

**Immunregulation durch alternative Antigenpräsentation
am Beispiel der HCV- und HIV-Infektion**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Daniela Schulte

aus Olpe

Bonn, 2010

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

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. T. Sauerbruch

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Spengler
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Herzog

Tag der Promotion: 21. Januar 2011

Erscheinungsjahr: 2011

Zusammenfassung	I
I EINLEITUNG	1
1 Das Hepatitis C Virus (HCV)	1
1.1 Taxonomie	1
1.2 Übertragung und Klinik	1
1.3 Aufbau des Hepatitis C Virus	2
1.4 Replikation	3
1.5 Quasispezies und HCV-Genotypen	4
2 Das humane Immundefizienz Virus (HIV)	5
2.1 Taxonomie	6
2.2 Übertragung und Klinik	6
2.3 Aufbau des HI-Virus	7
2.4 Replikationszyklus von HIV	10
3 Das Immunsystem	11
3.1 <i>Major histocompatibility complex</i> (MHC) Moleküle	11
3.2 MHC-Klasse-I Moleküle	13
3.2.1 Das nicht-klassische MHC-I Molekül HLA-E	13
3.3 CD8(+) T-Zellen	15
3.4 CD8(+) T-Zellen bei der HIV- und der HCV-Infektion	17
3.5 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	17
3.6 NK-Zellen bei der HIV- und der HCV-Infektion	19
3.7 Dendritische Zellen	19
3.8 Dendritische Zellen bei der HIV-Infektion	22
3.9 Monozyten	23
3.10 Zytokine	24
4 Ziele der Arbeit	26
II MATERIAL	29
1 Geräte	29
2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	30
2.1 Separationsreagenzien und Puffer	31
3 Antikörper	31
3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie	31
3.2 Antikörper für den ELISpot	32
4 Zytokine	32
5 Peptide	32
6 Kits	32
7 Primer und Sonden	33
8 Plasmide und Bakterien	34

9 Eukaryotische Zelllinien.....	34
10 Puffer und Medien	34
11 Untersuchungsmaterial.....	36
11.1 Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HCV-Infektion	36
11.2 Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HIV-Infektion	37
III METHODEN	39
1 Zellkultur	39
1.1 Kultivierung der K562 Zelllinien	39
1.2 Inkubation HLA-E transfizierter K562-Zellen mit den Peptiden HIV p24 ₁₄₋₂₂ und HCV p18 ₃₅₋₄₄	39
1.3 Kultivierung primärer Zellen	40
2 Zellbiologische Methoden.....	40
2.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-Dichtegradienten- Zentrifugation nach Böyum	40
2.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer.....	41
2.3 Stimulation von PBMC mit LPS	42
2.4 Stimulation von NK-Zellen mit Peptidbeladenen HLA-E ^R - und HLA-E ^G -K562 Zellen	42
2.5 Generierung von <i>Monocyte-Derived-Dendritic-Cells</i> (MODC)	43
2.6 Stimulation von MODC mit NK / HLA-E K562 Überständen	44
3 Immunologische Methoden	44
3.1 Immunmagnetische Isolation von CD8(+) T- und NK-Zellen.....	44
3.2 Enzyme-Linked-Immunospot-Assay (ELISpot)	45
3.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA).....	46
3.4 Durchflusszytometrie (FACS)	47
3.4.1 Prinzip	47
3.4.2 Markierung von Zelloberflächenmolekülen.....	48
3.4.3 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen	49
4 Molekularbiologische Methoden	50
4.1 DNA-Extraktion	50
4.2 Extraktion viraler RNA	50
4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	51
4.4 Reverse Transkription und PCR	52
4.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	53
4.6 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	54
4.6.1 Aufreinigung mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit.....	54
4.6.2 Aufreinigung mittels PEG-Fällung	54
4.7 Klonierung eines DNA-Fragments	55
4.7.1 Ligation.....	55
4.7.2 Transformation von kompetenten JM109 Zellen	56
4.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	57
4.9 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzierung.....	57
4.10 Echtzeit PCR	58

4.10.1	Genotypisierung durch Hybridisierungssonden.....	58
4.10.2	HLA-B Genotypisierung mittels INNO-LiPA HLA-B.....	61
4.10.3	TNF- α Genotypisierung mittels <i>cytokine genotyping tray</i>	61
5	Statistische Methoden.....	61
IV	ERGEBNISSE.....	63
1	Untersuchung von HLA-E^G und HLA-E^R transfizierten K562 Zellen..	63
1.1	Stabilisierung der Oberflächenexpression von HLA-E ^G und HLA-E ^R durch die viralen Peptide HIV p24 ₁₄₋₂₂ und HCV p18 ₃₅₋₄₄	63
2	Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HCV-Infektion.....	65
2.1	HLA-E restringierte Erkennung des HCV p18 ₃₅₋₄₄ Peptids durch CD8(+) T-Zellen.....	65
2.1.1	Nachweis HLA-E restringierter CD8(+) T-Zellen mittels ELISpot	65
2.1.2	Mutationsanalyse des HCV p18 ₃₅₋₄₄ Peptidepitops.....	66
2.1.3	HLA-E restringierte T-Zellantwort und klinische Parameter der HCV-Infektion.....	67
2.1.4	HLA-A2 und HLA-E restringierte Erkennung des HCV p18 ₃₅₋₄₄ Peptids.....	69
2.1.5	HLA-E Genotypverteilung bei Patienten mit nachweisbarer HLA-E restringierter T-Zellantwort.....	70
2.2	Verteilung der HLA-E Genotypen bei HCV(+) Patienten.....	72
2.2.1	HLA-E Genotypverteilung in Patienten, die mit unterschiedlichen HCV-Genotypen infiziert sind.....	72
2.2.2	HLA-E Genotypverteilung bei Patienten mit chronischer HCV- Infektion im Vergleich zu Patienten mit spontaner Ausheilung der HCV-Infektion.....	74
3	Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HIV-Infektion	76
3.1	HLA-E restringierte Erkennung des HIV p24 ₁₄₋₂₂ Peptids durch CD8(+) T-Zellen.....	76
3.1.1	Nachweis HLA-E restringierter CD8(+) T- Zellen mittels ELISpot	76
3.1.2	HLA-E restringierte T-Zellantwort und klinische Parameter der HIV-Infektion	77
3.2	Modulation der NK-Zellantwort durch HLA-E.....	79
3.3	Einfluss von HLA-E auf den Crosstalk von NK-Zellen und DC	80
3.3.1	Expression von NKG2-Rezeptoren auf CD56(+) NK-Zellen.....	80
3.3.2	Einfluss von NK-Zellen auf die Ausreifung von MODC	81
3.3.3	Einfluss der HIV p24 ₁₄₋₂₂ vermittelten HLA-E Stabilisierung auf die Ausreifung von MODC.....	84
3.3.4	Untersuchung der Zytokinsekretion von HIV(+) und HIV(-) NK-Zellen	86
3.4	Einfluss von HLA-E auf die Sekretion von TNF- α	88
3.5	Verteilung von TNF- α Genotypen in HIV(+) Patienten.....	89
3.6	Assoziation anderer Gene des MHC- Komplexes mit HLA-E	91

V	DISKUSSION	93
	1. Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HCV-Infektion.....	93
	1.1 HLA-E restringierte Erkennung des HCV p18 ₃₅₋₄₄ Peptids durch CD8(+) T-Zellen	93
	1.2 Immungenetische Analyse der HCV(+) Patienten.....	96
	2. Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HIV-Infektion	101
	2.1 Assoziation von HLA-E Genotyp und sexueller Transmission von HIV-1	101
	2.2 Untersuchungen zum Crosstalk zwischen NK-Zellen und DC	105
VI	Literaturverzeichnis.....	111
VII	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	126
	1 Allgemeine Abkürzungen.....	126
	2 Abkürzungen der Aminosäuren	128
VIII	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	129

Zusammenfassung

Das nicht-klassische MHC-I Molekül HLA-E spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität und der zytotoxischen CD8(+) T-Zellantwort. Im Gegensatz zu klassischen MHC-I Molekülen ist HLA-E jedoch nur wenig polymorph. Bislang konnten zwei HLA-E Allele, das HLA-E^R (HLA-E*0101) und das HLA-E^G (HLA-E*0103) Allel, beschrieben werden. In vorangegangenen Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass HLA-E bei der HCV- und der HIV-Infektion verstärkt exprimiert vorliegt und über die Interaktion mit NKG2A-Rezeptoren die zytotoxische Aktivität NKG2A-positiver NK-Zellen gehemmt wird. Als möglichen zugrunde liegenden Mechanismus wiesen wir nach, dass das HC-Virus (HCV p18₃₅₋₄₄) und auch das HI-Virus (HIV p24₁₄₋₂₂) für ein Peptid kodieren, welches an HLA-E binden und dadurch dessen Expression auf der Zelloberfläche stabilisieren kann. Unklar war jedoch, welche weiteren regulatorischen und zytolytischen Immunfunktionen durch HLA-E / Peptid-Komplexe im Rahmen der HCV- und HIV-Infektion beeinflusst werden, insbesondere da beide Viren in der Lage sind, eine chronische Infektion zu etablieren.

Zunächst sollte im ersten Teil der Doktorarbeit die Rolle des HLA-E Moleküls bei der HCV-Infektion betrachtet werden. Da neben der Interaktion mit NKG2-Rezeptoren in der Literatur auch mehrfach die Interaktion von HLA-E / Peptid-Komplexen mit dem T-Zellrezeptor (TCR) zytotoxischer CD8(+) T-Lymphozyten beschrieben wurde, wurde untersucht, ob das HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid im Kontext von HLA-E durch zytotoxische CD8(+) T-Zellen von HCV(+) Patienten erkannt werden kann. HCV-spezifische HLA-E restringierte T-Zellen konnten bei 40 % der untersuchten HCV(+) Patienten, jedoch bei keinem Proband der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Eine mögliche funktionelle Relevanz dieser T-Zellen konnte dadurch belegt werden, dass Patienten mit HLA-E restringierten IFN- γ CD8(+) T-Zellantworten eine signifikant niedrigere HCV-Viruslast und erhöhte Serumspiegel der Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) aufwiesen als Patienten, die keine HLA-E restringierten T-Zellantworten zeigten. Die anschließende

immungenetische Analyse der in diese Studie eingeschlossenen Patienten ergab, dass die Träger des HLA-E^R / HLA-E^R Genotyps eine höhere Frequenz an HCV p18₃₅₋₄₄-spezifischen HLA-E restringierten T-Zellantworten aufwiesen als die Träger eines anderen HLA-E Genotyps. Eine Untersuchung der Verteilung der HLA-E Allele in einer größeren Kohorte HCV-infizierter Patienten zeigte zudem, dass Patienten, die das HC-Virus spontan eliminierten, signifikant häufiger den HLA-E^R/HLA-E^R Genotyp aufwiesen als Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit sollte die Rolle des HLA-E Moleküls bei der HIV-Infektion näher betrachtet werden. Da eine Assoziation des Polymorphismus im HLA-E Gen mit der sexuellen Transmission des HI-Virus beschrieben wurde, jedoch der zugrunde liegende Mechanismus dieser Assoziation bislang nicht aufgeklärt werden konnte, wurde analysiert, ob die HLA-E Allele die Immunantwort unterschiedlich modulieren. Es konnte gezeigt werden, dass das HIV p24₁₄₋₂₂ Peptid im Kontext von HLA-E durch zytotoxische CD8(+) T-Zellen von HIV(+) Patienten erkannt werden kann. Jedoch konnte weder die Assoziation mit klinischen Parametern der HIV-Infektion, noch eine differentielle T-Zellantwort nach Präsentation des HIV-Peptids durch die beiden HLA-E Moleküle nachgewiesen werden. Zudem konnte demonstriert werden, dass die HLA-E Allele die zytotoxische Aktivität und auch den Aktivierungszustand von NK-Zellen nicht unterschiedlich beeinflussten.

Anschließend wurde untersucht, inwiefern die HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelte Oberflächenstabilisierung von HLA-E den Crosstalk zwischen NK-Zellen und Dendritischen Zellen (DC) beeinflusst. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass aus Monozyten generierte DC (*monocyte derived dendritic cells*, MODC), die mit Zellüberständen aus der Kokultur von NK-Zellen mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Zellen stimuliert wurden, signifikant weniger MHC-I, HLA-DR und CD40 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten als MODC, die mit Überständen stimuliert wurden, die aus der Kokultur von NK-Zellen mit unbeladenen HLA-E^G-K562 Zellen stammten. Ebenfalls konnte demonstriert werden, dass MODC, die mit NK-Zellüberständen von HIV(+) Patienten stimuliert wurden, auf ihrer Zelloberfläche eine signifikant geringere Expression der Reifungsmarker MHC-I, HLA-DR, CD86 und CD40 aufwiesen,

als MODC, die mit NK-Zellüberständen von gesunden Probanden stimuliert wurden. Um näheren Aufschluss darüber zu erhalten, welche löslichen Mediatoren zu den beobachteten Effekten der verminderten Ausreifung von MODC führten, wurden anschließend die NK-Zellüberstände mittels ELISA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit HLA-E^G-transfizierten K562 Zellen signifikant weniger IFN- γ und TNF- α von NK-Zellen von HIV(+) Patienten sezerniert wurde als bei gesunden Probanden. Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen der Sekretion von IFN- γ und TNF- α und der Stabilisierung von HLA-E nachgewiesen werden.

Schließlich konnte eine kürzlich erschienene Arbeit zeigen, dass durch das Zytokin TNF- α die sexuelle Transmission von HIV-1 wesentlich beeinflusst wird. In der vorliegenden Dissertation gelang es, mit einer immungenetischen Analyse zu zeigen, dass eine signifikante Kopplung zwischen HLA-E Genotyp und TNF- α -308 Polymorphismus vorlag. Individuen, die homozygot das HLA-E^G Allel trugen, hatten häufiger einen „TNF- α *low producer*“ (TNF- α G/G) Genotyp als Patienten mit einer der beiden anderen HLA-E Genotyp Kombinationen. Zudem konnte bei Individuen mit homozygotem HLA-E^G Genotyp eine signifikant geringere Frequenz TNF- α positiver Monozyten im peripheren Blut nachgewiesen werden, als dies bei Individuen mit anderen HLA-E Genotypen der Fall war. Da keine Assoziation zwischen HLA-E Genotyp und dem gehäuften Auftreten weiterer bekannter, protektiver Wirtsfaktoren gefunden wurde, lassen die erbrachten Daten darauf schließen, dass die verminderte Produktion von TNF- α bei Individuen mit dem HLA-E^G/HLA-E^G Genotyp für die geringere Empfänglichkeit gegenüber einer HIV-Infektion verantwortlich ist.

I EINLEITUNG

1 Das Hepatitis C Virus (HCV)

Die Hepatitis C stellt eine Entzündung der Leber dar, die durch das Hepatitis C Virus (HCV) hervorgerufen wird. Bis zu ihrer molekularen Identifizierung 1989 [1] wurde diese Form der Hepatitis als NonA-NonB Hepatitis bezeichnet, zu der alle Erreger einer Leberentzündung gezählt wurden, die durch die Diagnostik für Hepatitis A und Hepatitis B Viren nicht erfasst werden konnten. Es zeigte sich, dass 90 % der NonA-NonB-Hepatitis auf eine Infektion mit HCV zurückzuführen sind [2]. Weltweit sind ca. 170 Mio. Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert, in Europa geht man von etwa 3 bis 5 Millionen Virusträgern aus.

1.1 Taxonomie

Das Hepatitis C Virus wird aufgrund seines einzelsträngigen RNA-Genoms in Plusstrangorientierung der Familie der Flaviviridae zugeteilt. Die Familie der Flaviviridae wird wiederum in die drei Genera Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus unterteilt. Aufgrund seiner molekularbiologischen Eigenschaften wurde HCV in die eigenständige Gattung „Hepaciviren“ eingeordnet.

1.2 Übertragung und Klinik

Die Übertragung von HCV erfolgt hauptsächlich über direkten Blutkontakt. Da das Virus erst 1989 entdeckt wurde und ein Screening der Blutkonserven erst Anfang der 90iger Jahre eingeführt werden konnte, ist ein Großteil der HCV-Infektionen bis zu diesem Zeitpunkt auf kontaminierte Blutprodukte zurückzuführen. Bei den heutigen Neuinfektionen stellt die Mehrfachbenutzung von kontaminiertem Spritzbesteck durch Drogenabhängige den Hauptübertragungsweg (80 %) dar. Jedoch ist ein Großteil der HCV-Infektionen (etwa 20 %) immer noch unbekanntem Ursprungs [3, 4]. Einzelne Ereignisse haben in der Vergangenheit zur lokalen Verbreitung von HCV beigetragen. So kam es Ende der 70iger Jahre im Rahmen einer Anti-D Immunprophylaxe in der

DDR [5-7] und in Irland [8] zu HCV-Infektionen von schwangeren Frauen. Etwa 75 % der HCV-Infektionen verlaufen primär ohne Krankheitszeichen. Nach einer Inkubationszeit von sechs bis acht Wochen tritt bei der Mehrheit der Patienten eine leicht verlaufende Leberentzündung auf, ein Drittel der Patienten klagt in dieser Zeit über grippeartige Symptome. Bis zu 75 - 80% der akut HCV-Infizierten entwickeln eine chronische HCV. Über einen Zeitraum von 20-30 Jahren kommt es dann bei etwa 10 - 20 % der chronisch Erkrankten zu einer Leberzirrhose und bei ca. 1 - 5 % zu einem hepatozellulären Karzinom. Die chronische HCV gilt als eine Hauptursache für das hepatozelluläre Karzinom und stellt die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation dar [9].

1.3 Aufbau des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist ein umhülltes Virus mit einem Durchmesser von 40-50nm. In die Hüllmembran, die sich von der Wirtszellmembran ableitet, sind die viralen Oberflächenproteine E2 (gp70) und E1 (gp33) eingelagert (Abb. 1). Das virale RNA-Genom wird von einem sphärischem Kapsid, das aus dem viralen C-Protein gebildet wird, umgeben. Das Genom des Hepatitisvirus besteht aus einer einzelsträngigen RNA in Positivorientierung, was bedeutet, dass sie direkt als mRNA fungieren und von der zellulären Translationsmaschinerie in Proteine übersetzt werden kann.

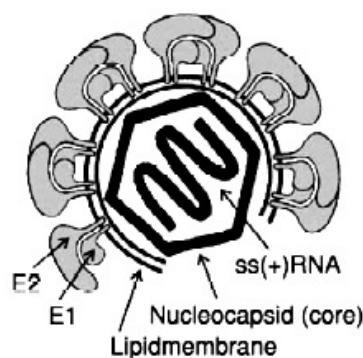


Abb. 1: Schematische Darstellung des Hepatitis-C Virus (nach [10]).

