lymphozyten besitzt. Alternativ wäre vorstellbar, dass die CCR5-Expression spezifisch für eine Subpopulation von CD8(+) T-Zellen ist, und somit indirekt über eine Ko-Expression mit anderen Oberflächenmolekülen an der Regulation von T-Zell-Funktionen beteiligt ist. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Da in Vorarbeiten unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde, dass der NK-Zell-Rezeptor NKG2A eine wichtige Rolle bei der Hepatitis C spielt, analysierten wir hierbei insbesondere eine mögliche Assoziation dieses NKR mit dem CCR5-Rezeptor.

In Übereinstimmung mit unseren Vorarbeiten fand sich bei den HCV RNA(+) Patienten ein signifikant höherer Anteil NKG2A-exprimierender CD8(+) T-Zellen als bei den anderen Studien-Gruppen. Die Expression von NKG2C unterschied sich zwischen den HCV-Patienten und den Gesunden nicht. Auch dies entsprach früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe.

Hinsichtlich der CCR7-Expression fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Studien-Gruppen. Vergleichbare Befunde waren bereits früher von Bonacchi und Mitarbeitern erhoben worden (Bonacchi et al., 2003). Diese Übereinstimmung mit

vorherigen Ergebnissen lassen es als plausibel erscheinen, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten als repräsentativ für eine größere Population anzusehen sind.

Im Gegensatz zu CCR7 war der CCR5-Rezeptor auf T-Zellen HCV RNA(+) Patienten signifikant niedriger exprimiert als auf den T-Zellen der anderen Studien-Gruppen, was frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigte (Lichterfeld et al., 2002). Der Grund für diese verminderte CCR5-Expression auf peripheren T-Zellen chronisch HCV-infizierter Patienten ist bislang nicht vollständig geklärt. Basierend auf bisher bekannten Daten sind hierbei verschiedene potentielle Mechanismen denkbar. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass eine HCV-induzierte CCL5-Sekretion und die daraus resultierende CCL5/CCR5-Interaktion zur Internalisierung des CCR5-Rezeptors – und somit zu einer reduzierten Oberflächenexpression – führt (Nattermann et al., 2004). Alternativ wäre es auch vorstellbar, dass durch die HCV-induzierte intrahepatische CCL5-Sekretion primär CCR5(+) T-Zellen in der Leber rekrutiert werden und somit in der Leber akkumulieren. Diese veränderte Kompartimentalisierung CCR5(+) T-Zellen hätte dann eine Reduktion des Anteils CCR5(+) Zellen im zirkulierenden Blut zur Folge.

Ausgehend von unserer Hypothese, dass der CCR5-Rezeptor eine Subpopulation von CD8(+) T-Zellen charakterisiert, die durch die Expression spezifischer anderer, funktionell relevanter, Oberflächenmoleküle gekennzeichnet ist, untersuchten wir zudem die Ko-Expression von Chemokinrezeptoren und NKG2-Rezeptoren.

Hierbei zeigte sich, dass CCR5-positive CD8(+) T-Zellen ein spezifisches Muster von NK Zell-Rezeptoren aufweisen, da auf diesen Zellen eine hohe Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors bei niedriger Expression des aktivierenden NKG2C-Rezeptors nachweisbar war. Im Gegensatz dazu fand sich auf CCR7-positiven T-Zellen eine geringe Oberflächendichte beider Rezeptoren, wodurch belegt ist, dass eine hohe NKG2A-Expression tatsächlich ein spezifisches Charakteristikum CCR5(+) T-Lymphozyten darstellt.

Interessanterweise war diese CCR5/NKG2A Ko-Expression nicht nur bei den Patienten mit einer chronischen Hepatitis C sondern auch bei den gesunden Kontrollen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass CCR5 und NKG2A unabhängig von einer chronischen Virus-Infektion ko-exprimiert sind – und damit möglicherweise auch bei der akuten Hepatitis C eine Rolle spielen könnten.