Die Größe des HCV-Genoms umfasst ca. 9,6 kb und enthält einen offenen Leserahmen, der am 5' und am 3' Ende von nicht-translatierten Regionen (UTR) flankiert wird (siehe Abb. 2). Die 5'-UTR hat die Funktion einer *internal ribosome entry site* (IRES), welche die Bindung der ribosomalen Untereinheiten

vermittelt und wichtig für die regulierte Translation des Polyproteins ist. Die 3'-UTR enthält eine Reihe von Uridin- und Adenosinresten, die vermutlich bei der Initiation der Replikation des (-) Stranges eine wichtige Rolle spielen. Der offene Leserahmen kodiert ein lineares Polyprotein von ca. 3010 Aminosäuren. Die Reihenfolge der Gene auf dem Genom von 3' nach 5' umfasst die Strukturproteine C-E1-E2 und anschließend die Nichtstrukturproteine NS2 bis NS5B.

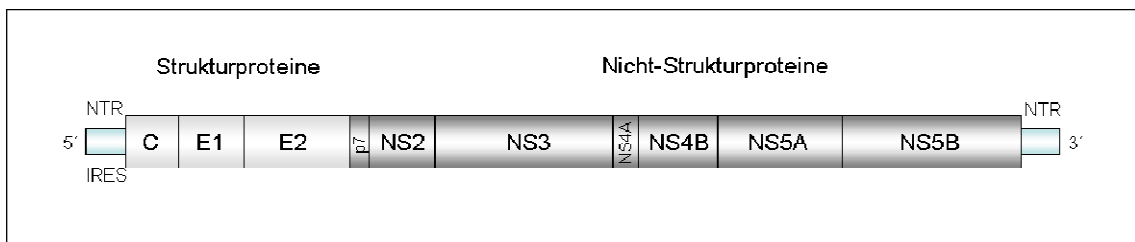


Abb. 2: Genomorganisation des Hepatitis-C Virus (nach [11]).

Das virale Polyprotein wird durch zelluläre und virale Proteasen in die einzelnen, funktionell aktiven Bestandteile gespalten. Die zelluläre Signalase, die mit der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) assoziiert ist, schneidet ausschließlich an Erkennungsstellen des Vorläuferprodukts der Strukturproteine und am Übergang zwischen dem p7 und dem NS2-Protein. Die Prozessierung der Nichtstrukturproteine erfolgt durch viruscodierte Proteasen.

1.4 Replikation

HCV repliziert vor allem in Hepatozyten; jedoch konnte HCV-RNA auch in hämatopoetischen Zellen, besonders in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nachgewiesen werden [12, 13]. Obwohl die Rezeptoren für die Adsorption des Virus an die Zelloberfläche noch nicht eindeutig bekannt sind, konnte über *in vitro* Versuche die Interaktion des HCV E2-Oberflächenproteins mit dem zellulären Tetraspanin CD81 nachgewiesen werden [14]. Weitere potentielle HCV-Rezeptoren stellen der Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1 (SRBI) [15], LDL-R [16] und die *tight-junction* Proteine Claudin-1 [17] und Occludin [18] dar. Nachdem eine Rezeptorbindung erfolgt ist, gelangt das Virus durch Endozytose in die Zelle. Dort wird über das E1-Protein die Verschmelzung von Virus- und Endosomenmembran vermittelt und

das virale Capsid ins Zytoplasma freigesetzt. Da das virale Genom in Plusstrangorientierung vorliegt, kann es direkt als mRNA zur Proteinsynthese genutzt werden. Die Translation des Polyproteins wird durch Bindung der Ribosomen an die im 5'UTR liegende IRES-Sequenz vermittelt, und ein Signalpeptid, das im carboxyterminalen Bereich des C-Proteins lokalisiert ist, bewirkt anschließend den Transport des Translationskomplexes an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Zelluläre und virale Enzyme veranlassen nach erfolgter Translation des Polyproteins die Spaltung in die aktiven Virusproteine. Durch das Vorliegen der Nicht-Strukturproteine, insbesondere des NS4B-Proteins, wird die Bildung eines HCV-Replikationskomplexes initiiert. Dieser wird morphologisch als *membranous web* bezeichnet und leitet sich wahrscheinlich von den Membranen des ER ab [19, 20]. Liegt mit dem NS5 Protein die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase im Zytoplasma vor, erfolgt die Bildung neuer Virusgenome. Sie katalysiert die Synthese eines Negativstrang-RNA-Moleküls, das als Matrize für die Bildung weiterer Plusstränge dient, die als genomische RNA oder mRNA für die Synthese weiterer Virusproteine verwendet werden. Im Anschluss an die Synthese aller viralen Proteine und an die Genomreplikation erfolgt das *Assembly* und das *Budding* von HCV in das ER Lumen hinein. Im weiteren Transport durch den Golgi-Apparat werden die Membranproteine glykosyliert. Anschließend erfolgt die Freisetzung infektiöser Viruspartikel durch Fusion der Golgi-Vesikel mit der Plasmamembran.

1.5 Quasispezies und HCV-Genotypen

Das Hepatitis C Virus repliziert sehr effizient; die Produktion neuer Virionen wird auf bis zu 10^{12} Kopien / Tag geschätzt [21]. Dabei weist das Virus eine sehr hohe Mutationsrate auf. Diese Basenveränderungen entstehen bei der Replikation und sind bedingt durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase. Diese besitzt, im Gegensatz zu zellulären DNA-Polymerasen, keine *proof-reading* Aktivität, was zur Folge hat, dass Fehlpaarungen während der Replikation nicht korrigiert werden können. Die daraus resultierende Fehlerrate wird auf 10^{-4} bis 10^{-5} Nukleotidaustausche pro Replikationszyklus geschätzt. Bedingt durch die hohe Replikationseffizienz von HCV und der Fehlerrate der

viralen Polymerase kommt es innerhalb eines Patienten zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Varianten. Diese Population wird insgesamt als Quasispezies bezeichnet [22]. Die Variabilität der Quasispezies im Vergleich zur Konsensussequenz beträgt in den meisten Genomregionen nicht mehr als 5 %. Die genetische Diversität des Hepatitis C Virus führte zur Unterscheidung von bislang 6 HCV-Genotypen, die wiederum in mindestens 30 weitere Subtypen unterteilt werden können [23]. Isolate des gleichen Genotyps weisen hierbei eine Sequenzhomologie von mindestens 72 % bezogen auf das Gesamtgenom auf; eine Sequenzhomologie zwischen 75 % und 86 % klassifiziert das Isolat als identischen Subtyp. Es zeigt sich eine unterschiedliche geographische Verteilung der Genotypen und Subtypen: in Nordamerika und Mitteleuropa findet man hauptsächlich die Genotypen 1, 2 und 3, in Nordafrika ist dagegen der Genotyp 4 weit verbreitet. Die Genotypen 5 und 6 kommen überwiegend in Südafrika, Australien und Hongkong vor. In Deutschland überwiegen die HCV-Subtypen 1a und 1b, bei intravenös Drogenabhängigen zeigt sich zudem eine Häufung des HCV-Subtyps 3a. Die verschiedenen Genotypen des Hepatitis C Virus scheinen einen Einfluss auf das Therapieansprechen der Patienten zu haben. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ein dauerhaftes Therapieansprechen bei Patienten, die mit HCV Genotyp 2 oder 3 infiziert sind (76 - 84 %) wahrscheinlicher ist als bei Patienten, die mit HCV-Genotyp 1 oder 4 infiziert sind (42 - 52 %).

2 Das humane Immundefizienz Virus (HIV)

Die erworbene Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) wurde erstmals 1981 bei einer Gruppe homosexueller Männer, die schwere opportunistische Infektionen wie z.B. das Kaposi-Sarkom aufwiesen, beschrieben. Im Jahr 1983 konnte schließlich das Humane Immunschwäche Virus (HIV) als auslösender Erreger von AIDS identifiziert werden. Weltweit sind ca. 33 Millionen Menschen mit HIV infiziert, die Neuinfektionsrate liegt bei 2,7 Millionen pro Jahr. In Deutschland lebten Ende 2009 67.000 Menschen mit HIV / AIDS und die Zahl der neuinfizierten Menschen lag im Jahr 2009 bei 3.000 [24, 25].

2.1 Taxonomie

Das HI-Virus wird aufgrund seiner Genomorganisation in die Familie der Retroviridae eingeordnet. Diese unterteilt sich wiederum in sieben verschiedene Genera, wobei das HI-Virus zur Gattung der Lentiviren gezählt wird. Es sind zwei Subtypen von HI-Viren bekannt, die als HIV-1 und HIV-2 bezeichnet werden. Der größte Teil der weltweiten Erkrankungen ist auf das HIV-1 Virus zurückzuführen, welches wahrscheinlich vor Jahrzehnten vom Schimpansen auf den Menschen übertragen wurde. Aufgrund von Sequenzunterschieden wird HIV-1 in Untergruppen unterteilt. Die häufigsten Subtypen sind der Subtyp M, Subtyp O und Subtyp N. Die HIV-2 Infektion war ursprünglich auf Westafrika beschränkt, breitet sich jedoch mittlerweile auch in Indien aus [26]. Sie wurde vermutlich von Mangaben auf den Menschen übertragen.

2.2 Übertragung und Klinik

Die drei Hauptübertragungswege des HI-Virus sind die Übertragung durch Sexualkontakte, Blut und die vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind. Mit 80 % der Fälle stellt jedoch die homo- oder heterosexuelle Transmission von HIV den Hauptübertragungsweg dar [24]. Die höchsten Viruskonzentrationen befinden sich im Blut und in der Samenflüssigkeit [27]. Die Effizienz der HIV-Übertragung ist im Wesentlichen abhängig von der Virusmenge in der Samen- oder Vaginalflüssigkeit. Ebenfalls steigern Geschlechtskrankheiten und Entzündungen das Risiko einer HIV-Infektion, da so die mukosale Barriere des Genitaltraktes leichter überwunden werden kann. Die Übertragung über das Blut stellt den Hauptinfektionsweg bei i.v. Drogenkonsumenten durch die Benutzung von verunreinigtem Spritzbesteck dar. Infektiöse Blutprodukte stellen in Deutschland ein zu vernachlässigendes Infektionsrisiko dar, da alle Blutspenden seit 1985 auf Antikörper gegen HIV getestet werden. Die Übertragung von HIV durch die Mutter auf das Kind kann über die Plazenta, die mütterliche Schleimhaut, die Geburt und durch die Muttermilch erfolgen. Ohne Maßnahmen zur Prophylaxe liegt die Transmissionsrate bei ca. 40 %, jedoch kann durch verschiedene Maßnahmen,

wie die Geburt durch einen Kaiserschnitt oder Stillverzicht, die Mutter-Kind Transmissionsrate auf 1 - 2 % gesenkt werden [27]. Nach der Übertragung infiziert das HI-Virus Zellen, die das CD4 Oberflächenmolekül exprimieren, insbesondere CD4(+) Lymphozyten (T-Helferzellen). Diese Phase der Primärinfektion verläuft häufig inapparent oder mit Grippe-ähnlichen Symptomen. Die hohe Virusreplikation führt zum Zelltod der infizierten Zellen und zu einer stetigen Neuinfektion von CD4(+) T-Zellen, so dass ein Abfall der CD4(+) Zellzahl und sehr hohe Virustiter von 10^6 - 10^8 Partikel/ml Blut nachgewiesen werden können. Im Anschluss an die Primärinfektion sinkt die Viruskonzentration im peripheren Blut und es schließt sich eine symptomfreie Latenzphase an. Infolge der stetigen Virusreplikation kommt es zu einem weiteren Abfall der CD4(+) T-Zellzahl, wobei bei einer T-Helferzahl von $<200/\mu\text{l}$ zunehmend opportunistische Erkrankungen und AIDS-definierte Erkrankungen auftreten können.

2.3 Aufbau des HI-Virus

Das HI-Virus ist ein umhülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 100 nm (Abb. 3). In die Hüllmembran sind die viralen Oberflächenglykoproteine gp120 und gp41 eingelagert, von denen gp41 ein Transmembranprotein darstellt, während das externe gp120 nicht-kovalent mit gp41 verbunden ist. Die Virushülle, die sich von der Wirtszellmembran ableitet, enthält verschiedene Proteine der Wirtszelle wie z.B. HLA-Klasse-I und -II Moleküle, sowie Adhäsionsproteine, die das Anheften an Zielzellen erleichtern. Die Matrixproteine (p17) kleiden die Innenseite der Virushülle aus. Das konische Kapsid im Inneren des Partikels besteht aus den Kapsidproteinen (p24) und enthält zwei virale RNA-Genome, die im Komplex mit den Nukleokapsidproteinen (p7) vorliegen. Das Link-Protein (p6) verbindet das Kapsid mit der Hüllmembran. Das Viruspartikel enthält auch Enzyme, die für die Replikation benötigt werden, wie die Reverse Transkriptase (p66), die Integrase (p32) und die Protease (p11).

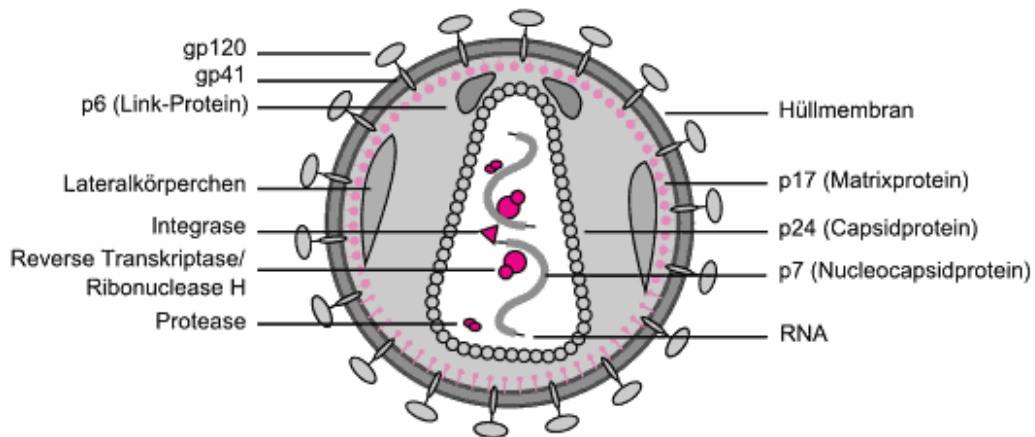


Abb. 3: Schematische Darstellung des HI-Virus (aus [26]).

Das 9,6 kbp große Genom von HIV-1 besteht aus einzelsträngiger RNA. Die Genomorganisation aller infektiöser Retroviren weist das Aufbauschema 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' auf. Komplexe Retroviren wie die Lentiviren haben jedoch weitere regulatorische und akzessorische Gene (Abb. 4). Die am 5' und am 3' Ende liegenden LTR- (*long terminal repeats*) Regionen stellen wichtige Kontrollsequenzen dar, die für die reverse Transkription und für die Integration in das Wirtszellgenom essentiell sind. Zu den gruppenspezifischen Antigenen (gag) zählen die Matrix-, Capsid-, Nucleocapsid- und die Linkproteine der infektiösen Viren. Sie werden als gemeinsames Vorläuferprodukt gebildet, das von der viralen Protease gespalten wird.

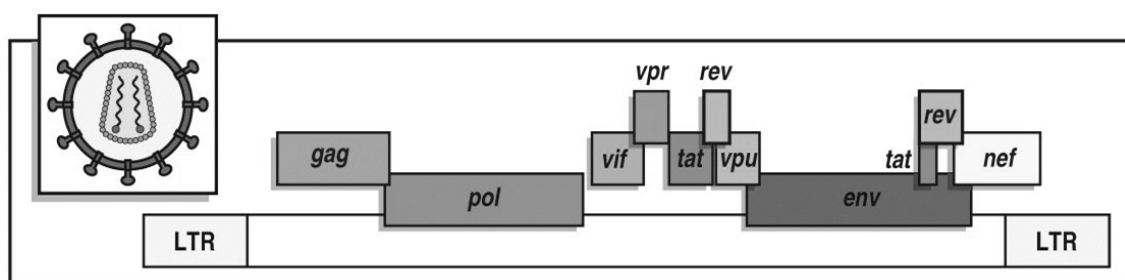


Abb. 4: Genomorganisation des HI-Virus (aus [28]).

Die Gene des gag / pol-Vorläuferproteins kodieren für die Synthese der viralen Protease, der Reversen Transkriptase und der Integrase und werden als Fusionsprotein zwischen den gag-Proteinen im aminoterminalen Bereich und den folgenden pol-Domänen synthetisiert. Die virale Protease (p11) ist für die Prozessierung der Vorläufer-Virusproteine in ihre aktive Form verantwortlich.

Die Reverse Transkriptase kann als RNA- und als DNA-abhängige DNA-Polymerase aktiv sein und ist verantwortlich für das Umschreiben der viralen RNA in provirale DNA. Die Integrase integriert die lineare, doppelsträngige Virus-DNA in die Wirtszell-DNA. Die *env*-Gene kodieren für die Oberflächenglykoproteine des HI-Virus. Diese werden als gemeinsames Vorläuferprodukt (gp160) synthetisiert und anschließend in ER und Golgi-Apparat in den externen Teil (gp120) und den transmembranen Teil (gp41) durch eine zelluläre Protease gespalten. Das gp120-Protein weist 5 hochvariable Bereiche, die für die Bildung gp120-spezifischer Antikörper verantwortlich sind, auf. Dieser Selektionsdruck und die hohe genetische Variabilität der Retroviren (durch die fehlende *proof-reading* Aktivität der Polymerase) führen zu einer kontinuierlichen Bildung neuer HIV-Varianten, um der Erkennung durch Immunglobuline zu entgehen. Tat (*transactivator of transcription*) und rev (*regulator of expression of virion proteins*) sind regulatorische Proteine, die im Zellkern akkumulieren und an bestimmte Stellen der viralen RNA binden. Das transaktivierende tat-Protein verstärkt die Transkription des LTR-Promotors um ein Hundertfaches. Des Weiteren wird ein Teil der tat-Proteine nach der Synthese von der Zelle sezerniert. Diese können mit Integrinen auf der Oberfläche anderer Zellen interagieren und sind so vermutlich an verschiedenen Vorgängen der HIV-Pathogenese beteiligt. Rev ist ein posttranslational wirkender Transaktivator, der für die zeitliche Regulation der Genexpression essentiell ist und beinhaltet ein nukleäres Exportsignal, das den Kernexport von mRNAs vermittelt. Das nef (*negative factor*)-Protein wird früh während des Replikationszyklus produziert und bewirkt die Herabregulation von CD4 und HLA-Klasse-I Molekülen um der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten zu entgehen. Des Weiteren beeinflusst es die Aktivierung von T-Zellen, indem es mit verschiedenen Proteinen interferiert, die intrazellulär in Signaltransduktionsketten involviert sind. Vpr (*viral protein rapid*) ist am Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern beteiligt und kann ebenfalls als Transaktivator wirken. Das vpu (*viral protein out*)-Protein scheint eine wichtige Rolle beim „*Budding*“ der Viren zu spielen und das vif (*viral infectivity factor*)-Protein bildet einen Komplex mit dem zellulären Inhibitor

APOBEC3G [29], sodass dieser keinen Einfluss auf die Virusreplikation nehmen kann.

2.4 Replikationszyklus von HIV

Bereits 1984 wurde das CD4-Molekül, welches unter anderem auf T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert wird, als Rezeptor für HIV-1 und HIV-2 identifiziert [30, 31]. Die Interaktion des viralen Oberflächenproteins gp120 mit dem CD4-Rezeptor ist jedoch nicht allein für die Adsorption der HIV-Partikel an die Zielzelle verantwortlich. Die Bindung an den CD4-Rezeptor induziert eine Konformationsänderung im gp120 Molekül, die dann eine Interaktion mit dem Korezeptor CCR5 oder CXCR4 ermöglicht. Durch die Interaktion mit dem Korezeptor wird eine Konformationsänderung im transmembranen gp41 ausgelöst. Es kommt zur Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtszellmembran, und das virale Kapsid gelangt ins Zellinnere. Das RNA-Genom des HI-Virus wird nun durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Voraussetzung für die erfolgreiche Replikation des HI-Virus ist die Integration der proviralen DNA in das Wirtszellgenom durch die Integrase. Diese vermittelt die Translokation des sogenannten Präintegrationskomplexes in den Zellkern und die Integration der Virus-DNA in das Zellgenom. Nach der Integration kann das Provirus über Monate oder Jahre im Genom der Wirtszelle verbleiben und eine latente Infektion verursachen. Erst mit der Aktivierung der Zielzelle kommt es zur Transkription der Provirus-DNA und es erfolgt die Synthese der frühen regulatorischen Proteine tat und rev, die die Aktivität der Expression und Replikation beeinflussen. Dadurch kommt es zur verstärkten Transkription, und die daraus resultierenden mRNAs dienen sowohl zur Translation der Strukturproteine, der akzessorischen Polyproteine und auch als Virusgenome. Die gebildeten viralen Bestandteile lagern sich nun an der Plasmamembran zusammen, und es kommt zur Knospung unreifer Viruspartikel. Dies führt schließlich zum programmierten Zelltod. Bei der anschließenden Reifung im freigesetzten Viruspartikel werden die Vorläuferproteine durch die virale Protease prozessiert und die Virionen werden infektiös.

3 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere hat im Laufe der Evolution verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, um eindringende Pathogene wie Viren unschädlich zu machen. Es kann in zwei Komponenten unterteilt werden: Die unspezifische (angeborene) Immunreaktion und die spezifische (erworbene) Immunreaktion. Die initiale, unspezifische Immunantwort umfasst sowohl zelluläre (z.B. Natürliche Killerzellen (NK) und Makrophagen) als auch lösliche Bestandteile (Zytokine / Chemokine). Die erworbene Immunantwort stellt den Antigen-spezifischen Arm des Immunsystems dar und besteht ebenfalls aus zellulären (B- und T-Zellen) und humoralen (Antikörper) Komponenten. Forschungsarbeiten 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 Viren wie HCV und HIV, eine chronische Infektion zu etablieren. Die Mechanismen, über die die Viren dem Immunsystem entgehen, sind vielfältig und momentan nur unvollständig verstanden. Vieles deutet darauf hin, dass diese beiden Viren in der Lage sind, sowohl mit der angeborenen, als auch mit der adaptiven Immunität zu interferieren. So wurde mehrfach eine gestörte Funktion der Natürlichen Killerzellen bei der HCV- als auch bei der HIV-Infektion [32-34] berichtet. Bedeutenderweise zeigte sich, dass diese Viren die Antigenpräsentation durch das nicht-klassische MHC-I Molekül HLA-E beeinflussen können. HLA-E Molekülen kommt eine wichtige Bedeutung in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort zuteil, da sie sowohl mit NK-Zellrezeptoren auf NK-Zellen und Lymphozytensubpopulationen, als auch mit dem T-Zellrezeptor auf CD8(+) T-Lymphozyten interagieren können.

3.1 *Major histocompatibility complex (MHC) Moleküle*

Die über 200 Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) befinden sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Sie werden als HLA-(engl.: *human leukocyte antigen*) Locus bezeichnet und können in verschiedene Cluster unterteilt werden, welche die Gene für MHC-Klasse-I,

MHC-Klasse-II und MHC-Klasse-III Moleküle umfassen. Die meisten Gene des MHC-Lokus sind hoch polymorph und kodieren für Proteine, die an der Antigen-Prozessierung und Präsentation beteiligt sind. MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Moleküle stellen Transmembranglykoproteine dar, die in der Lage sind, T-Zellen spezifische Peptide zu präsentieren. MHC-Klasse-III Gene kodieren für Proteine mit unterschiedlichen Funktionen in der Immunantwort. Beispielsweise sind hier Gene für die Komplementfaktoren C4 und C2 und für die Zytokine *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) und Lymphotoxin lokalisiert (Abb. 5). Da die Gene im MHC-Lokus dicht gepackt vorliegen, werden sie aufgrund der sehr geringen Rekombinationsrate des MHC-Lokus zusammen als Haplotyp vererbt. Dieses Phänomen wird auch als *genetic linkage disequilibrium* bezeichnet.

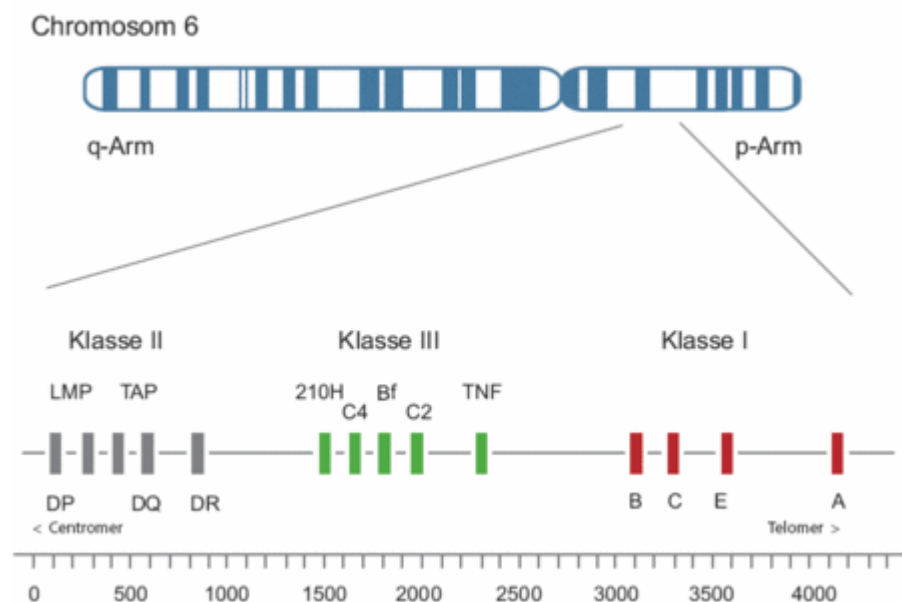


Abb. 5: Genetische Organisation des humanen MHC-Lokus auf Chromosom 6 (nach [35]).

Bestimmte HLA-Allele sind mit dem Verlauf chronischer Virusinfektionen und Autoimmunerkrankungen assoziiert. Die HIV-Infektion scheint durch HLA-B Allele wesentlich beeinflusst zu werden. Beispielsweise können das HLA-B27 und das HLA-B57 Molekül mit einem langsameren Fortschreiten des Immundefekts assoziiert werden, die Moleküle HLA-B35 und HLA-B37 sind hingegen mit einem raschen Progress assoziiert, da über diese HLA-Moleküle relevante T-Zellepitope nicht präsentiert werden können [36, 37]. Auch bei der

HCV-Infektion scheinen HLA-B Allele eine Rolle zu spielen. McKiernan et al. zeigten in einer irischen Kohorte, dass Patienten die das HC-Virus eliminieren konnten, neben HLA-A03 und Cw01 häufiger das Allel HLA-B27 aufweisen [38].

3.2 MHC-Klasse-I Moleküle

MHC-I Moleküle können in die Gruppe der klassischen und nicht-klassischen Moleküle unterschieden werden. Der Begriff klassische MHC-I Moleküle umschreibt die drei hoch polymorphen Moleküle HLA-A, -B und -C, die auf allen humanen Zellen exprimiert werden und die eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Fremdmolekülen spielen. Als nicht-klassische MHC-I Moleküle werden die wenig polymorphen Moleküle HLA-E, -F und -G zusammengefasst, die aber jeweils eine spezifische Rolle in der Immunantwort spielen.

3.2.1 Das nicht-klassische MHC-I Molekül HLA-E

HLA-E ist ein heterodimeres Molekül, das sich aus einer alpha-Kette des HLA-E Moleküls (42 kDa) und der leichteren beta-2 Mikroglobulin Untereinheit (12 kDa) zusammensetzt [39]. Die Oberflächenexpression des HLA-E Moleküls ist abhängig von der Bindung nonamerer Peptide, die sich von der Signalsequenz klassischer MHC-I und des nicht-klassischen MHC-I Moleküls HLA-G ableiten [40-42]. Nach der Proteinbiosynthese der MHC-I Moleküle HLA-A, -B, -C und -G werden deren ER-Signalsequenzen durch eine Signalpeptidase an der Membran des Endosomatischen Retikulums (ER) abgespalten und ins Cytosol entlassen, wo die weitere Prozessierung des Fragments durch das Proteasom erfolgt. Die daraus resultierenden Peptide werden über einen „*transporter-associated with antigen-processing*“ (TAP)-abhängigen Mechanismus in das ER-Lumen transportiert, binden dort an neusynthetisierte HLA-E Moleküle und stabilisieren diese, so dass der Peptid / MHC-I Komplex über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert werden kann.

Bislang sind drei Rezeptoren für HLA-E bekannt: die C-Typ-Lektin Rezeptoren CD94 / NKG2A und CD94 / NKG2C (siehe NK Zellen) und der T-Zellrezeptor (siehe CD8(+) T-Zellen). Da die Expression von HLA-E abhängig von dem Vorhandensein der Signalpeptide von HLA-A, -B, -C und -G ist, können NK-

Zellen über die CD94 / NKG2-Rezeptoren die Expression von HLA-A, -B, -C und -G via HLA-E kontrollieren [43]. Einige Viren haben eine Strategie entwickelt, um der Erkennung durch NK-Zellen zu entkommen, indem sie HLA-E Moleküle mit eigenen Peptiden stabilisieren. Erstmals konnte dies am Beispiel des humanen Zytomegalievirus (HCMV) beschrieben werden. HCMV kodiert für ein Peptid (abgeleitet vom gpUL40), das homolog zur Signalsequenz VMAPRTLIL des klassischen MHC-I Moleküls HLA-Cw03 ist. Durch diesen Mechanismus können HCMV-infizierte Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen geschützt werden. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich eine erhöhte intrahepatische Expression von HLA-E bei chronisch HCV-infizierten Patienten nachweisen. Als einen möglichen zugrunde liegenden Mechanismus wiesen wir nach, dass das Hepatitis C Virus für ein Peptid (HCV Core p18₃₅₋₄₄) kodiert, welches an HLA-E binden und dadurch stabilisieren kann [44]. Ebenso konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die HIV-1 Infektion mit einer erhöhten HLA-E Expression auf CD4(+) T-Zellen assoziiert ist und eine *in vitro* Infektion von Lymphozyten mit HIV zu einer verstärkten HLA-E Expression führt. Auch hier zeigte sich, dass das HI-Virus für ein Peptid (HIV p24₁₄₋₂₂) codiert, welches die HLA-E Expression stabilisiert und so durch Interaktion mit dem hemmenden NKG2A-Rezeptor der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität entgeht [45]. Interessanterweise stellen das HCV Core p18₃₅₋₄₄ und auch das HIV p24₁₄₋₂₂ Peptid gut untersuchte T-Zellepitope dar. Beispielsweise wurde mehrfach gezeigt, dass das aus dem Kapsidprotein p24 des HIV-Virus abgeleitete Peptid HIV p24₁₄₋₂₂ durch zytotoxische T-Lymphozyten und auch von T-Helferzellen erkannt wird [46-49]. Ebenso konnte für das HCV Core p18₃₅₋₄₄ Peptid gezeigt werden, dass HLA-A2 restringierte, zytotoxische T-Zellen dieses Epitop erkennen [50].

Im Gegensatz zu klassischen MHC-I Molekülen ist HLA-E nur wenig polymorph. Bisher wurden zwei HLA-E Allele beschrieben, die sich in einer Aminosäure an Position 107 des Proteins unterscheiden. Das HLA-E^R Allel (HLA-E*0101) weist an dieser Stelle die Aminosäure Arginin auf, wohingegen im HLA-E^G Allel (HLA-E*0103) die Aminosäure Arginin zu Glycin substituiert ist. Interessanterweise führt diese Substitution unabhängig vom gebundenen Peptid zu einer höheren Oberflächenexpression des HLA-E^G / Peptid Komplexes als die des HLA-

E^R / Peptid Komplexes. Des Weiteren zeigt das HLA- E^G Allel eine signifikant höhere Bindungsaffinität für Peptide, die sich von der Signalsequenz klassischer MHC-I Moleküle ableiten und weist eine höhere Schmelztemperatur als der HLA- E^R / Peptid Komplex auf [51]. Der Vergleich der Struktur des HLA- E^G und des HLA- E^R Moleküls zeigt, dass die Interaktion mit dem CD94 / NKG2 Rezeptor durch diesen Aminosäureaustausch nicht beeinflusst wird. In mehreren Forschungsarbeiten wurde beschrieben, dass der HLA-E Polymorphismus mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert ist. So zeigten Lajoie et al. in einer afrikanischen Kohorte, dass das HLA- E^G Allel mit einem vierfach verringertem Risiko einer HIV-1 Infektion assoziiert war [52].

3.3 CD8(+) T-Zellen

Die Hauptaufgabe von zytotoxischen T-Zellen (CTL) ist die Zerstörung Virus-infizierter oder maligner Zellen. Die Erkennung intrazellulärer Krankheitserreger erfolgt durch die Präsentation von Peptidfragmenten durch MHC-I Moleküle an der Zelloberfläche. Die Erkennung dieser fremden MHC-I / Peptid Komplexe durch zytotoxische CD8(+) T-Zellen führt zu einer Aktivierung der T-Zellen mit anschließender Lyse der Zielzelle. Diese wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt: Zum einen können T-Zellen Proteine wie Perforin und Granzym, die in Granula im Zytoplasma vorliegen, sezernieren. Perforine lagern sich in der Membran der Zielzelle ein und durchsetzen diese mit Poren. Durch diese gelangen Granzyme in das Zellinnere und können dort einen programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Diese lytischen Granula sind Membran-gebundene sekretorische Lysosomen, deren Membran Glykoproteine (LAMPs) enthält, darunter auch CD107a (LAMP-1). Nach Aktivierung der CD8(+) T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor kommt es durch die Fusion der granulären Membran mit der T-Zell-Membran zur Expression von CD107a auf der Zelloberfläche der T-Zellen. CD107a kann als Marker für die zytolytische Funktion durchflusszytometrisch gemessen werden. Auch können zytotoxische T-Zellen durch die Sekretion von Fas-Ligand über die Bindung an Fas-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen Apoptose auslösen. Des Weiteren können CD8(+) T-Zellen proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ , (IFN- γ),

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und - β (TNF- β) sezernieren, die einen Teil der nicht-zytotoxischen Immunantwort darstellen.

Nach ihrer Reifung im Thymus zirkulieren naive T-Zellen, also Zellen, die noch keinen Kontakt mit Antigen hatten, zwischen Blut und Lymphorganen. Erkennen sie ein spezifisches Antigen im Kontext von MHC-I Molekülen, kommt es zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen in Effektorzellen. Dieser Vorgang wird auch als T-Zell-Priming bezeichnet. Für die vollständige Aktivierung der T-Zellen benötigen diese drei Signale. Das erste stellt die Erkennung des MHC-I / Peptidkomplexes durch den T-Zellrezeptor und den CD8 Korezeptor dar. Das zweite Signal wird über kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7.2) oder CD86 (B7.1) auf denselben APC übermittelt. CD80 und CD86 können mit CD28 auf den T-Zellen interagieren und somit die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) stimulieren. IL-2 ist ein autokrin wirkendes Zytokin, das als Wachstumsfaktor die Proliferation von T-Zellen unterstützt. Das dritte Signal, welches für die T-Zellaktivierung benötigt wird, stellt Interleukin-12 (IL-12) dar. Dieses wird von reifen dendritischen Zellen sezerniert, um eine starke Expansion und Effektorfunktion der T-Zellen zu erhalten [53]. Fehlt das zweite oder dritte Signal, führt die Antigenstimulation zur Toleranzinduktion in der T-Zelle [54].

Die Interaktion von HLA-E mit CD8(+) T-Zellen kann auf manchen Zellen über die C-Typ-Lektin Rezeptoren CD94 / NKG2A und CD94 / NKG2C, oder aber über den T-Zellrezeptor erfolgen. C-Typ-Lektin Rezeptoren sind Heterodimere aus einer NKG2 Untereinheit, die über Disulfid-Brücken mit CD94 verbunden sind. CD94 / NKG2A stellt einen hemmenden und CD94 / NKG2C einen aktivierenden HLA-E Rezeptor dar. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Rezeptor NKG2A eine wichtige Rolle bei der Regulation der CTL Funktion hat [55-57]. So konnten beispielsweise Speiser et al. bereits 1999 [58] 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 [57].