In Übereinstimmung mit der Ko-Expression von CCR5 und NKG2A, wurden NKG2A(+) T-Zellen präferenziell durch das inflammatorische Chemokin RANTES (=CCL5) rekrutiert, was zu einer Akkumulation NKG2A(+) T-Zellen in der Population der migrierten Lymphozyten führte. Somit wäre die Expression von NKG2A auf CCR5(+) CD8(+) T-Zellen eine plausible Erklärung für die beobachtete Akkumulation von NKG2A-positiven T-Lymphozyten in Lebern HCV-infizierter Patienten, da die chronische Hepatitis C mit erhöhten intrahepatischen CCL5-Spiegeln assoziiert ist (Apolinari et al., 2002; Leroy et al., 2003; Nischalke et al., 2004). Diese Hypothese wurde durch ein weiteres Experiment unterstützt: Ein Mechanismus, der möglicherweise zu dieser HCV-assoziierten CCL5 Expression beiträgt, ist die Interaktion des HCV Hüllproteins E2 mit dem oberflächenexprimierten Tetraspanin CD81, welches als HCV Ko-Rezeptor gilt. In vorherigen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Bindung von HCV E2 an CD81 auf CD8(+) T-Zellen zu einer vermehrten Freisetzung von CCL5 führt (Nattermann et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten wir nun nachweisen, dass NKG2A(+) CD8(+) T-Zellen verstärkt von HCV E2-stimulierten Überständen angelockt wurden, was in einer signifikanten Akkumulation von NKG2A-exprimierenden Lymphozyten resultierte.

Im Gegensatz zu den NKG2A(+) CD8(+) T-Zellen migrierten NKG2A(-) Zellen primär in Richtung des lymphatischen Chemokins CCL21. Dies korrelierte gut mit unserer Beobachtung, dass nur ein geringer Anteil CCR7-positiver Zellen auch NKG2A exprimierten. Die physiologische Bedeutung einer solchen präferenziellen Rekrutierung NKG2A(-) T-Zellen durch das lymphatische Chemokin CCL21 ist momentan noch unklar. Hierbei wären jedoch verschiedene Szenarien denkbar. Im lymphatischen Gewebe findet das „Priming“ von Antigen-spezifischen CD8(+) T-Zellen statt. In diesem Zusammenhang scheint es sinnvoll, dass primär NKG2A(-) Lymphozyten in das lymphatische Gewebe rekrutiert werden, um eine verstärkte Suzeptibilität der resultierenden Antigen-spezifischen T-Zelle gegenüber einer NKG2A-vermittelten Hemmung zu vermeiden. Zudem könnte sich eine hohe Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors auf den rekrutierten Lymphozyten möglicherweise negativ auf das „Priming“ auswirken.

Die physiologische Bedeutung der Expression von NKG2A auf CD8(+) T-Zellen ist momentan noch nicht vollständig verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass NKG2A an der Feineinstellung von T-Lymphozyten beteiligt ist, da NKG2A-vermittelte Signale die Stimulationsschwelle für eine T-Zell-Rezeptor-induzierte Aktivierung erhöhen (McMahon et al.,