CD8(+) T-Zellen können auch über den $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor (TCR) mit HLA-E / Peptidkomplexen interagieren. So konnten Pietra et al. [59] zeigen, dass die Interaktion eines mit einem CMV-Peptid beladenen HLA-E Komplexes mit dem TCR zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten und der anschließenden Lyse der Zielzelle führte. Des Weiteren konnten HLA-E restringierte CD8(+) T-Zellen bei einem mit *Mycobacterium tuberculosis*-infizierten Patienten [60] und einer Kohorte von Patienten, die eine Lebendimpfung mit attenuierten *Salmonella enterica* erhalten hatten [61], nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit ist die Erkennung HLA-E restringierter Peptide durch CD8(+) T-Zellen von zentraler Bedeutung.

3.4 CD8(+) T-Zellen bei der HIV- und der HCV-Infektion

Die Rolle der CD8(+) T-Zellantwort bei der Virusinfektion zeigt deutlich, dass Virus-spezifische CTL für den Verlauf der HIV-, bzw. HCV-Infektion von wesentlicher Bedeutung sind. Schon im frühen Stadium der HIV-Infektion können HIV-spezifische CTL nachgewiesen werden, und mit ihrem Erscheinen geht die initiale Virämie zurück [62]. Ihre Bedeutung in der Immunpathogenese zeigt sich auch bei Betrachtung von sogenannten HIV-Langzeitüberlebenden: verglichen mit Patienten, die einen raschen Krankheitsverlauf aufweisen, findet sich bei Langzeitüberlebenden eine hohe Zahl HIV-spezifischer CTL mit breiter Spezifität gegen verschiedene Virusproteine [63].

Auch bei Patienten mit einer akuten Hepatitis C konnte gezeigt werden, dass die HCV-spezifische CTL-Antwort mit Ausheilung der HCV-Infektion assoziiert ist [64, 65]. Ebenfalls wurde berichtet, dass die Stärke der CTL-Antwort mit einem Rückgang der Virämie zusammenhängt [66, 67]. Obwohl die Rolle der CD8(+) T-Lymphozyten bei der persistierenden HCV-Infektion nur unzureichend aufgeklärt ist, weisen HCV-spezifische T-Zellen eine Vielzahl an Veränderungen in Phänotyp und Funktion auf [68, 69].

3.5 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen (CD3-, CD16+, CD56+) machen 5 - 15 % der mononukleären Zellen im peripheren Blut aus. Eine wesentliche Funktion der NK-Zellen stellt die

Zerstörung virusinfizierter oder transformierter Zellen ohne vorheriges Priming dar. Die Erkennung und Lyse der Zielzellen wird über zwei Mechanismen, die Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) und die natürliche Zytotoxizität, vermittelt. Die ADCC verläuft über die Aktivierung des CD16-(FcγRIII) Rezeptors der NK-Zellen. Diese binden und erkennen den Fc-Teil monomerer Antikörper, die die Zielzellen opsonieren und so die NK-Zellen zur Zytolyse der Zielzelle aktivieren. Da für die ADCC Antikörper der IgG-Klasse erforderlich sind, die nach Antigen-spezifischer Erkennung durch B-Zellen produziert werden, stellt die ADCC somit eine Verknüpfung zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem dar [28].

Als Teil des angeborenen Immunsystems exprimieren NK-Zellen im Gegensatz zu B- und T-Zellen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren [28]. Die Regulation der NK-Zellen erfolgt durch eine Vielzahl aktivierender und hemmender Rezeptoren (NKR). Die Balance dieser Signale vermittelt die so genannte Selbsttoleranz. Ein wichtiger Vertreter der humanen NKR sind die CD94 / NKG2 Rezeptoren, die zur Familie der C-Typ-Lectin-Rezeptoren gezählt werden. Diese werden mit Ausnahme von NKG2D als Heterodimere im Komplex mit CD94 auf der Zelloberfläche exprimiert [70, 71]. Das CD94 Molekül ist essentiell für die Oberflächenexpression von NKG2-Rezeptoren, da es der Stabilisierung des Komplexes dient. Es ist jedoch nicht an der Signaltransduktion beteiligt. Die Rezeptoren NKG2A und -B besitzen hemmende Eigenschaften, während den NKG2C, -H und -E Rezeptoren eine aktivierende Funktion zukommt. Der hemmende NKG2A und der aktivierende NKG2C Rezeptor binden an den gleichen Liganden, das nicht-klassische MHC-I Molekül HLA-E. Die verschiedenen Liganden, welche durch aktivierende NK-Zellrezeptoren erkannt werden, befinden sich auf nahezu allen Körperzellen. Um die unspezifische Zerstörung gesunder Zellen zu verhindern, exprimieren NK-Zellen auch hemmende Rezeptoren, die an MHC-I Moleküle auf der Zielzelle binden und somit eine zytotoxische Lyse der Zellen verhindern. Eine verminderte Expression von MHC-I Molekülen, hervorgerufen durch eine virale Infektion oder die Transformation der Zelle [72, 73], führt zur Zerstörung der Zielzelle durch die NK-Zelle. Die Lyse der Zielzellen erfolgt durch Ausschüttung von

Perforin und Granzym, kann aber ebenfalls durch FasL oder TRAIL vermittelt werden. Zusätzlich haben NK-Zellen eine wichtige immunmodulierende Funktion über die Freisetzung von Zytokinen, wie IFN- γ , TNF- α und IL-10. In der vorliegenden Arbeit sind der hemmende NK-Zellrezeptor CD94 / NKG2A und sein Ligand HLA-E von zentraler Bedeutung.

3.6 NK-Zellen bei der HIV- und der HCV-Infektion

Als Teil des angeborenen Immunsystems spielen NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen, da sie in der Lage sind, sowohl in der frühen Phase der Virusinfektion die virale Replikation einzudämmen, als auch eine starke adaptive Immunantwort zu induzieren [74].

Viren wie HIV und HCV haben allerdings verschiedenste Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort zu entgehen und eine chronische Viruspersistenz zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang wurde schon mehrfach von einer gestörten Funktion der NK-Zellen bei der Hepatitis C- [75-77] und der HIV-Infektion [32, 33, 78-80] berichtet. Ebenfalls konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass bei beiden Infektionen das nicht-klassische MHC-I Molekül HLA-E verstärkt exprimiert wird und dass HCV und HIV für Peptide (HCV p18₃₅₋₄₄ und HIV p24₁₄₋₂₂) kodieren, die an HLA-E binden und so die Oberflächenexpression von HLA-E stabilisieren können [44, 45]. Am Beispiel des humanen Cytomegalievirus konnte erstmals gezeigt werden, dass Viren diesen Mechanismus nutzen um die NK-Zellfunktion zu modulieren. Durch die verstärkte Expression von HLA-E an der Zelloberfläche kann über die Interaktion des HLA-E / Peptid-Komplexes mit NKG2A-Rezeptoren die zytotoxische Aktivität NKG2A-positiver NK-Zellen gehemmt werden [81, 82].

3.7 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) sind hoch spezialisierte Zellen des Immunsystems, die in der Lage sind, Antigene aufzunehmen und eine effektive Immunantwort gegen eindringende Pathogene zu induzieren [83]. DC entwickeln sich im Knochenmark aus CD34(+) pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen und gelangen als unreife Zellen mit dem Blut in fast alle

peripheren Gewebe (Abb. 6). Aus dem humanen Blut können zwei Subtypen von DCs isoliert werden: CD11c(+) (myeloide) DCs und CD11c(-) (lymphoide) DCs. Man vermutet, dass diese beiden Subtypen von unterschiedlichen Vorläufern abstammen, da sie unterschiedliche Oberflächenmarker exprimieren, sowie sich funktionell und auch hinsichtlich der Zytokinbildung und TLR-Expression unterscheiden [84, 85].

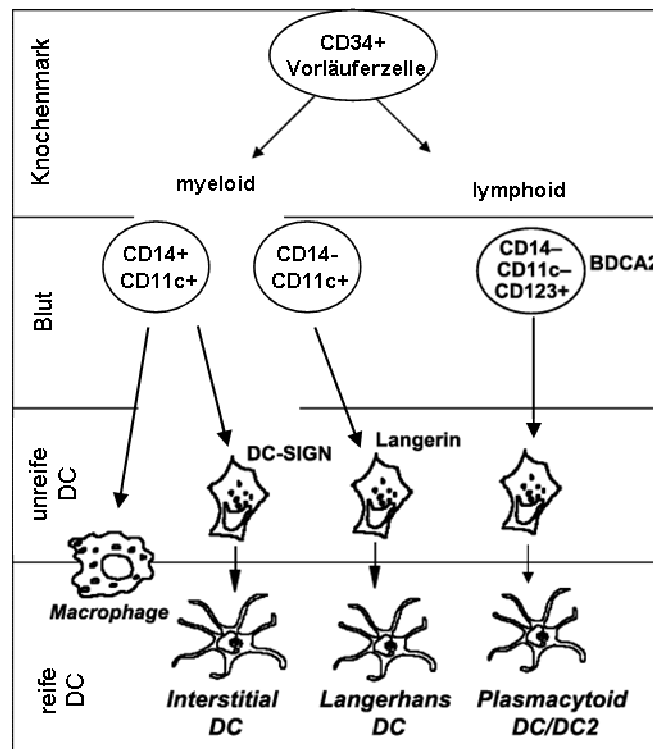


Abb. 6: DC-Populationen und deren Differenzierung aus CD34(+) Vorläuferzellen. Myeloide CD34(+)-Vorläuferzellen differenzieren zu Monozyten (CD14(+) CD11c(+)), welche sich entweder zu unreifen DC-SIGN exprimierenden, interstitiellen DC oder zu Makrophagen entwickeln können. CD14(-) CD11c(+) myeloide Vorläuferzellen können sich ebenfalls zu Langerin-exprimierenden Langerhans-Zellen differenzieren. DC, die von lymphoiden Vorläuferzellen abstammen, exprimieren BDCA-2 und werden plasmazytoide DC genannt (nach [86]).

Myeloide Vorläuferzellen können sich zu CD14(+) Monozyten oder CD14(-) Vorläuferzellen entwickeln. Unter dem Einfluss verschiedener Zytokine differenzieren sich aus diesen Vorläuferzellen, die im Blut zu finden sind, verschiedene Subtypen unreifer dendritischer Zellen mit unterschiedlicher Lokalisation im Gewebe. In der menschlichen Haut lassen sich zwei DC-Subtypen unterscheiden: epidermale Langerhans-DC und interstitielle

gewebeständige DC. Langerhans-DC liegen in der Haut verteilt und im mehrschichtigen Plattenepithel, das den weiblichen und männlichen Genitaltrakt auskleidet, vor [87]. Sie exprimieren unter anderem die Oberflächenmoleküle CD1a und Langerin und enthalten sogenannte Birbeck-Granula. Interstitielle DC sind in allen Geweben lokalisiert und unterscheiden sich von anderen DC-Subtypen durch die Expression des C-Typ-Lektin Rezeptors DC-SIGN. Lymphoide DCs, die auch als plasmazytoide DCs bezeichnet werden, können hauptsächlich im Blut und in lymphatischem Gewebe nachgewiesen werden. Sie sind die Hauptproduzenten von IFN- α und haben somit eine wesentliche Bedeutung in der angeborenen, antiviralen Immunabwehr [88]. Die in allen Geweben vorliegenden DC werden als unreife DC bezeichnet. Sie kontrollieren ihre Umgebung, indem sie permanent extrazelluläre Bestandteile aufnehmen, diese dann durch Proteolyse prozessieren und als Peptide an MHC Moleküle gebunden auf ihrer Zelloberfläche an T-Zellen präsentieren. Die Antigenaufnahme erfolgt konstitutiv über Makropinozytose oder Phagozytose. Ebenfalls können Antigene über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden [89]. Unreife DC weisen eine nur geringe Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen auf, so dass sie nicht in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren. Die Aktivierung der unreifen DC führt über eine Reihe von funktionellen und phänotypischen Veränderungen zur Umwandlung in Antigen-präsentierende DC, die dann primäre Immunantworten gegen die potentiellen Antigene induzieren können. Die Reifung kann durch endogene Stimuli, wie Antigenaufnahme und Virusreplikation, oder durch exogene Stimuli, wie Lipopolysaccharid (LPS), das Zytokin TNF- α und Prostaglandin hervorgerufen werden [87]. Reife DC verlieren die Fähigkeit Antigene mittels Endozytose und Phagozytose aufzunehmen, zeigen aber eine erhöhte Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD83, CD86 und CD40 [83]. Eine hochregulierte CCR7 Expression veranlasst reife DC dazu, das Gewebe zu verlassen und in die Lymphknoten zu wandern, wo sie hoch effizient ihre Antigene den T-Zellen präsentieren können. Die Ausreifung von DC kann durch Interaktion mit NK-Zellen induziert werden. Dies kann zum einen über direkten Zell-Zellkontakt und über die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ oder TNF- α geschehen [90]. Durch die

Aktivierung von DC sind NK-Zellen in der Lage, die adaptive Immunantwort zu regulieren. Mehrfach wurde von einem bi-direktionalen „Crosstalk“ zwischen NK-Zellen und DC berichtet, der die Ausreifung und Aktivierung beider Interaktionspartner maßgeblich beeinflussen kann [91-93]. Dieser Crosstalk kann in der frühen Infektionsphase im peripheren Gewebe, aber auch in sekundären Lymphorganen erfolgen und spielt eine wichtige Rolle, sowohl in der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort.

3.8 Dendritische Zellen bei der HIV-Infektion

Die wichtige Rolle von DC für die Abwehr viraler Infektionen wurde mehrfach in der Literatur beschrieben: Patienten, die eine spontane Ausheilung der Hepatitis C aufweisen oder in der Lage sind, die HIV-Replikation selbständig zu kontrollieren (*long-term non-progressor*), weisen eine starke CD4(+) und CD8(+) T-Zellantwort auf, die auf ein effizientes T-Zellpriming durch DC zurückzuführen ist. Dem Großteil der Patienten gelingt dies jedoch nicht, da die Viren durch eine Vielzahl von Mechanismen in der Lage sind, mit der Immunantwort zu interferieren. Dabei stellen auch DC einen wichtigen Angriffspunkt dar. Die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu einer gestörten Funktion von DC bei der HIV-Infektion führen, sind bislang nur teilweise bekannt. HIV(+) Patienten scheinen im Vergleich zu gesunden Probanden eine geringere Anzahl myeloider und plasmazytoider DC im Blut aufzuweisen [94, 95]. Auch weisen DC von HIV-infizierten Patienten eine gestörte Zytokinsekretion auf [96, 97]. So wurde bei HIV(+) Patienten einerseits von einer erhöhten Interleukin (IL)-10 und andererseits von einer verringerten IL-12 und Interferon (INF)- α Produktion bei den verschiedenen DC-Subtypen berichtet [98, 99]. Die veränderte Zytokinproduktion sowohl von DC als auch von NK-Zellen beeinflusst auch den Crosstalk zwischen NK-Zellen und DC. Beispielsweise wird durch die Sekretion von IL-12 das funktionelle Verhalten von NK-Zellen wesentlich beeinflusst [93, 100]. Ebenfalls fördern bestimmte Zytokine, wie z.B. TNF- α , die Ausreifung von DC. Dendritische Zellen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der sexuellen Übertragung von HIV-1. Man nimmt an, dass HIV nach Überquerung der mukosalen Barriere im männlichen oder weiblichen Genitaltrakt zunächst mit dendritischen Zellen interagiert.

Langerhans-Zellen, die im Epithel und / oder der Mukosa lokalisiert sind, scheinen bei der Initiierung der systemischen HIV-Infektion von großer Bedeutung zu sein [101-104]. Obwohl Langerhans-DC die für eine HIV-Infektion nötigen Rezeptoren CD4 und CCR5 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, werden sie nicht effizient mit HIV-1 infiziert [101]. Als mögliche Ursache hierfür gilt die Expression des Langerhans-DC spezifischen C-Typ-Lektins Langerin, das als natürliche Barriere gegen die HIV-Infektion bezeichnet wird. Die Interaktion von Langerin mit dem viralen Oberflächenglykoprotein gp120 führt zu dessen Internalisierung und darauf folgend zur Degradierung von HIV-1 in die so genannten Birbeck-Granula, so dass eine Infektion erschwert wird. Eine Blockierung von Langerin oder sehr hohe Viruskonzentrationen führen zur Überwindung dieses Schutzmechanismus und zur Infektion der Langerhans-DC mit anschließender Transmission von HIV-1 [105]. Zusätzlich scheint eine Aktivierung der Langerhans-DC durch das Zytokin TNF- α die Transmission von HIV-1 erheblich zu steigern [101]. Durch die Weitergabe von HIV-1 können unreife interstitielle DC, T-Zellen und Makrophagen, die im subepithelialen Bereich lokalisiert sind, infiziert werden. Unreife DC, die HIV Partikel über C-Typ-Lektin Rezeptoren oder andere Adhäsionsfaktoren aufgenommen haben, wandern in die lymphatischen Gewebe ein und leiten die HIV-1 Infektion von aktivierten CD4(+) T-Zellen ein.

3.9 Monozyten

Monozyten stellen als Vorläuferzellen der professionellen APCs wie Makrophagen und dendritische Zellen eine weitere wichtige Komponente des Immunsystems dar. Sie weisen vielfältige Funktionen auf, die von der Phagozytose und Digestion von Mikroorganismen und Geweberesten über die Präsentation von Antigenen bis zur Produktion und Sekretion von Entzündungsmediatoren reichen. Sie kontrollieren das Blut und Gewebe und bilden eine erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene. Spezifisch für diese Leukozytenpopulation ist die Expression des Oberflächenrezeptors CD14. CD14 ermöglicht als Korezeptor von *toll-like-receptor* (TLR)-4 und MD-2 die Erkennung des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS), einen Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien [106, 107]. Durch die Interaktion von CD14

mit dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) kann die Erkennung von LPS durch Monozyten ca. 1000fach verstärkt werden [108]. Die CD14 / LBP vermittelte Bindung von LPS an TLR4 / MD-2 induziert dann über verschiedene Signalwege unter anderem die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-8 [109].

3.10 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine (von etwa 20kDa), die von einer Vielzahl von Zellen sezerniert werden und das Verhalten anderer Zellen auf vielfältige Weise beeinflussen können. Sie üben ihre Wirkung über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf ihren Zielzellen aus, und können sowohl auf die produzierende Zelle selbst (autokrin), auf eine Zelle in der unmittelbaren Nachbarschaft (parakrin) oder auf eine weiter entfernt liegende Zelle (endokrin) wirken [28]. Zytokine spielen eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktoren bei der Hämatopoese und als wichtige Mediatoren bei Entzündungen und im Verlauf einer Immunantwort. Man unterscheidet vier Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) und Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF). Im Rahmen der natürlichen Immunität gelten Monozyten als Hauptproduzenten pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. In der vorliegenden Arbeit sind die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-10 von Bedeutung und werden deshalb im Folgenden konkreter erläutert.

IFN- γ kann von vielen Zellen des Immunsystems (NK-Zellen, T-Zellen, NKT-Zellen, Makrophagen) gebildet werden und hat eine entscheidende Bedeutung bei der Eindämmung von Infektionen [110]. IFN- γ kann über antivirale Effekte sowohl direkt die Virusreplikation infizierter Zellen hemmen [111], als auch die Effektorfunktionen der CD8(+) T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen steigern [28]. IFN- γ induziert auch eine verstärkte Expression von MHC-I Molekülen auf infizierten Zellen, so dass diese Zellen besser von CD8(+) T-Zellen erkannt und lysiert werden können.

Die TNF-Familie umfasst verschiedene Zytokine, die zusammen mit ihren Rezeptoren sowohl für die angeborene als auch für die erworbene Immunität eine wichtige Rolle spielen. TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin der TNF-Familie, das die lokale Eindämmung von Infektionen ermöglicht macht. Zum

Beispiel bilden Endothelzellen unter Einfluss von TNF- α vermehrt Adhäsions- und MHC-I Moleküle aus. Dies führt zur Rekrutierung von Effektorzellen an den Ort der Entzündung. Aktivierte T-Lymphozyten werden durch TNF- α zur Proliferation angeregt, und Monozyten / Makrophagen produzieren durch TNF- α Stimulation vermehrt IL-1 β , IL-6 und TNF- α [112, 113]. Die mononukleären Phagozyten stellen die wichtigsten Produzenten von TNF- α dar, jedoch produzieren auch NK-Zellen und T-Zellen dieses Zytokin. Der -308 A/G Polymorphismus im Promotor des TNF- α Gens scheint die Produktion von TNF- α zu beeinflussen [114-116]. Mehrere Arbeiten zeigten, dass das -308A Allel mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des TNF- α Gens [117, 118] und mit einer erhöhten TNF- α Produktion [115, 119] assoziiert ist. Der jeweils vorliegende TNF- α Genotyp ermöglicht damit eine Klassifizierung von Individuen in so genannte TNF- α high (TNF- α A/A, TNF- α G/A) und TNF- α low (TNF- α G/G) Produzenten. TNF- α spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der HIV-Replikation, und eine verstärkte TNF- α Synthese ist bei der HIV-Replikation zu beobachten. Das virale tat-Protein induziert über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B eine effektive Virusreplikation und über denselben Mechanismus gleichzeitig die Transkription des TNF- α Gens.

IL-10 ist ein immunregulatorisches Zytokin mit immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften, das von einer Vielzahl von Zellen (NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen) produziert werden kann. Wichtige Funktionen von IL-10 sind die Kontrolle und Beendigung von Entzündungsreaktionen durch die Hemmung von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen [120, 121]. Besonders die Funktionen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) werden durch IL-10 beeinflusst. So inhibiert IL-10 die Aktivierung und Ausreifung von DC, da die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD83 und CD86 gehemmt und somit ein effektives T-Zellpriming verhindert wird [121, 122].

4 Ziele der Arbeit

HLA-E spielt eine bedeutende immunmodulatorische Rolle bei der Regulation der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität und der zytotoxischen CD8(+) T-Zellantwort. Im Gegensatz zu klassischen MHC-I Molekülen ist HLA-E jedoch nur wenig polymorph und für das HLA-E Gen wurden bislang nur zwei HLA-E Allele, das HLA-E^G und das HLA-E^R Allel, beschrieben. In vorangegangenen Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass HLA-E bei der HCV- und der HIV-Infektion verstärkt exprimiert vorliegt und über die Interaktion mit NKG2A-Rezeptoren die Hemmung der zytotoxischen Aktivität NKG2A-positiver NK-Zellen vermittelt wird [44, 45]. Unklar ist jedoch, welche weiteren regulatorischen und zytolytischen Immunfunktionen durch HLA-E / Peptid-Komplexe im Rahmen der HCV- und HIV-Infektion beeinflusst werden, denn beide Viren sind in der Lage, eine chronische Infektion zu etablieren.

Ziel dieser Dissertation war es, die Rolle von HLA-E als Regulator der Immunantwort bei der Hepatitis C- und der HIV-Infektion näher zu charakterisieren. Dazu sollte im ersten Teil der Doktorarbeit die Rolle des HLA-E Moleküls bei der HCV-Infektion betrachtet werden. Da neben der Interaktion mit NKG2-Rezeptoren in der Literatur auch mehrfach die Interaktion von HLA-E / Peptid-Komplexen mit dem T-Zellrezeptor (TCR) zytotoxischer CD8(+) T-Lymphozyten beschrieben wurde [60, 123], sollte zunächst untersucht werden, ob das HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid im Kontext von HLA-E durch zytotoxische CD8(+) T-Zellen von HCV-infizierten Patienten erkannt werden kann. Des Weiteren sollte unter Verwendung zweier stabil transfizierter Zelllinien (HLA-E^G-K562 und HLA-E^R-K562) untersucht werden, ob der beschriebene bialele Polymorphismus im HLA-E Gen Einfluss auf diese Erkennung hat. Durch die immungenetische Untersuchung der HLA-E Allele sollte abschließend der Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Hepatitis C analysiert werden.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit sollte die Rolle des HLA-E Moleküls bei der HIV-Infektion näher betrachtet werden. Da in einer Arbeit von Lajoie et al. [52] die Assoziation des Polymorphismus im HLA-E Gen mit der Transmission des HI-Virus beschrieben wurde, jedoch der zugrunde liegende Mechanismus

dieser Assoziation bislang nicht aufgeklärt werden konnte, sollte unter Verwendung der HLA-E^G-K562 und HLA-E^R-K562 Zelllinien analysiert werden, ob die HLA-E Allele die Immunantwort unterschiedlich modulieren. Dazu sollte ebenfalls untersucht werden, ob das HIV p24₁₄₋₂₂ Peptid im Kontext von HLA-E durch zytotoxische CD8(+) T-Zellen von HIV-infizierten Patienten erkannt werden kann und ob diese Erkennung durch die HLA-E Allele beeinflusst wird. Weiterhin sollte der Einfluss der HLA-E / Peptid-Komplexe auf die Aktivierung und zytotoxische Aktivität von NK-Zellen betrachtet werden.

Da ebenfalls noch nicht untersucht wurde, inwiefern sich die HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelte Oberflächenstabilisierung von HLA-E auf die Zytokinseznierung von NK-Zellen auswirkt und ob diese möglicherweise veränderte Zytokinseznierung den Crosstalk zwischen NK-Zellen und Dendritischen Zellen beeinflusst, sollte dies im dritten Teil der Arbeit betrachtet werden. Schließlich konnte eine kürzlich erschienene Arbeit zeigen, dass durch das Zytokin TNF- α die sexuelle Transmission von HIV-1 wesentlich beeinflusst wird. Daher sollte als Nächstes untersucht werden, ob eine Assoziation des HLA-E Genotyps mit der TNF- α Sekretion peripherer Monozyten vorliegt. Die abschließende immungenetische Untersuchung sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Assoziation der HLA-E Allele mit anderen genetischen Faktoren vorliegt und dadurch die protektive Rolle des HLA-E^G Allels in der HIV-Infektion vermittelt wird.

II MATERIAL

1 Geräte

Autoklav	Tuttnauer, Wesel
Bestrahlungsgerät Biobeam 2000	MCP-STS, Braunschweig
Bioreader 2000	Bio-Sys GmbH, Karben
CO ₂ -Inkubator, Serie 300, 165 l	Nunc GmbH, Wiesbaden
Feinwaage, Micro MC5	Sartorius, Göttingen
Durchflusszytometer FacsCalibur mit CELL Quest Pro Software	BD, Mönchengladbach
Elektrophoresegelkammer	Biorad, München
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia, Freiburg
Inverses Lichtmikroskop Typ DMIL	Leitz, Köln
Kühlzentrifuge	Beckman, München
LightCycler™-Instrument	Roche, Mannheim
MACS-Separator Vario für LS-Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mikrotiter-Photometer Elx800	Bio-Tek Instruments, USA
Mikrozentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Thermal Cycler-200	Biozym, Oldendorf
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plattenschüttler Typ MTS 2	IKA-Labortechnik, Staufen
Stereolupe SZ 4045TR	Olympus Optical, Hamburg
Sterilbank BSB4A	Flow Laboratories, Meckenheim
Sterilisator Typ F-60	Dr. Gruß K.G., Neuss
Transferpette (20-200 und 20-100 µl)	Brand, Wertheim
Tischzentrifuge Biofuge 13	Haereus, Osterode
UV-Transilluminator	Backhofer, Reutlingen
Heizblock Dri-Block DB-2A	Techne, Wertheim
Vortexer Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik, Staufen

2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ampuwa (steriles Aqua dest.)	Fresenius, Bad Homburg
AP Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad, München
Auslaufpipette (5,10 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Brefeldin A aus <i>Penicillium brefeldianum</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
CellFix Fixierlösung	BD, Heidelberg
Cytoperm/Cytofix	BD, Heidelberg
EDTA (Ethylendiamintetraacid)	Promega Corporation, USA
Einmalfiltrationsgeräte	Nunc International, Wiesbaden
Einweg-Handschuhe	SafeSkin, Californien
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Ficoll Separationsmedium	PAA Laboratories, Pasching
FITC-Dextran	Sigma, Steinheim
GolgiStop	BD, Heidelberg
G418 (Geneticin)	PAA Laboratories, Pasching
IPTG (Isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside)	Fluka, Schweiz
L-Glutamin RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Pasching
LightCycler™ Capillaries	Roche, Mannheim
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Tubes	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten Nunclon	Nunc, Wiesbaden
MultiScreen® 96-Well Plates	Millipore, Schwalbach
Molekulargewichtsstandard 100 bp	Gibco BRL, Eggenstein
Neubauer-Zählkammer	Eich, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>), ph 7,4	Apotheke der Uniklinik Bonn
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching

Polystyren-FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
Polypropylen-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
S-Monovette für Heparinblut, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Trypan-Blau	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roche, Penzberg
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner, Frickenhausen

2.1 Separationsreagenzien und Puffer

CD8(+) T Cell Kit II	Miltenyi, Bergisch Gladbach
NK Cell Isolation Kit II	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA und 2mM EDTA

3 Antikörper

3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Maus-Isotyp	Firma
Anti-CD3 PercP	SK7	IgG _{1,K}	BD, Heidelberg
Anti-CD8 APC	SK1	IgG _{1,K}	BD, Heidelberg
Anti-CD56 APC	B159	IgG _{2b,K}	BD, Heidelberg
Anti-CD14 APC	G155-178	IgG _{2a,K}	BD, Heidelberg
Anti-CD40 FITC	HM40-3	IgM,K	BD, Heidelberg
Anti-CD69 PE	L78	IgG _{1,K}	BD, Heidelberg
Anti-NKGA FITC	131411	IgG _{2A}	R&D Systems, USA
Anti-NKGC PE	134591	IgG _{1,K}	R&D Systems, USA
Anti-HLA-A, B, C FITC	G46-2.6	IgG _{1,K}	BD, Heidelberg
Anti-HLA-DR FITC	L243	IgG _{2b,K}	BD, Heidelberg
Anti-CD86 (B70/B7-2)	IT2.2	IgG _{2b,K}	BD, Heidelberg
Anti-HLA-A2 FITC	BB7.2	IgG _{2b,K}	BD, Heidelberg
Anti-CD107a PE	H4A3	IgG _{1,K}	BD, Heidelberg
Anti-CD107a FITC	H4A3	IgG _{1,}	BD, Heidelberg
Anti-TNF-α PE	6402	IgG ₁	R&D Systems, USA

Anti- IFN- γ PE	25723	IgG _{2b}	R&D Systems, USA
Anti-IL-10 PE	JES3-19F1	IgG _{2a}	BD, Heidelberg
Anti-HLA-E	3D12	IgG ₁	eBioscience, Frankfurt

Sekundäre Antikörper:

Goat F (ab \prime) Anti-mouse IgG- FITC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Goat F (ab \prime) Anti-mouse IgG- Phycoerythrin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Donkey Anti-mouse IgG-NL557	R&D Systems, Minneapolis, USA

3.2 Antikörper für den ELISpot

humanes IFN- γ ELISpot Kit	Mabtech AB, Schweden
-----------------------------------	----------------------

Das Kit beinhaltet einen Beschichtungs- Antikörper, einen biotinylierten Detektions- Antikörper und das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP).

4 Zytokine

Rekombinantes humanes GM-CSF	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes IL-4	R&D Systems, Minneapolis, USA

5 Peptide

HCV-Peptid Core ₃₅₋₄₄ (YLLPRRGPRLL)	EMC microcollections, Tübingen
HIV-Peptid p24 ₁₄₋₂₂ (AISPRTNLA)	EMC microcollections, Tübingen

6 Kits

QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Maxima™Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)	Fermentas, St. Leon-Rot

7 Primer und Sonden

Primer für die HCV Quasispeziesuntersuchung

HCV268for	5'-gAgCACRAATCCTAAACCTCAAAG-3' Position im Gesamtgenom: 344→367
HCV528rev	5'-TTHCCATAgAggggCAAAG-3' Position im Gesamtgenom: 604 → 585

HLA-E Genotypisierung (anhand der Gensequenz der Akzessionsnr. M16714)

Primer Sense	5'-gggCCAgggTCTCACA-3' Position: 854→869
Primer Antisense	5'-ggTgAgATAATCCTTgCCgTCgTA-3' Position: 961→938
Sensor C	5'ATggCTgCgACgACCGCTTCCT—FL (sensor) Position: 885→915
Anchor 107	5'-LC640-CgCgggTATgAACAgTTCgCCTAC—PH Position: 917→940

CCR5 Genotypisierung mit SYBR-Green I

Primer 583for	5'-ACC TCG AGC TCT CAT TTT CC-3' Position im CCR5 Gen: 583→602
Primer 664rev	5'-CCA GCC CCA AGA TGA CTA TC-3' Position im CCR5 Gen: 664→645

Alle Primer und Sonden wurden von der Fa. TIB MOLBIOL bezogen.

TNF- α Genotypisierung

Cytokine Genotyping Tray One Lambda, Kalifornien, USA

HLA-B Genotypisierung

INNO-LiPA HLA-B Kits Innogenetics, Gent, Belgien

8 Plasmide und Bakterien

pGEM [®] -T Vector	Promega, Madison, USA
JEM109 High Efficiency Competent Cells	Promega, Madison, USA

9 Eukaryotische Zelllinien

K562	humane MHC-I defiziente Leukämie-Zelllinie aus dem Pleuraerguss einer Frau mit chronischer myeloischer Leukämie im akuten Stadium
HLA-E ^G -K562	transfizierte K-562 Zellen, die stabil das HLA-E ^G Protein exprimieren, Prof. Dr. Elisabeth Weiss, München
HLA-E ^R -K562	transfizierte K-562 Zellen, die stabil das HLA-E ^R Protein exprimieren, Prof. Dr. Elisabeth Weiss, München
HLA-A2-T2	humane Lymphoblast-Zelllinie, die stabil das HLA-A2 Protein exprimiert, Prof. Wölfel, Mainz

10 Puffer und Medien

50 x TAE (Tris Acetat EDTA) – Puffer (pH = 8,5)

242 g TrisAminohydroxymethan	Sigma-Aldrich, Steinheim
57,1 ml Eisessig	MERCK, Darmstadt
100 ml EDTA (0,5 M)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ad 1000 ml Aqua bidest	

Gel-Ladepuffer (50 ml)

12,5 ml Ficoll 400	Biochrom Seromed, Berlin
5 ml Bromphenolblau-Lsg. (0,25 %)	MERCK, Darmstadt
32,5 ml Aqua bidest	

Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium	10 g/l Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
	5 g/l Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
	10 g/l NaCl	MERCK, Darmstadt
	pH 7,0	

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar (BD Biosciences, Heidelberg) zugesetzt. Optional wurde für das Blau-Weiß-Screening 80 µg/ml X-Gal und 0,5 mM IPTG zugegeben.

SOC-Medium	20 g/l Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
	5 g/l Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
	10 mM NaCl	MERCK, Darmstadt
	2,5 mM KCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
	autoklavieren und Zugabe von	
	20 mM Magnesium	MERCK, Darmstadt
	0,4 % (w/v) Glukose	MERCK, Darmstadt
	(sterilfiltriert)	

Bei Bedarf wurde den Medien nach dem Autoklavieren Ampicillin 100 µg/ml (sterilfiltriert) zugesetzt.

Medien für die Zellkultur:

RPMI 1640, 10% FCS, 1%P/S	K562 Zellen, T2-Zellen und primäre Zellkultur
RPMI 1640, 10% FCS, 1%P/S, 0,4 mg/ml G418	HLA-E ^G und HLA-E ^R transfizierte K562 Zellen

11 Untersuchungsmaterial

Für die funktionellen Untersuchungen wurden 20 ml heparinisieretes Vollblut durch die Hepatologische Spezialambulanz und die Immunologische Ambulanz der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt. Von allen in dieser Doktorarbeit eingeschlossenen Patienten wurde eine Einverständniserklärung zur Verwendung des Patientenmaterials zu wissenschaftlichen Versuchszwecken unterzeichnet. Alle Studien sind von der Ethik-Kommission der Universität Bonn bewilligt worden.

11.1 Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HCV-Infektion

Für die Untersuchung HLA-E restringierter T-Zellen bei der HCV-Infektion konnten insgesamt 308 Patienten mit einer chronischen Hepatitis C, 70 Patienten mit einer spontan ausgeheilten HCV-Infektion und 140 gesunde Probanden eingeschlossen werden. Die demographischen und virologischen Daten zu diesen Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Anzahl und klinische Daten der eingeschlossenen HCV-infizierten Patienten.