2001). Somit spielt NKG2A möglicherweise eine Rolle für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Braud et al., 2003) und verhindert eine überschießende und unregulierte Immunantwort, wie sie beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen beobachtet wird. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass NKG2A die zytolytische Aktivität und die Zytokinsekretion Antigen-spezifischer T-Zellen hemmen kann. Hierbei ist es gut vorstellbar, dass eine solche Veränderung von T-Lymphozyten-Funktionen die Chronifizierung einer viralen Infektion begünstigen. Hinsichtlich der Hepatitis C Infektion ist in vielen Studien beschrieben worden, dass eine robuste T-Zell-Antwort in der akuten Phase der Infektion für die Viruselimination von wichtiger Bedeutung ist (Missale et al., 1996; Lechner et al., 2000; Thimme et al., 2001). Die Mechanismen, die zum Versagen der T-Zell-Antwort und somit zur Viruspersistenz beitragen, sind bisher erst wenig charakterisiert. Diskutiert werden zum Beispiel ein primäres T-Zell-Versagen oder T-Zell-Erschöpfung, virale Escape-Mutationen sowie T-Zell-Dysfunktionen. Eine spontane Viruselimierung in der akuten Phase einer HCV Infektion benötigt sowohl eine stabile CD4(+)- als auch CD8(+) T-Zell-Antwort gegen verschiedene virale Epitope. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass ein Versagen der Immunantwort unter anderem darin besteht, dass T-Zellen bestimmte virale Peptidstrukturen nicht erkennen (Missale et al., 1996; Thimme et al., 2001). Auch eine verminderte IFN- γ Sekretion CD8(+) T-Zellen wird mit einer gestörten T-Zell-Antwort in Zusammenhang gebracht (Lechner et al., 2000). Eine weitere Studie assoziierte eine verminderte T-Zell-Proliferation und die daraus resultierende Abnahme der Virus-spezifischen T-Zell-Antwort mit einer Chronifizierung des Virus (Folgori et al., 2006).

In diesem Zusammenhang ist es nun von besonderer Bedeutung, dass wir in der vorliegenden Arbeit zeigen konnten, dass die NKG2A/CCR5 Ko-Expression CCR5-exprimierende CD8(+) T-Zellen empfänglicher für eine NKG2A-vermittelte Hemmung der zytotoxischen Aktivität und der Freisetzung von IFN- γ machte, als dies bei CCR7(+) Lymphozyten der Fall war. In Bezug auf die Hepatitis C ist es hierbei von besonderer Bedeutung, dass auch die HCV Core-spezifische T-Zell-Antwort CCR5-positiver T-Zellen signifikant durch NKG2A gehemmt werden konnte. Die Spezifität dieses Ergebnisses wird durch unsere Beobachtung, dass sich CCR5(+) und CCR7(+) T-Zellen in ihrer zytotoxischen Aktivität nach alleiniger Stimulation mit Anti-CD3 (OKT3) nicht voneinander unterscheiden, unterstrichen.

Normalerweise ist die inhibitorische Funktion von NKG2A auf T-Zellen nur recht gering. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die chronische Hepatitis C mit einer signifikant erhöhten Expression von HLA-E auf einer Vielzahl intrahepatischer Zellen assoziiert ist. Als möglichen zugrunde liegenden Mechanismus identifizierten wir ein HCV-Peptid (HCV Core aa 35-44), welches an HLA-E binden und dadurch die Oberflächenexpression von HLA-E stabilisieren kann (Nattermann et al., 2005). Dies könnte die Interaktion von HLA-E mit NKG2A begünstigen und dadurch zu einer effektiveren Hemmung von CTL-Funktionen führen. Außerdem konnten wir nachweisen, dass Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion eine signifikant höhere NKG2A-Expression aufweisen als dies bei gesunden Kontrollen der Fall ist. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnten wir weiterhin nachweisen, dass T-Lymphozyten von HCV-Patienten stärker durch NKG2A hemmbar sind als T-Zellen von HCV-negativen Personen. Zudem war die zytolytische Aktivität von CD8(+) T-Zellen der HCV-Patienten gegen HLA-E exprimierende Zellen niedriger als bei den Gesunden. Somit scheint es wahrscheinlich, dass die HLA-E/NKG2A-Interaktion und die hieraus resultierende Hemmung von T-Zell-Funktionen bei HCV-Patienten von besonderer Relevanz sind.