	HCV GT 1/4 Infektion	HCV GT 2/3 Infektion	spontan ausgeheilte HCV Infektion	gesunde Probanden
Anzahl	168	140	70	140
Geschlecht weiblich ^{a)}	81 (48%)	43 (31%)	60 (86%)	55 (39,3%)
Alter (Jahre) ^{b)}	49,7 (22-83)	42,1 (24-71)	50,0 (23-74)	36,0 (18-64)
Klinische Daten				
ALT IU/L ^{c)}	89 (17-440)	89 (9-748)	n.a. ^{d)}	n.a. ^{d)}
AST IU/L ^{c)}	56 (9-347)	46 (9-359)	n.a. ^{d)}	n.a. ^{d)}
HCV-Status				
HCV-Viruslast (x10 ⁶ Kopien/mL) ^{b)}	11,3 (n.d.-330) ^{e)}	2,8 (n.d.- 32) ^{e)}	5,9 (n.d.-308) ^{e)}	n.a. ^{d)}
HCV GT 1/4	-	-	57 (77%)	-

^{a)}Anzahl (Anzahl/Gesamtanzahl [%]), ^{b)}Mittelwert (range), ^{c)}Median (range), ^{d)}nicht analysiert, ^{e)}nicht detektierbar

11.2 Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HIV-Infektion

Die HLA-E und TNF- α Genotypisierung wurde an insgesamt 372 HIV-1 infizierten Patienten und 376 HIV-negativen Probanden durchgeführt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: In die genetische Analyse eingeschlossene HIV-1-infizierte Patienten und HIV(-) Kontrollen.

	HIV(+) Patienten	HIV(-) Patienten
Anzahl	372	376
Geschlecht weiblich ^{a)}	56 (15,1%)	204 (54,3%)
Alter (Jahre) ^{b)}	47,0 (27-83)	50,8 (9-85)
Risikofaktoren		
i.v. Drogenabusus ^{a)}	50 (13,4%)	-
Hämophilie/ Bluttransfusion ^{a)}	14 (3,8%)	-
Heterosexuell ^{a)}	31 (8,3%)	-
MSM ^{a)f)}	114 (30,6%)	-
Endemisch ^{a)}	17 (4,6%)	-
Bisexuell ^{a)}	5 (1,3%)	-
Unbekannt ^{a)}	141 (37,9%)	-
HIV-Status		
HIV-Viruslast (x10 ³ Kopien/mL) ^{b)}	47,1 (50-2190)	n.d. ^{e)}
CD4(+) Zellen/ μ l ^{c)}	817,8 (3-73473)	n.a. ^{d)}

^{a)}Anzahl (Anzahl/Gesamtanzahl [%]), ^{b)} Mittelwert (range), ^{c)} Median (range),

^{d)} nicht analysiert, ^{e)} nicht detektierbar, ^{f)} MSM; Männer, die Sex mit Männern haben

In die funktionellen Analysen (HLA-E restringierte T-Zellen, Modulation der NK-Zellantwort, Sezernierung von TNF- α durch Monozyten) wurden 73 HIV-infizierte Personen und 18 gesunde Kontrollen eingeschlossen (Tabelle 3).

Tabelle 3: In die funktionelle Analyse eingeschlossene HIV-1-infizierte Patienten und gesunde Kontrollen.

	HIV RNA (+) ¹ Patienten	HIV RNA (-) ² Patienten	gesunde Probanden
Anzahl	26	47	18
Geschlecht weiblich ^{a)}	7 (26,9%)	10 (21,3%)	11 (60,1%)
Alter (Jahre) ^{b)}	38,0 (22-60)	44,0 (27-70)	28,8 (18-41)
Risikofaktoren			
i.v. Drogenabusus ^{a)}	1 (3,8%)	1 (2,1%)	-
Hämophilie/ Bluttransfusion ^{a)}	0 (0%)	0 (0%)	-
Heterosexuell ^{a)}	9 (34,6%)	11 (23,4%)	-
MSM ^{a)f)}	11 (42,3%)	24 (51,1%)	-
Endemisch ^{a)}	2 (7,6%)	3 (6,4%)	-
Nadelstichverletzung ^{a)}	0 (0%)	1 (2,1%)	-
Unbekannt ^{a)}	3 (11,5%)	7 (14,9%)	-
HIV-Status			
HIV-Viruslast (x10 ³ Kopien/mL) ^{b)}	49,5 (50-468,9)	n.d. ^{e)}	n.a. ^{d)}
CD4(+) Zellen/ μ l ^{c)}	452,9 (20-898)	502,5 (104-906)	n.a. ^{d)}
CD8(+) Zellen/ μ l ^{c)}	943,8 (360-1718)	920,9 (222-2034)	n.a. ^{d)}

¹ virämische Patienten ohne Therapie, ² avirämische Patienten unter HAART

^{a)}Anzahl (Anzahl/Gesamtanzahl [%]), ^{b)} Mittelwert (range), ^{c)} Median (range),

^{d)} nicht analysiert, ^{e)} nicht detektierbar, ^{f)}MSM; Männer, die Sex mit Männern haben

Die funktionellen Untersuchungen zum *Crosstalk* von NK-Zellen und DC wurden an insgesamt 24 HIV-infizierten Patienten und 23 gesunden Kontrollen durchgeführt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Eingeschlossene HIV-1-infizierte Patienten und gesunde Kontrollen.

	HIV RNA (+) ¹ Patienten	HIV RNA (-) ² Patienten	gesunde Probanden
Anzahl	12	12	23
Geschlecht weiblich ^{a)}	3 (25,0%)	5 (41,6%)	11 (47,83%)
Alter (Jahre) ^{b)}	42,0 (28-62)	43,0 (28-56)	33 (22-53)
Risikofaktoren			
i.v. Drogenabusus ^{a)}	0 (0%)	1 (8,3%)	-
Hämophilie/ Bluttransfusion ^{a)}	0 (0%)	0 (0%)	-
Heterosexuell ^{a)}	6 (50%)	2 (16,7%)	-
MSM ^{a)f)}	5 (41,7%)	3 (25%)	-
Endemisch ^{a)}	0 (0%)	2 (16,7%)	-
Nadelstichverletzung ^{a)}	1 (8,3%)	0 (0%)	-
Unbekannt ^{a)}	0 (0%)	4 (33,3%)	-
HIV-Status			
HIV-Viruslast (x10 ³ Kopien/mL) ^{b)}	22,6 (0,11-114)	n.d. ^{e)}	n.a. ^{d)}
CD4(+) Zellen/μl ^{c)}	514,5 (265-1075)	528,5 (164-884)	n.a. ^{d)}
CD8(+) Zellen/μl ^{c)}	911,5 (625-1411)	817,5 (294-1769)	n.a. ^{d)}

¹ virämische Patienten ohne Therapie, ² avirämische Patienten unter HAART

^{a)} Anzahl (Anzahl/Gesamtanzahl [%]), ^{b)} Mittelwert (range), ^{c)} Median (range),

^{d)} nicht analysiert, ^{e)} nicht detektiert, ^{f)} MSM; Männer, die Sex mit Männern haben

III METHODEN

1 Zellkultur

1.1 Kultivierung der K562 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde die K562 Zelllinie, eine MHC-I defiziente Leukämie-Zelllinie, die aus dem Pleuraerguss einer Frau mit chronischer myeloischer Leukämie etabliert wurde, verwendet. Des Weiteren wurden K562 Zellen, die nach Transfektion stabil das nicht klassische MHC-I Molekül HLA-E^R (HLA-E^R-K562) und HLA-E^G (HLA-E^G-K562) exprimieren, in den Versuchen eingesetzt. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um Suspensionszellen, die in RPMI 1640 Kulturmedium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin / Streptomycin kultiviert wurden. Dem Zellkulturmedium der stabil exprimierenden K562 Zellen wurde zusätzlich noch 0,4 mg/ml des Antibiotikums G418 zugegeben. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow) durchgeführt. Zur Passage der Suspensionszellen wurde 1 ml der Zellkulturlösung in eine Flasche mit 30 ml frischem Zellkulturmedium überführt.

1.2 Inkubation HLA-E transfizierter K562-Zellen mit den Peptiden HIV p24₁₄₋₂₂ und HCV p18₃₅₋₄₄

K562 Zellen weisen einen genetischen Defekt im Bereich des MHC-Lokus auf und können aus diesem Grund keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. In Abwesenheit der natürlichen HLA-E Liganden, die sich von der Signalsequenz klassischer MHC-Klasse-I Moleküle ableiten, können MHC-Moleküle der transfizierten HLA-E^R-K562 und HLA-E^G-K562 nicht endogen mit Peptiden beladen werden und sind daher sehr instabil. Durch die Beladung mit exogenen Peptiden mit passenden Bindungseigenschaften können HLA-E / β 2-Mikroglobulin Komplexe jedoch auf der Zelloberfläche stabilisiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten viralen Peptide konnten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als potente Liganden für HLA-E identifiziert

werden, die an HLA-E binden und so die Oberflächenexpression des HLA-E Moleküls stabilisieren können [44, 45].

HLA-E^R- und HLA-E^G- K562 Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml RPMI Medium / 10 % FCS / 1 % Penicillin / Streptomycin und 0,4 mg/ml G418 über Nacht mit den Peptiden HIV p24₁₄₋₂₂ oder HCV p18₃₅₋₄₄ in einer Endkonzentration von 10 μ M bei 28 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Für die ELISpot-Experimente wurden die Zellen anschließend mit 200 Gy bestrahlt, bevor die Kokultur mit CD8(+) T-Zellen erfolgte.

1.3 Kultivierung primärer Zellen

Primäre Zellen wie isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC), CD8(+) zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml über Nacht in RPMI 1640 Medium / 10 % FCS / 1 % Penicillin / Streptomycin bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

CD8(+) T-Zellen, die im ELISpot eingesetzt wurden, wurden über Nacht in RPMI 1640 Medium / 10 % humanes AB-Serum / 1 % Penicillin / Streptomycin kultiviert.

2 Zellbiologische Methoden

2.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation nach Böyum

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden nach der von Böyum [124] entwickelten Methode der Dichtegradienten-Zentrifugation aus heparinisierem Blut separiert. Bei dieser Methode erfolgt die Trennung der Blutbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Dichte und Aggregationsfähigkeit. Das synthetische Polysaccharid Ficoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemonomeren und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077 g/cm³. Nach Überschichten der Ficolllösung mit antikoaguliertem Blut und anschließender Zentrifugation kommt es zur Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile. Erythrozyten und Granulozyten pelletieren am Boden des Zentrifugenröhrchens während Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten

die Ficollschicht aufgrund ihrer geringeren Dichte nicht durchdringen können. Lymphozyten und Monozyten bilden eine milchige Interphaseschicht an der Grenzschicht zur Ficolllösung, Serum und Thrombozyten sammeln sich dagegen im Überstand. Mit einer Pasteurpipette kann anschließend die Interphase, in der die PBMC angereichert sind, entnommen werden.

Durchführung:

- antikoaguliertes Blut 1:2 mit PBS verdünnen
- 50 ml Falcon mit 15 ml Ficoll-Lösung befüllen
- vorsichtig mit verdünntem Blut überschichten
- Zentrifugation (2400 U/min (530 g), 20 min, ohne Bremse)
- Interphase (PBMCs) mit Pasteurpipette abnehmen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und mit PBS auffüllen
- Zentrifugation (1700 U/min, 10 min)
- Überstand verwerfen
- Pellet in PBS resuspendieren
- Zentrifugation (1350 U/min, 10 min)
- Überstand verwerfen und Zellpellet in 3 ml PBS aufnehmen
- Bestimmung der Zellzahl

2.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer. In den Boden der Zählkammer sind 4 Großquadrate, die jeweils in 16 Kleinquadrate aufgeteilt sind, eingraviert. Ein Großquadrat hat eine Fläche von 1 mm² und die Kammertiefe beträgt 0,1 mm. Das Kammervolumen beträgt somit 0,1 µl (Fläche Großquadrat x Kammertiefe = Kammervolumen über Großquadrat). Die Vitalität der Zellen wird durch Trypanblau-Färbung bestimmt, da die intakte Zellmembran lebender Zellen ein Eindringen des Farbstoffs in das Zellinnere verhindert, während das Zytoplasma toter Zellen blau angefärbt wird. Aus dem Volumen eines Großquadrats und dem Verdünnungsfaktor ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Zellkonzentration:

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

2.3 Stimulation von PBMC mit LPS

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Die wichtigsten Liganden für LPS stellen das monozytäre Oberflächenprotein CD14, das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP) und die Toll-like Rezeptoren (TLRs) dar. Ein gut untersuchter Effekt von LPS ist die Induktion der TNF- α Produktion durch die Bindung an die monozytären Oberflächenmoleküle CD14 und TLR4, wodurch über eine Signalkaskade im Zellinneren u.a. die Produktion von TNF- α vermittelt wird.

Zur Untersuchung der LPS vermittelten TNF- α Sekretion von CD14(+) Monozyten wurden periphere mononukleäre Zellen durch das in Kap.III.2.1 beschriebene Dichtegradientenzentrifugationsverfahren gewonnen und in einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 / 10 % FCS in einer 48-well-Platte ausgesät. Die Stimulation mit LPS erfolgte in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ für 6 Stunden bei 37° C. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Proteintransportinhibitor Brefeldin A (BFA) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Als Kontrolle wurden PBMC ohne Zusatz von LPS verwendet.

2.4 Stimulation von NK-Zellen mit Peptidbeladenen HLA-E^R- und HLA-E^G-K562 Zellen

Die NK-Zellen (Effektorzellen) der HIV-positiven Patienten bzw. gesunden Probanden wurden mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^R- und HLA-E^G-K562 Zellen (Zielzellen) in einem Effektor / Zielzellen-Verhältnis (E:T) von 1:1 für 6 h kokultiviert. Als Kontrollansätze wurden NK-Zellen mit unbeladenen HLA-E^R- und HLA-E^G-K562 Zellen, sowie nur mit RPMI 1640 / 10 % FCS / 1% P / S Medium kokultiviert. Anschließend wurde die Platte bei 500 U/min zentrifugiert und die zellfreien Überstände bei -20° C für weitere Bestimmungen eingefroren. NK-Zellen aus den Stimulationsansätzen wurden zur Charakterisierung der Zytokinsekretion und zur Bestimmung der Oberflächenexpression verschiedener Aktivierungsmarker eingesetzt.

2.5 Generierung von *Monocyte-Derived-Dendritic-Cells* (MODC)

Die Isolation von Monozyten erfolgte aus so genannten „*Buffy-coats*“ gesunder Spender, die vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Uniklinik Bonn zur Verfügung gestellt werden. *Buffy-coats* sind angereicherte Leukozytenfraktionen, die bei der Präparation von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten für Transfusionszwecke zurückbleiben. Aus dem Lymphozytenkonzentrat lassen sich die mononukleären Zellen des Blutes isolieren (Kap.III.2.1). Um Monozyten aus einem heterogenen Gemisch mononukleärer Zellen anzureichern, wurde die Plastikadhärenz von Monozyten genutzt. Die Generierung unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten (MODC) stellt eine erstmals von Sallustro und Lanzavecchia [125] beschriebene Methode dar, mit der effizient *in vitro* Dendritische Zellen generiert werden können. Sie zeigten, dass humane Monozyten *in vitro* in Gegenwart der Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) zu myeloiden dendritischen Zellen differenzieren, und dass diese in charakteristischen Merkmalen wie Morphologie, Antigen-Prozessierung und Expression von MHC-Molekülen mit DC im peripheren Blut übereinstimmen.

Durchführung:

- Isolation von PBMC aus einem Buffy-Coat
- Einstellen der Zellzahl auf 5×10^6 Zellen/ml RPMI / 10 %FCS / Pen/Strep
- Zellsuspension in einer Zellkulturflasche (175 cm²) für 2 h im Brutschrank inkubieren, anschließend nicht-adhärenente Zellen abnehmen
- zweimaliges Waschen der adhärenenten Monozyten mit PBS, dann Zellen in 50 ml RPMI / 10 %FCS / Pen/Strep aufnehmen
- Zusatz von 400 µl GM-CSF (400 U/ml) und 80 µl IL-4 (400 U/ml)
- Inkubation für 48 h im Brutschrank
- Zusatz von 200 µl GM-CSF (400 U/ml) und 40 µl IL-4 (400 U/ml)
- Inkubation für 48 h im Brutschrank
- ggf. Mediumwechsel und Zusatz von 200 µl GM-CSF (400 U/ml) und 40 µl IL-4 (400U/ml)
- Inkubation für 24 h im Brutschrank

- MODC mit Zellschaber ablösen und auszählen

2.6 Stimulation von MODC mit NK / HLA-E K562 Überständen

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von NK-Zellen mit HIV p24₁₄₋₂₂-stabilisiertem HLA-E Einfluss auf die Ausreifung von MODC hat, wurden MODC zunächst in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in PBS aufgenommen und in eine 96 well Platte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl Überstand aus der in Kap.III.2.4 beschriebenen Kokultur von NK-Zellen mit den HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Zellen auf die MODC gegeben und die Stimulationsansätze für 15 h im Brutschrank inkubiert. MODC, die mit Überständen unbeladener HLA-E^G-K562 Zellen stimuliert wurden, sowie MODC, die nur mit RPMI 1640 / 10 % FCS inkubiert wurden, dienten als Kontrollen.

3 Immunologische Methoden

3.1 Immunmagnetische Isolation von CD8(+) T- und NK-Zellen

Aus PBMC von Patienten und gesunden Probanden wurden CD8(+) T- und NK-Zellen durch immunmagnetische Separation gewonnen. Diese Methode ermöglicht es, bestimmte Zellpopulationen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe von Magnetpartikeln zu isolieren. Dabei kann man zwei Arten der Separation unterscheiden: die Positivisolation, bei der die zu isolierende Zellpopulation mit spezifischen, gegen definierte Oberflächenmoleküle gerichtete Antikörper markiert wird und die Negativisolation, bei der alle anderen Zellpopulationen mit einem Antikörpergemisch markiert werden. In beiden Fällen tragen die zur Aufreinigung eingesetzten Antikörper einen Biotinrest am Fc-Teil des Moleküls. In einem zweiten Schritt werden dann mit einem magnetisch aktiven Zweitantikörper, der sich spezifisch gegen diesen Biotinrest richtet, die Antigen-Antikörper-Komplexe magnetisch detektierbar. In einer Säule in einem Magnetfeld bleiben so die magnetisch markierten Zellen haften. Der Durchfluss (Eluat) enthält die Zellen, die nicht mit Antikörpern markiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Isolationskits zur Negativselektion von CD8(+) T- und NK-Zellen (Miltenyi Biotec, Bergisch

Gladbach) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Im Anschluss an die Isolation wurde die Reinheit der separierten CD8(+) T-Zellen (anti-CD3 PerCP und anti-CD8 FITC) bzw. der NK-Zellen (anti-CD3 PerCP und anti-CD56 FITC) durchflusszytometrisch bestimmt.

3.2 Enzyme-Linked-Immunospot-Assay (ELISpot)

Der ELISpot-Assay stellt eine äußerst empfindliche Methode dar, um die Sekretion eines Zytokins auf Einzelzellebene nachzuweisen. Hierzu wird die zu untersuchende Zellpopulation auf einer Membran kultiviert, die einen Primärantikörper gebunden hat, der spezifisch gegen das zu detektierende Zytokin gerichtet ist. Dieser bindet das sezernierte Zytokin und bildet so Antigen-Antikörper-Komplexe aus. Diese können durch Zugabe eines ebenfalls gegen das Zytokin gerichteten, biotinylierten Zweitantikörpers und ein Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat in einer enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein IFN- γ ELISpot-Assay benutzt, um HLA-E restringierte CD8(+) T-Zellen nachzuweisen. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden aufgrund der erhöhten HLA-E Oberflächenexpression HLA-E^G-K562-Zellen ausgewählt.

Zunächst erfolgte die Beschichtung der ELISpotplatten mit dem Primärantikörper. Dazu wurde die Membran durch Zugabe von 30 μ l 35%iger Ethanollösung aktiviert und dreimal mit Aqua dest. gewaschen, bevor der monoklonale anti-IFN- γ Antikörper (mAb 1-DK1) in einer Konzentration von 15 μ g/ml zugegeben und die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Am darauffolgenden Tag wurden nicht-gebundene Antikörper durch drei weitere Waschschrte mit PBS entfernt, bevor ein Blockierungsschritt für 120 Minuten mit RPMI / 10 % AB-Serum / 1 % P / S bei Raumtemperatur erfolgte. Die anschließende Koinkubation isolierter CD8(+) T-Zellen aus Patientenmaterial und gesunden Kontrollen mit Peptidbeladenen HLA-E^G-K562 Zellen (Kapitel III.2.4) erfolgte in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/well mit einem Verhältnis von 1:1. Als Negativkontrolle wurden ein Kostimulationsansatz von CD8(+) T-Zellen mit unbeladenen HLA-E^G-K562 -Zellen und als Positivkontrolle CD8(+) T-Zellen, die mit 1 μ g/ml PHA stimuliert wurden, eingesetzt. Die Platte wurde anschließend für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS / 0,05 % Tween entfernt und der biotinylierte Detektionsantikörper (mAb 7-B6-1 Biotin) für zwei Stunden bei Raumtemperatur zugegeben (1 µg/ml). Nach wiederholtem Waschen (s.o.) wurde anschließend das Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (ALP) zugeben. Durch Zugabe des Substrats BCIP / NBT bildet diese in einer enzymatischen Reaktion ein unlösliches, gefärbtes Präzipitat, das so indirekt das sezernierte Zytokin nachweist. Nach dem Trocknen der ELISpotplatten wurden diese mit dem ELISpot-Reader ausgewertet.

Die Anzahl der spezifischen Spots (*Spot Forming Cells* [SFC]) wurde anschließend als Differenz der Spot-Anzahl der Kokultur von CD8(+) T-Zellen mit Peptid beladenen HLA-E^G-K562 Zellen und unbeladenen HLA-E^G-K562 Zellen errechnet.

3.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein sehr empfindliches immunologisches Nachweisverfahren, das den Nachweis und die Konzentrationsbestimmung von Antigenen über eine enzymatische Farbreaktion ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde der so genannte „Sandwich“-ELISA verwendet, um die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-10 in Überständen aus der Kokultur von NK-Zellen mit der HLA-E^G-K562 Zelllinie (Kap.III.2.4) nachzuweisen. Dazu wird zunächst ein Antikörper gegen das gesuchte Antigen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert (Primärantikörper). Wird nun das Probengemisch zugegeben, kann das zu untersuchende Protein an diesen Antikörper binden. Durch die Zugabe eines weiteren Antikörpers (Sekundärantikörper), der ebenfalls gegen das Protein gerichtet und zusätzlich an Biotin gekoppelt ist, kann der Nachweis dieser Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgen. Dazu wird in einem nächsten Schritt das Enzym Peroxidase zugegeben. Dieses ist an Streptavidin gekoppelt und kann somit an den Biotinrest des Sekundärantikörpers binden. Nach Zugabe eines Enzymsubstrates erfolgt die enzymatische Reaktion aus der ein farblicher Niederschlag resultiert, welcher anhand seiner Lichtabsorption bei einer bestimmten Wellenlänge quantitativ ausgewertet werden kann. Dabei korreliert die Absorption direkt mit der Menge an gebundenem Protein. Durch den

Vergleich der gemessenen Extinktion mit den Werten einer Verdünnungsreihe des Proteins in bekannter Konzentration (Standard), kann so die Konzentration des Proteins in der Probe bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden Elisa Kits der Firma Diaclone verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

3.4 Durchflusszytometrie (FACS)

3.4.1 Prinzip

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Messung verschiedener Eigenschaften der untersuchten Zellen, die im Flüssigkeitsstrom einer Trägerflüssigkeit als Einzellzellen 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 und kann in Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) unterschieden werden. Die Messung des Vorwärtsstreulichtes ermöglicht Rückschlüsse über die Zellgröße. Die Zellgranularität lässt sich durch die Messung des Seitwärtsstreulichtes, das in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird, feststellen. Darüber hinaus können Zelloberflächen- und intrazelluläre Antigene durch den Einsatz von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Diese können entweder direkt mit einem Fluorochrom konjugiert sein, oder das Antigen kann indirekt durch Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers detektiert werden. Die Fluoreszenz des gebundenen Fluorochroms wird ebenfalls über das Seitwärtsstreulicht detektiert. Dabei ist die Fluoreszenzintensität von der Anzahl der pro Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle abhängig. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer FacsCalibur (BD, Heidelberg) besitzt einen Argon-Ionenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm, mit dem die 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) anhand ihres charakteristischen Emissionsspektrums nachgewiesen werden können. Ein System aus Spiegeln und Filtern (Lichtsammeloptik)

selektiert und trennt das für jedes Fluorochrom spezifisch emittierte Licht und leitet es auf Detektoren (siehe Abb. 7). Die ankommenden Signale werden von einem Photomultiplier verstärkt und durch einen Chip in entsprechende Daten für die Bearbeitung mit der Software CellQuest Pro am Computer umgewandelt. Die weitere Auswertung und Analyse der Messdaten erfolgte mit der Hilfe der FlowJo Software.

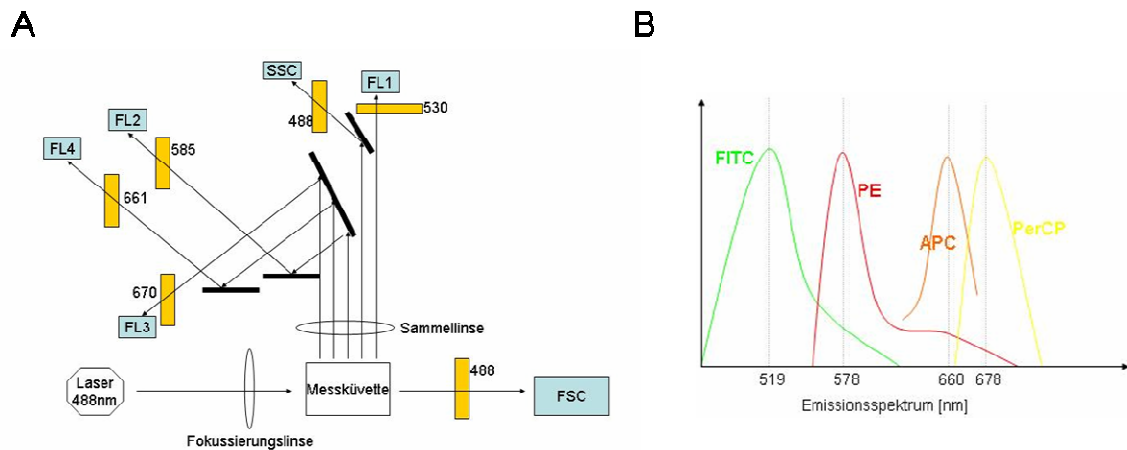


Abb. 7: (A) Schematische Darstellung des Strahlenganges eines Durchflusszytometers, (B) Emissionsspektren der Fluorophore [202].

Vor Beginn jeder Messung müssen die Geräteeinstellungen an die jeweils verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper mit Hilfe von Isotypkontrollen angepasst werden. Diese bestehen nur aus dem konstanten Anteil des Antikörpers (Fc-Fragment) und dem jeweiligen Fluorophor und können durch Bindung an Fc-Rezeptoren unspezifische Signale als Hintergrundfluoreszenz hervorrufen. Mit Hilfe der Isotypkontrollen wird der Schwellenwert für positive Signale festgesetzt. Des Weiteren werden Kompensationseinstellungen festgelegt, die notwendig sind, um die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren.

3.4.2 Markierung von Zelloberflächenmolekülen

Zur Oberflächenfärbung verschiedener Zellmarker wurden 5 μ l Antikörperlösung in einem Probenvolumen von 50 μ l und einer Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml eingesetzt. Der Ansatz erfolgte in Polystyren-FACS-Röhrchen und wurde für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurde

anschließend die Zellsuspension mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1350 U/min, 20 min) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde dann in 150 µl Cellfix resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.4.3 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Um intrazellulär Zytokine zu detektieren ist es notwendig, die Zellen während der Stimulationsphase mit einem Akkumulationsreagenz wie Brefeldin A (BFA) zu versetzen. BFA (Sigma, Schnelldorf) ist ein Metabolit des Pilzes *Penicillium brefeldianum*, das den sekretorischen und lysosomalen Proteintransport inhibiert. Die zeitgleiche Inkubation mit BFA verhindert so die Sekretion intrazellulär produzierter Zytokine und führt zu einer Akkumulation der Proteine in der Zelle. Die akkumulierten Zytokine können, nachdem die Zellmembran über Detergenzien permeabilisiert wurde, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern im FACS nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Färbung wurde mit Hilfe des Cytifix / Cytoperm Kits (BD, Heidelberg) in Polystyrol-FACS-Röhrchen durchgeführt.

Durchführung:

- Zellen in FACS-Röhrchen überführen
- Zugabe von 2 ml PBS / 2 % FCS und Zentrifugation (1350 U/min, 8 min)
- Überstand verwerfen und Zellen in 100 µl PBS / 2% FCS resuspendieren
- Färbung des jeweiligen Oberflächenantigens mit 5 µl Antikörper (20 min, im Dunkeln)
- Zugabe von 2 ml PBS / 2 % FCS und Zentrifugation (1350 U/min, 8 min)
- Überstand verwerfen, Zellen in 100 µl Cytifix / Cytoperm resuspendieren und anschließend für 20 min bei 4 °C inkubieren
- Zweimaliges Waschen mit 500 µl Perm / Wash (1350 U/min, 8 min)
- Zellpellet in 50 µl Perm / Wash resuspendieren
- Zugabe von 5 µl anti-Zytokin Antikörper, Inkubation für 30 min bei 4 °C
- Zugabe von 1 ml Perm / Wash und Zentrifugation (1350 U/min, 8 min)

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des Qiagen DNA Blood Mini Kit. Das Verfahren der DNA-Extraktion beruht dabei auf der Denaturierung von Proteinen durch Detergenzien. Die freiwerdende DNA und RNA werden mit Hilfe einer Säule (Silicamatrix, die als vernetztes Polymer in einem Zentrifugenröhrchen angebracht ist) selektiv und reversibel gebunden, gereinigt und anschließend eluiert. Die bevorzugte Isolierung chromosomaler DNA gegenüber zellulärer RNA geschieht durch die Verwendung von bestimmten Puffern. Diese behindern die Bindung von RNA an die Silicamatrix und fördern gleichzeitig die Bindung von DNA.

Durchführung aus 200 µl EDTA-Blut:

- 20 µl Protease in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettieren. Zugabe von 200 µl Vollblut und 200 µl Puffer AL und die Lösungen mit Hilfe eines Vortexers vermischen
- Inkubation für 10 min bei 56 °C
- 200 µl Ethanol hinzugeben und erneut vortexen
- Gemisch in eine Säule (QIAamp spin column) überführen und für 1 min bei 6.000 x g zentrifugieren
- Filtrat verwerfen und Säule in ein neues Probengefäß überführen. 500 µl Puffer AW1 hinzugeben und für 1 min bei 6.000 x g zentrifugieren
- Filtrat verwerfen und Säule in ein neues Probengefäß überführen. 500 µl Puffer AW2 hinzugeben und für 3 min bei 20.000 x g zentrifugieren
- Säule in ein sauberes 1,5 ml- Eppendorf-Gefäß überführen und 200 µl dH₂O hinzugeben. Für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren und dann für 1 min bei 6.000 x g zentrifugieren

4.2 Extraktion viraler RNA

Die RNA-Extraktion wurde anhand des QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit durchgeführt. Da mit diesem Isolationskit virale RNA nicht von zellulärer DNA getrennt werden kann, wurde die Präparation viraler RNA aus Patientenmaterial

anhand von zellfreien Serumproben durchgeführt. Um Verunreinigungen mit RNAasen vorzubeugen, wurden alle verwendeten Gebrauchsgegenstände zuvor mit UV-Licht bestrahlt.

Durchführung aus 140 µl Patientenserum:

- 560 µl Puffer AVL / Carrier-RNA-Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettieren, 140 µl Patientenserum zufügen und die Lösungen mit Hilfe eines Vortexers vermischen
- Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur
- 560 µl Ethanol hinzugeben und erneut vortexen
- Gemisch auf eine Säule (QIAamp Spinsäule) überführen und für 1 min bei 6.000 x g zentrifugieren
- Filtrat verwerfen und Säule in ein neues Probengefäß überführen. 500 µl Puffer AW1 hinzugeben und für 1 min bei 6.000 x g zentrifugieren
- Filtrat verwerfen und Säule in ein neues Probengefäß überführen. 500 µl Puffer AW2 hinzugeben und für 3 min bei 20.000 x g zentrifugieren
- Säule in ein sauberes 1,5 ml- Eppendorf-Gefäß überführen und 60 µl AVE Puffer hinzugeben. Für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und dann für 1 min bei 6.000 x g zentrifugieren

Die aufgereinigten RNA-Proben wurden anschließend bei - 80° C gelagert.

4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA in einer Lösung kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes bestimmt werden. Nach diesem Gesetz existiert ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Extinktion einer Lösung und der Konzentration des darin gelösten Stoffes. Es gilt dabei näherungsweise folgendes:

$OD_{260}=1$ entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml

$OD_{260}=1$ entspricht 40 µg einzelsträngiger DNA pro ml

$OD_{260}=1$ entspricht 20 µg Oligonukleotide pro ml

Proteine absorbieren ebenfalls bei 260 nm, allerdings liegt ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Deshalb kann man die Reinheit der

präparierten DNA bestimmen, indem man den Quotienten aus OD260 und OD280 bestimmt. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Für die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde eine geeignete Verdünnung der DNA hergestellt (1:100 bis 1:400 in destilliertem H₂O). Die Extinktion wurde anschließend bei 260 und 280 nm in einem Spektralphotometer (Photometer Gene Quant, Fa. Pharmacia) gemessen.

4.4 Reverse Transkription und PCR

Reverse Transkription bezeichnet das Umschreiben von RNA in DNA (cDNA). Der Prozeß wird vom retroviralen Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Die *Polymerase-Chain Reaction* (PCR) ist eine Methode, die es erlaubt, definierte DNA-Abschnitte *in vitro* schnell und effizient zu amplifizieren. Diese enzymatische Reaktion wird von einer DNA-Polymerase katalysiert. Diese synthetisiert ausgehend von zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden, neue DNA-Fragmente.

Der hier verwendete Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix enthält zwei rekombinant hergestellte Reverse Transkriptasen (Omniscript und Sensiscript Reverse Transkriptase) und für die anschließende Amplifikation der cDNA eine HotStarTaq DNA Polymerase. Die DNA-Polymerase liegt während der reversen Transkription inaktiv vor und wird erst durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 95° C aktiviert.

<u>Reaktionsansatz (auf Eis):</u>	RNase-freies Wasser	30,8 µl
	5x RT-PCR Puffer	10,0 µl
	dNTP Mix	2,0 µl
	Primer HCV268for	0,6 µl
	Primer HCV528rev	0,6 µl
	RT-PCR Enzym-Mix	2,0 µl
	Template RNA	3,5 µl

<u>Thermocycler Einstellungen:</u>	Reverse Transkription:	50 °C für 30 min
	Initiale Denaturierung:	95 °C für 15 min
	<u>38 Zyklen</u>	
	Denaturierung:	94 °C für 20 sec
	Annealing:	57 °C für 20 sec
	Extension:	72 °C für 30 sec
	Extension:	72 °C für 07 min

4.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Durch Elektrophorese können DNA-Fragmente in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt werden. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Nach dem Aufkochen bilden die Galaktoseeinheiten der Agarose beim Abkühlen Doppelhelices, die sich zu dicken Fäden zusammenlagern und so eine Gitterstruktur ausbilden, deren Porengröße durch die Konzentration der Agarose bestimmt wird. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden Gele mit einem Agarosegehalt von 1-2 % (2 % <500 nt, 1 % >500 nt) verwendet. Im elektrischen Feld wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zu ihrer Länge ist, zur Anode. Die DNA-Fragmente werden im Gel durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Lichtexposition (260-350 nm) im sichtbaren Bereich (rot-orange, 590 nm).

Durchführung:

- Agarose in 500 ml 0,5 x TBE-Puffer aufkochen
- nach Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzen (0,3 mg/ml Gellösung)
- Gel luftblasenfrei in einen Gelschlitten mit eingehängtem Kamm gießen und nach Erstarren in die Elektrophoresekammer einsetzen
- 8 µl der Proben mit 2 µl Probenpuffer versetzen
- Proben und Längenstandard auf das Gel auftragen
- Elektrophoresespannung (100-150 V) für 45-60 min anlegen
- Dokumentation des Gels unter UV-Licht

4.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

4.6.1 Aufreinigung mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Bei dieser Methode werden die DNA-Fragmente unter speziellen Pufferbedingungen (hoher Salzgehalt, pH-Wert $\leq 7,5$) an eine Silika-Membran gebunden. Nach einem Waschschrift mit ethanolhaltigem Puffer kann die gereinigte DNA mit Wasser oder einem Tris-Puffer eluiert werden. Die Ausschlussgröße der Silika-Zentrifugensäulen beträgt 100 bp, so dass auch überschüssige Primer und Primerdimere weitgehend entfernt werden.