Die in der vorliegenden Dissertation beschriebene Assoziation von CCR5 und NKG2A könnte im Rahmen der Hepatitis C noch unter einem weiteren Gesichtspunkt von Bedeutung sein. In vorherigen Arbeiten konnten wir und andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die HCV-Infektion auch mit einer intrahepatischen Akkumulation NKG2A(+) natürlicher Killer (NK) Zellen assoziiert ist.

NK-Zellen (CD3-, CD16+, CD56+), eine heterogene Subpopulation der Lymphozyten, sind ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie repräsentieren 5 - 15 % der mononukleären Zellen im peripheren Blut und bis zu 45 % in einigen Organen wie der Leber (Trinchieri, 1989; Whiteside und Herberman, 1994). Eine wesentliche Funktion von NK-Zellen ist die Zerstörung von transformierten oder virusinfizierten Zellen durch Zytolyse (Trinchieri, 1989). Zudem üben NK-Zellen über die Freisetzung von Zytokinen eine wichtige immunmodulierende Funktion aus. In Bezug auf die Hepatitis C konnte anhand von funktionellen und epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass natürliche Killerzellen eine wichtige Komponente der humanen Immunantwort im Rahmen der HCV-Infektion darstellen. Allerdings scheint die Funktion von NK-Zellen bei der Hepatitis C durch verschiedene Mechanismen gestört. So konnte gezeigt werden, dass die HCV-assoziierte Hochregulation des hemmenden

NKG2A-Rezeptors bei gleichzeitiger Verminderung aktivierender Rezeptoren (NKG2C) die zytolytische Aktivität von NK-Zellen HCV-infizierter Patienten hemmt und zu einer veränderten Zytokin-Freisetzung führt (Jinushi et al., 2004; Nattermann et al., 2005; Radeava et al., 2006). Wie Jinushi *et al.* anhand von *in vitro* Versuchen zeigen konnten, könnte dies nicht nur die Etablierung einer chronischen Infektion sondern auch die Proliferation hepatischer Sternzellen und die Ablagerung extrazellulärer Matrix steigern (Jinushi et al., 2004) und dadurch Fibrose-fördernd wirken. Präliminäre Arbeiten unserer Arbeitsgruppe deuten nun darauf hin, dass auch auf NK-Zellen der NKG2A-Rezeptor mit CCR5 ko-exprimiert wird. Dieser Befund könnte die beschriebene Akkumulation von NKG2A(+) NK-Zellen erklären und würde einen Mechanismus darstellen, über den CCR5(+) Lymphozyten an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind.

Wie am Anfang dieser Arbeit erwähnt, beeinflusst die CCR5 Δ 32-Mutation neben dem Verlauf der Hepatitis C auch den Schweregrad verschiedener anderer inflammatorischer Krankheiten. Analog zur HCV-Infektion wurde auch für die Hepatitis B beschrieben, dass Homozygotie für den Δ 32-Polymorphismus mit einer spontanen Ausheilung assoziiert ist (Thio et al., 2007). Da wir zeigen konnten, dass die Ko-Expression von CCR5 und NKG2A kein HCV-spezifisches Merkmal darstellt, wäre es auch bei der Hepatitis B Virus(HBV)-Infektion vorstellbar, dass die funktionelle Defizienz von CCR5 bei Patienten mit einem CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32 Genotyp die intrahepatische Akkumulation von NKG2A-exprimierenden T-Lymphozyten verhindert und somit eine stärkere HBV-gerichtete Immunantwort begünstigt.

Zudem konnte in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden, dass eine CCR5-Defizienz mit einer signifikant gesteigerten T-Zell-Antwort assoziiert ist (Algood et al., 2004; Nansen et al., 2002; Zhou et al., 1998). Auch hier könnte die von uns identifizierte CCR5/NKG2A-Assoziation eine Rolle spielen, da das murine Qa-1 Molekül, ein Homolog zum humanen HLA-E Molekül darstellt, welches durch NKG2A erkannt wird (Miller et al., 2003; Salcedo et al., 1998; Vance et al., 1998, 1999).

Zusammenfassend kann aufgrund der erhobenen Daten in Bezug auf die Hepatitis C folgendes Modell postuliert werden (Abb. 15):

Die chronische Hepatitis C ist mit einer erhöhten intrahepatischen Expression inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise CCL5, assoziiert. Hierbei spielt möglicherweise die Interaktion des HCV E2 Hüll-Proteins mit CD81 auf der T-Zell-Oberfläche eine Rolle, da diese zu einer

verstärkten Freisetzung von CCL5 führt (Nattermann et al., 2004). Da CCL5 ein wichtiger Ligand für den Chemokinrezeptor CCR5 darstellt, führt dies zu einer Rekrutierung CCR5(+) T-Zellen aus dem peripheren Blut in die Leber. Die von uns nachgewiesene Ko-Expression von NKG2A auf CCR5-exprimierenden CD8(+) T-Zellen, würde hierbei nun zu einer präferenziellen Migration NKG2A(+) T-Zellen führen. Dies könnte die beschriebene Akkumulation NKG2A-exprimierender Lymphozyten in HCV-infizierten Lebern erklären. Da wir zudem zeigen konnten, dass die akkumulierten CCR5(+) NKG2A(+) T-Zellen gegenüber einer Hemmung durch NKG2A sehr empfänglich sind und die HCV-Infektion mit einer Hochregulation des NKG2A Liganden HLA-E auf einer Vielzahl intrahepatischer Zellen assoziiert ist, könnte dies zu einer gestörten intrahepatischen T-Zell-Antwort beitragen und somit die Persistenz des Hepatitis C Virus begünstigen.

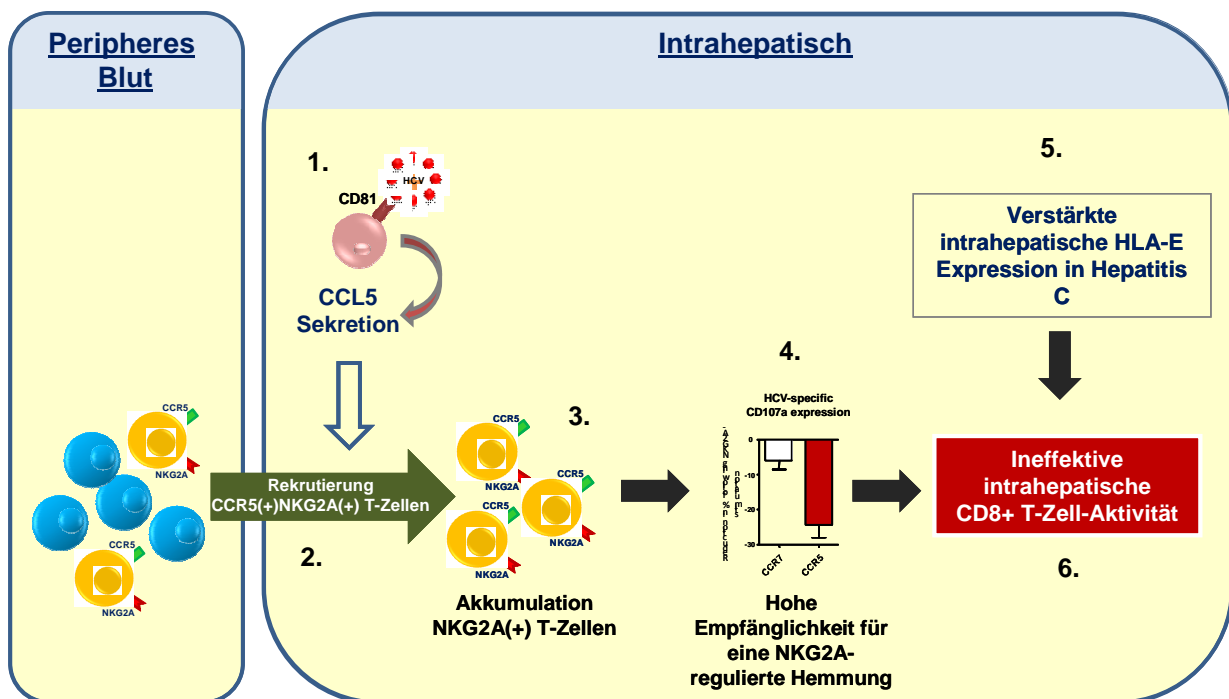


Abb. 15: Mögliches Modell der NKG2A-Rekrutierung in die Leber

1. HCV E2/CD81 Interaktion → vermehrte intrahepatische RANTES-Sekretion.
2. Rekrutierung CCR5(+)NKG2A(+)T-Zellen aus dem peripheren Blut in die Leber.
3. Akkumulation NKG2A(+)T-Zellen in der Leber.
4. Die akkumulierten Zellen sind sehr empfänglich für eine Hemmung ihrer Funktion durch eine Regulation über NKG2A.
5. Hochregulation des NKG2A Liganden HLA-E auf intrahepatische Zellen.
6. Durch die HLA-E/NKG2A Interaktion → Hemmung der zytolytischen Funktion NKG2A(+) T-Zellen und damit verminderte HCV- spezifische T-Zell-Antwort.

6 Zusammenfassung

Die Mechanismen, die bei der HCV-Infektion die häufig beobachtete Chronifizierung begünstigen, sind zur Zeit nur teilweise verstanden. Wiederholt wurde in diesem Zusammenhang von einer verminderten Funktion der CD8(+) T-Zellen berichtet. Anhand von verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CCR5 eine wichtige Rolle für die funktionelle Regulation von T-Zellen besitzt. Bezüglich der HCV-Infektion lassen epidemiologische Studien vermuten, dass auch hier der CCR5-Rezeptor von besonderer Bedeutung ist. Unklar blieb jedoch, über welche Mechanismen CCR5 die T-Zell-Funktion reguliert. Da unsere Arbeitsgruppe in Vorarbeiten nachgewiesen hatte, dass der NK-Zell-Rezeptor NKG2A ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Hepatitis C spielt, analysierten wir hierbei insbesondere eine mögliche Assoziation dieses NKR mit dem CCR5-Rezeptor.

Hierzu analysierten wir die Ko-Expression von CCR5 und NKG2A auf CD8(+) T-Zellen bei HCV-Patienten und Gesunden. Weiterhin untersuchten wir das Migrationsverhalten von NKG2A(+) und (-) T-Zellen. Zudem analysierten wir die Regulation der zytotoxischen Aktivität von CCR5-exprimierenden T-Zellen durch NKG2A.

Die Experimente zeigten, dass unabhängig von einer chronischen HCV-Infektion NKG2A spezifisch mit CCR5 nicht aber mit CCR7 ko-exprimiert ist. Hiermit übereinstimmend wurden präferenziell NKG2A(+) T-Zellen von dem inflammatorischen Chemokin CCL5 und HCV E2 stimulierten Überständen rekrutiert, was zu einer Akkumulation dieser Zellen in der Population der migrierten Lymphozyten führte. Dies könnte die bei der Hepatitis C beobachtete intrahepatische Akkumulation NKG2A(+) Lymphozyten erklären.

Funktionell waren CCR5(+)CD8(+) T-Zellen für eine NKG2A vermittelte Hemmung der zytotoxischen Aktivität empfänglicher als CCR7(+) T-Zellen. Dies konnte auch für HCV-spezifische T-Zell-Antworten nachgewiesen werden. Da die Hepatitis C mit einer Hochregulation des NKG2A-Rezeptors bei gleichzeitig erhöhter Expression des NKG2A-Liganden HLA-E assoziiert ist, könnte dies zu einer gestörten intrahepatischen T-Zell-Antwort beitragen und somit die Persistenz des Hepatitis C Virus begünstigen.

7 Literaturverzeichnis

- Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Pérez E, Saez A, Lozano C, Vargas J, García-Monzón C. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2861-2870.
- Algood HM, Flynn JL. CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J Immunol* 2004; 173: 3287-3296.
- Baggiolini M, Dahinden CA. CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* 1994; 15: 127-133.
- Baggiolini M, Moser B. Blocking chemokine receptors. *J Exp Med* 1997; 186: 1189-1191.
- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568.
- BD Biosciences, 2000: Einführung in die Durchflusszytometrie. <http://genome.tugraz.at/GrundlBiomTechnik/FACS.pdf> (Zugriffsdatum: 11.12.2008)
- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97: 77-89.
- Bonacchi A, Petrai I, Defranco RM, Lazzeri E, Annunziato F, Efsen E, Cosmi L, Romagnani P, Milani S, Failli P, Batignani G, Liotta F, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 125: 1060-1076.
- Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 1998; 187: 813-818.
- Braud VM, Aldemir H, Breart B, Ferlin WG. Expression of CD94-NKG2A inhibitory receptor is restricted to a subset of CD8+ T cells. *Trends Immunol* 2003; 24: 162-164.
- Choo Q-L, Kuo G, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA derived from all blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- Choo Q-L, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46: 423-441.
- Clore GM, Gronenborn AM. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J* 1995; 9: 57-62.
- D'Andrea A, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptor expression by T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 230: 25-39.
- Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follet EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995; 76: 1197-1204.

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

Folgori A, Spada E, Pezzanera M, Ruggeri L, Mele A, Garbuglia AR, Perrone MP, Del Porto P, Piccolella E, Cortese R, Nicosia A, Vitelli A; Acute Hepatitis C Italian Study Group. Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance. *Gut* 2006; 55: 1012-1019.

Furie MB and Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol* 1995; 146: 1287- 1301.

Godessart N, Kunkel SL. Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 670-675.

Goulding C, McManus R, Murphy A, MacDonald G, Barrett S, Crowe J, Hegarty J, McKiernan S, Kelleher D. The CCR5-delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. *Gut* 2005; 54: 1157-1161.

Heintges T und Wands JR. Hepatitis C Virus: Epidemiology and Transmission. *Hepatology* 1997; 26: 521-526.

Hiroishi K, Kita H, Kojima M, Okamoto H, Moriyama T, Kaneko T, Ohnishi S, Aikawa T, Tanaka N, Yazaki Y, Mitamura K, Imawari M. *Hepatotology* 1997; 25: 705-712.

Hoofnagle J. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26 Suppl: 15S-20S.

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

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

Kambayashi T, Assarsson E, Michaëlsson J, Berglund P, Diehl AD, Chambers BJ, Ljunggren HG. Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice. *J Immunol* 2000; 165: 4964-4969.

Kiyosawa K, Sodemaya T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakamo Y, Furuta S. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 14: 371-388.

Koziel MJ, Wong DK, Dudley D, Houghton M, Walker BD. Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons. *J Infect Dis* 1997; 176: 859-866.

Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996; 183: 1461-1472.

Kunkel SL, Lukacs N, Strieter RM. Chemokines and their role in human disease. *Agents Actions Suppl* 1995; 46: 11-22.

Kusano F, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2000; 80: 415-22.

- Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. CD8⁺ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2479-2487.
- Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 829-841.
- Lichterfeld M, Leifeld L, Nischalke HD, Rockstroh JK, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection. *J Infect Dis* 2002; 185: 1803-1807.
- Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344-345.
- Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001; 2: 102-107.
- Mackay CR. Chemokines: what chemokine is that? *Curr Biol* 1997; 7: R384-386.
- McMahon CW, Raulet DH. Expression and function of NK cell receptors in CD8⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 465-470.
- Miller JD, Weber DA, Ibegbu C, Pohl J, Altman JD, Jensen PE. Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2. *J Immunol* 2003; 171: 1369-1375.
- Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714.
- Montalbano M, Neff GW. An update in liver transplantation in patients with hepatitis B and C. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2005; 5:109-126.
- Moreno C, Gustot T, Nicaise C, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, Le Moine O, Devière J, Louis H. CCR5 deficiency exacerbates T-cell-mediated hepatitis in mice. *Hepatology* 2005; 42: 854-862.
- Moreno C, Nicaise C, Gustot T, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, Louis H, Devière J. Chemokine receptor CCR5 deficiency exacerbates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1089-1099.
- Moser JM, Gibbs J, Jensen PE, Lukacher AE. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8⁺ T cell responses. *Nat Immunol* 2002; 3: 189-195.
- Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 593-633.
- Nansen A, Christensen JP, Andreasen SØ, Bartholdy C, Christensen JE, Thomsen AR. The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity. *Blood* 2002; 99: 1237-1245.
- Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997; 158: 5536-5544.

- Nattermann J, Nischalke HD, Feldmann G, Ahlenstiel G, Sauerbruch T, Spengler U. Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J Viral Hepat* 2004; 11: 519-526.
- Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, Leifeld L, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 2005; 166: 443-453.
- Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Rice CM, Wong J, Houghton M, Lau JY. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol* 1997; 158: 1473-1481.
- Nischalke HD, Nattermann J, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U, Dumoulin FL. Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 357-359.
- Prieschl EE, Kulmburg PA, Baumruker T. The nomenclature of chemokines. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 475-483.
- Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. 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* 2006; 130: 435-452.
- Realdi G, Alberti A, Rugge M, Rigoli AM, Tremolada F, Schivazappa L, Ruol A. Long term follow-up of acute and chronic non-A, non-B posttransfusion hepatitis: evidence of progression to liver cirrhosis. *Gut* 1982; 23: 270-275.
- Rehermann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996; 70: 7092-7102.
- Robert Koch Institut, Berlin. Hepatitis C Erkennung, Behandlung und Verhütung. Merkblatt für Ärzte 2000; Best. Nr. 60061.
- Salcedo M, Bousso P, Ljunggren HG, Kourilsky P, Abastado JP. The Qa-1b molecule binds to a large subpopulation of murine NK cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4356-4361.
- Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163: 6236-6243.
- Stevens J, Etienne J, Trowsdale J and Butcher GW. Peptide binding characteristics of non-classical class Ib MHC molecule HLA-E assessed by a recombinant random peptide approach. *BMC Immunology* 2001; 2: 5.
- Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395-406.
- Thio CL. Treatment of lamivudine-resistant hepatitis B in HIV-infected persons: is adefovir dipivoxil the answer? *J Hepatol* 2006; 44: 1-3.

Ulbrecht M, Modrow S, Srivastava R, Peterson PA, Weiss EH. Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation. *J Immunol* 1998; 160: 4375-4385.

Thio CL, Astemborski J, Bashirova A, Mosbrugger T, Greer S, Witt MD, Goedert JJ, Hilgartner M, Majeske A, O'Brien SJ, Thomas DL, Carrington M. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Delta32: Evidence that CCR5 contributes to viral persistence. *J Virol* 2007; 81: 441-445.

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

Ulbrecht M, Kellermann J, Johnson JP, Weiss EH. Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding. *J Exp Med* 1992; 176: 1083-1090.

Vance RE, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* 1998; 188: 1841-1848.

Vance RE, Jamieson AM, Raulet DH. Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 190: 1801-1812.

Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 1990; 29: 131-142.

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

Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H, Matsushima K. Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 2001; 193: 35-49.

Wack A, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 166-175.

Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takaynagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima, T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 16: 293-299.

Zeuzem S, Roth WK, Hermann G. Virushepatitis C. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 117-132.

Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 1998; 160: 4018-4025.