Durchführung:

- 50 μ l PB Puffer pro 10 μ l post PCR-Produkt zupipettieren
- vortexen und auf die Säulen auftragen
- Zentrifugation 1 min, $\geq 10000 \times g$, bei Raumtemperatur
- Eluat verwerfen
- waschen mit 750 μ l PE Puffer 1 min, $\geq 10000 \times g$, bei Raumtemperatur
- Eluat verwerfen und die Säulen nochmals 1 min bei $\geq 10000 \times g$ zentrifugieren
- Säulen in saubere Eppendorf-Gefäße überführen und DNA mit 50 μ l TE Puffer eluieren
- zentrifugieren 1 min, RT, $\geq 10000 \times g$

4.6.2 Aufreinigung mittels PEG-Fällung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung wurde mit Hilfe der PEG (Polyethylenglykol)- Fällung durchgeführt. PEG ist ein hydrophiles, ungeladenes Polymer, das mit der DNA in wässriger Lösung um das Hydratationswasser konkurriert und somit zu einer reversiblen Fällung der Nukleinsäuren führt. Nach Zentrifugation verbleibt die aufgereinigte DNA im Pellet und der Überstand wird verworfen.

Durchführung:

- PCR-Produkt und PEG-Mix 1:1 zusammengeben und vortexen
- 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

- Zentrifugation bei 9500 x g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 100 µl Ethanol (100%) (nicht vortexen)
- Zentrifugation bei 9500 x g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- Pellet 20 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Pellet in 20 µl Tris / Cl-Puffer aufnehmen

4.7 Klonierung eines DNA-Fragments

In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonierung des DNA-Fragments mit Hilfe des pGEM[®]-T Vector System II (Promega, Mannheim) durchgeführt. Dieses beinhaltet den pGEM[®]-T Vektor, die T4 DNA Ligase mit den zu verwendenden Puffern und die kompetenten Bakterien JM109.

4.7.1 Ligation

Der verwendete pGEM[®]-T Vektor weist unter anderem eine *multiple cloning site*, die in der Sequenz des lac-Z Gens lokalisiert ist, und eine Ampicillinresistenz auf. Durch die enzymatische Aktivität der T4-DNA-Ligase, die mit Hilfe von ATP und Mg²⁺-Ionen die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen katalysiert, wird das gewünschte DNA-Fragment in den Vektor kloniert.

Reaktionsansatz (laut Herstellerangaben):

	Proben- ansatz [µl]	Positiv- kontrolle [µl]	Hintergrund- kontrolle [µl]
2x Rapid Ligation Puffer	5	5	5
pGEM [®] -T Vektor	1	1	1
PCR-Produkt		-	-
Kontroll Insert-DNA	-	2	-
T4 DNA Ligase	1	1	1
Aqua dest.	ad 10µl	ad 10µl	ad 10µl

Die Menge an eingesetztem PCR-Produkt errechnet sich über die folgende Formel:

$$\frac{\text{Menge Vektor (ng)} \times \text{Größe Insert (kb)} \times \text{Insert:Vektor ratio}}{\text{Größe des Vektors (kb)}} = \text{Menge Insert (ng)}$$

Bei einer Vektorgröße von 3 kb, einer Konzentration des Vektors von 50 ng/μl und der Größe des DNA Fragments von 0,26 kb wurden bei einer Insert:Vektor Ratio von 1:1 4,3 ng des PCR-Produktes eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde eine Kontroll-Insert DNA in den Vektor ligiert. Als Hintergrundkontrolle wurde eine Ligation ohne Insert-DNA durchgeführt. Anschließend wurde der Ligationsansatz für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

4.7.2 Transformation von kompetenten JM109 Zellen

Im pGEM[®]-T Vektor ist in der aminoterminal codierenden Sequenz der β-Galactosidase (α-Fragment) eine *Multiple Cloning Site* lokalisiert, in die Fremd-DNA, wie z.B. PCR-Fragmente, eingebracht werden können. Durch den Einbau eines Inserts in diesen Klonierungsbereich wird die kodierende Sequenz unterbrochen. Nach Transformation in kompetente Bakterien wird das Enzym β-Galactosidase nicht mehr exprimiert. Werden diese Bakterien auf LB-Platten mit 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) und Isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) angezogen, erscheinen Transformanten mit Insertion als weiße Kolonien, Transformanten ohne Insertion können jedoch X-Gal aufgrund ihrer aktiven β-Galactosidase spalten und es entsteht ein unlösliches Farbpräzipitat, so dass diese Kolonien eine blaue Färbung aufweisen. Des Weiteren kodiert das Plasmid für eine Ampicillinresistenz.

Durchführung:

- 2 μl des Ligationsansatzes in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- Auftauen der kompetenten JM109 Bakterien auf Eis
- Vorsichtig 50 μl der Zellen dem Ligationsansatz zugeben und für 20 min auf Eis inkubieren
- Hitze-Schock Transformation der Ansätze für 45 - 50 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C, anschließend Zellen für 2 Minuten auf Eis inkubieren
- 950 μl SOC Medium zugeben und für 1,5 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubieren

- 100 µl der Kultur auf LB / Ampicillin / IPTG / X-Gal Platten ausstreichen und Platten über Nacht bei 37° C inkubieren
- Blau-Weiss Screening der Platten und „picken“ von je 10 weißen Kolonien / Patient

4.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterienkulturen wurde in dieser Arbeit das Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen) verwendet, dem das Prinzip der modifizierten alkalischen Lyse von Bakterien zu Grunde [126] liegt. Die Plasmid-DNA wird im Miniprep bei hoher Salzkonzentration an eine Silika-Membran gebunden [127] und dann durch destilliertes H₂O oder TE-Puffer mit niedriger Salzkonzentration wieder abgelöst. Um Plasmid-DNA mittels Miniprep aus Bakterien zu isolieren, wurden jeweils 10 weiße Bakterienkolonien von einem Patienten von einer LB / Ampicillin / IPTG / X-Gal -Platte mit einer ausgeglühten Metallöse gepickt, in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml) gegeben und 12-16 h bei 37° C auf einem Schüttler inkubiert. Die Durchführung der Präparation erfolgte anschließend nach dem Protokoll der Firma Qiagen.

4.9 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzierung

Von insgesamt 16 Patienten (acht Patienten, die eine HLA-E restringierte IFN- γ Antwort zeigten und acht Patienten, die keine HLA-E restringierte IFN- γ Antwort zeigten) wurde eine Sequenzanalyse des Peptidepitops von HCV p18₃₅₋₄₄ durchgeführt. Dazu wurde ein 260 Basenpaar-Segment des HCV core Gens (nt 344-360) amplifiziert (Kap.III.4.4), in kompetente Zellen transformiert (Kap.III.4.7.2) und anschließend 10 Kolonien jedes Patienten sequenziert (Fa. SeqLab, Göttingen). Die Analyse der Nukleotidsequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms BioEdit v.7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) [203] indem die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aller Klone mit der Konsensussequenz aus der Los Alamos HCV Datenbank (<http://hcv.lanl.gov/content/index>) [204] für alle HCV-Genotypen verglichen wurde.

4.10 Echtzeit PCR

Die Methode der Echtzeit (*real time*) PCR hat im Vergleich zur herkömmlichen PCR den Vorteil, dass schon während der Amplifikation die Zunahme der PCR-Produkte detektiert werden kann. Dies geschieht mit Hilfe von DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. Ethidiumbromid oder SYBR[®]Green. Dabei gilt, je mehr PCR-Produkte gebildet werden, desto höher ist die Intensität der gemessenen Fluoreszenz. Eine andere Methode stellt die Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden dar. Diese erzeugen unter Ausnutzung von FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) oder Quenching bei Vorliegen von komplementären DNA Fragmenten ein Fluoreszenzsignal. Im Gegensatz zur konventionellen PCR erfolgt die Reaktion in Glaskapillaren, die lichtdurchlässig sind und durch die große Oberfläche schnelle Heiz- und Abkühlgeschwindigkeiten ermöglichen und somit die Reaktionsdauer verkürzen. Die *real-time* PCR wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem LightCycler[®] 2.0 System der Firma Roche Diagnostics durchgeführt um eine HLA-E Genotypisierung der Patientenproben durchzuführen.

4.10.1 Genotypisierung durch Hybridisierungssonden

Hybridisierungssonden („*hybridization probes*“) bestehen aus zwei Oligonukleotiden, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und als Anker und Sensor bezeichnet werden. In der vorliegenden Arbeit ist die Sensorsonde mit dem Fluorophor Fluorescein (530 nm) am 3'-Ende markiert, die Ankersonde trägt dagegen den Farbstoff LC-Red640 (640 nm) an ihrem 5'-Ende. Die Sonden binden nach Denaturierung an den komplementären Strang des sich bildenden PCR-Produkts zwischen den Primern. Hybridisiert der Fluorescein-markierte Sensor mit der DNA sehr nahe an der Ankersonde (≤ 5 Basenpaare), kann durch einen Lichtimpuls das Donor-Fluorophor Fluorescein angeregt werden. Dieses emittiert ein Lichtsignal von 530 nm, das den Farbstoff der Ankersonde (Akzeptor-Fluorophor) anregt und zur Emission eines zweiten Signals führt (640 nm), welches vom LC-Gerät gemessen wird (Abb. 8). Die Anregung des Akzeptor-Fluorophors durch den Donor-Fluorophor wird als „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET) bezeichnet und ist nur durch die Bindung der Sonden in unmittelbarer Nähe möglich. Dies verhindert

die Anregung freier Sonden und damit eine Fehlbestimmung. Mit zunehmender Zyklenzahl wird mehr Amplifikat gebildet, mehr Sonden können binden und die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes. Dies ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit („quantitative *real time* PCR“). Das LightCycler-System bietet die Möglichkeit, im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Die mittlere Schmelztemperatur (T_m) von doppelsträngigen DNA-Molekülen hängt in erster Linie von ihrer Nukleotidzusammensetzung ab. Da Guanin-Cytosin-Basenpaare über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, benötigt ihre Trennung gegenüber den Adenin-Thymin-Paaren, die nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden, einen höheren Energieaufwand. Außerdem haben auch Länge und Nukleotidsequenz der DNA-Moleküle, sowie die Ionenzusammensetzung des Puffers Einfluss auf die Schmelztemperatur [128]. Die Erstellung der Schmelzkurve beginnt mit einer Temperatur von 45 - 60 °C und steigt dann kontinuierlich an. Dies führt zur Ablösung der Sonden und einem Abbruch des Fluoreszenzsignals, bis bei ca. 95 °C die DNA vollständig denaturiert vorliegt. Der Schmelzpunkt ist für jede Sonde und Reaktion ein charakteristischer Wert. Liegt eine Fehlpaarung von zwei Basen vor, z.B. bei einem Nukleotidaustausch durch einen Polymorphismus, löst sich die Sonde bereits bei niedrigeren Temperaturen und der Schmelzpunkt ist verschoben. Bei heterozygoten Proben liegen zwei verschiedene Allele vor und entsprechend werden zwei Schmelzpunkte gemessen. Zum einfacheren Ablesen der Schmelzpunkte wird die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Anhand der Schmelzwerte und des Kurvenverlaufs kann dann die Genotypisierung erfolgen.

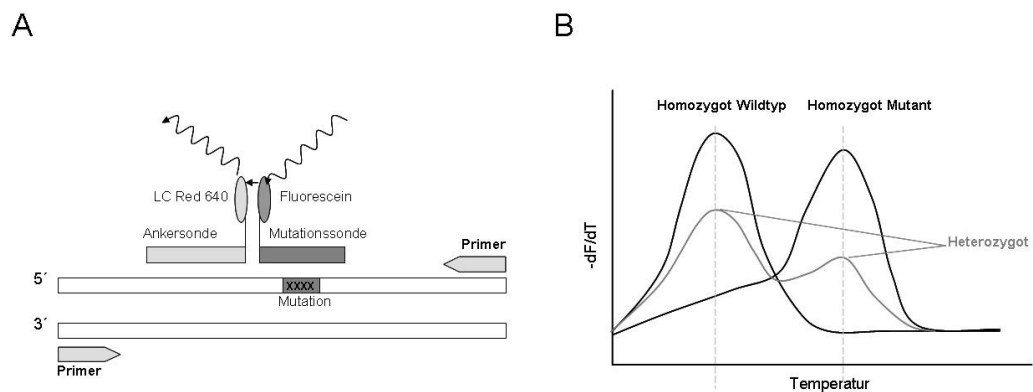


Abb. 8: Prinzip des FRET-(Fluoreszenz-Resonanz-Transfer) Assay (A) und exemplarische Darstellung des Auswertediagramm (B) (nach [35]).

Reaktionsansatz für die HLA-E Genotypisierung

Reaktionsansatz (auf Eis):

Maxima™ Probe/ ROX qPCR Master Mix (2X)	6,0 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl
Rückwärts-Primer	0,5 µl
Anker-Sonde	1,0 µl
Sensor-Sonde	1,0 µl
Q-Solution	1,0 µl

10 µl des Reaktionsansatzes und 2 µl der DNA-Proben wurden in die Kapillaren pipettiert, verschlossen und für 5 s bei 700 x g anzentrifugiert. Als Negativkontrolle wurde anstelle von DNA 2 µl Aqua dest. zugefügt.

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung:	95° C für 10 min
50 Zyklen:	95° C für 10 s, 55° C für 15 s, 72° C für 20 s
Detektion:	am Ende des Anealing-Schritts

Schmelzkurvenanalyse:

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

Reaktionsansatz für die CCR5 Genotypisierung

Die Echtzeit PCR zur CCR5- Δ 32 Genotypisierung wurde anhand des von Nischalke et al. beschriebenen Protokolls durchgeführt [129].

4.10.2 HLA-B Genotypisierung mittels INNO-LiPA HLA-B

Die HLA-B Genotypisierung wurde mithilfe des INNO-LiPA HLA-B Kits (Innogenetics, Gent, Belgien) laut Herstellerangaben durchgeführt.

4.10.3 TNF- α Genotypisierung mittels *cytokine genotyping tray*

Die Analyse des -308 Polymorphismus im TNF- α Gen erfolgte nach den Herstellerangaben mittels *cytokine genotyping tray* (One Lambda, Kalifornien, USA). Diese Untersuchung erlaubt es, Individuen in TNF- α *high* (= Individuen mit den Genotypen TNF- α A/A oder TNF- α G/A) und TNF- α *low* (= Individuen mit Genotyp TNF- α G/G) Produzenten einzuteilen.

5 Statistische Methoden

Die Allel- und Genotyp-Frequenzen wurden hinsichtlich ihrer Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) mit der von Strom und Wienker entworfenen Software analysiert (<http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>) [205].

Die Verteilung der ermittelten Genotypen wird in einem so genannten De Finetti-Diagramm aufgetragen (Abb. 9). Dieses stellt ein trilineares Koordinatensystem dar, das die Genotyphäufigkeiten (AA, Aa, aa) zeigt. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Stichprobe bzw. eine Population. Die Verhältnismäßigkeiten der drei Genotypen AA, Aa und aa werden durch die Längen der Senkrechten eines Punktes P auf die drei Seiten eines gleichwertigen Dreieckes wiedergegeben. Das HWE ist im De-Finetti-Diagramm als Parabel dargestellt. Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in einer genetischen Studie ist ein Hinweis auf eine Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp oder auf mögliche Fehler bei der Genotyp-Bestimmung, bzw. auf einen möglichen Selektionsbias bei der untersuchten Probanden-Stichprobe. Die Abszisse gibt die Allelfrequenzen der untersuchten Population wieder.

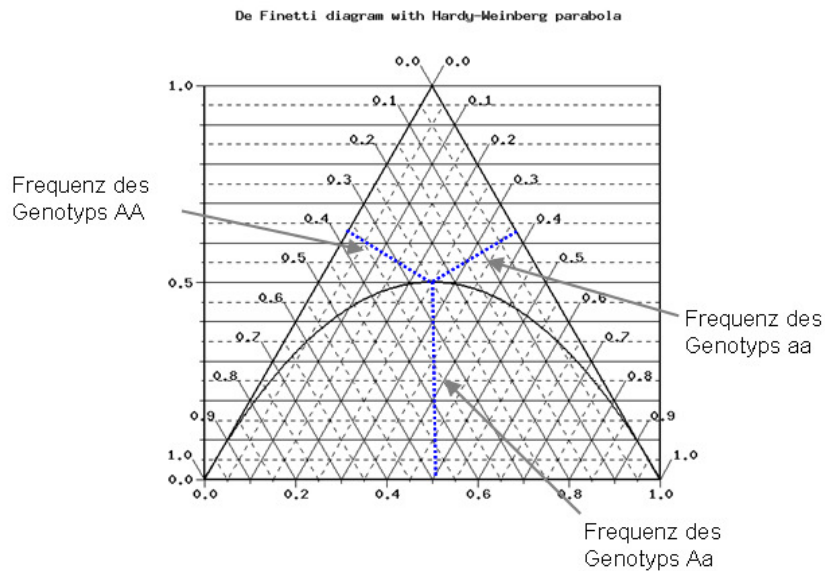


Abb. 9: De Finetti Diagramm [205].

Für den Vergleich der Verteilungen eines kategorialen Merkmals zwischen Patientengruppen wurde der χ^2 test verwendet. Alle weiteren Analysen erfolgten unter Verwendung des t-Tests bei gepaarten Stichproben, des t-Tests bei unabhängigen Stichproben und des Mann-Whitney-Tests. Die statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der Programme GraphPad Prism 3.0 und SPSS 17.0 durchgeführt. Ein p -Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler (SEM) des Mittelwertes angegeben.

IV ERGEBNISSE

1 Untersuchung von HLA-E^G und HLA-E^R transfizierten K562 Zellen

1.1 Stabilisierung der Oberflächenexpression von HLA-E^G und HLA-E^R durch die viralen Peptide HIV p24₁₄₋₂₂ und HCV p18₃₅₋₄₄

In Abwesenheit der natürlichen HLA-E Liganden, die sich von der Signalsequenz klassischer MHC-Klasse-I Moleküle ableiten, können MHC-Moleküle der transfizierten HLA-E^R-K562 und HLA-E^G-K562 nicht endogen mit Peptiden beladen werden und sind daher sehr instabil. Durch die Beladung mit exogenen Peptiden mit passenden Bindungseigenschaften können HLA-E / β 2-Mikroglobulin Komplexe auf der Zelloberfläche stabilisiert werden. Die viralen Peptide HIV p24₁₄₋₂₂ und HCV p18₃₅₋₄₄ konnten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als potente Liganden für HLA-E identifiziert werden, die an HLA-E binden und so die Oberflächenexpression des HLA-E Moleküls stabilisieren können [44, 45].

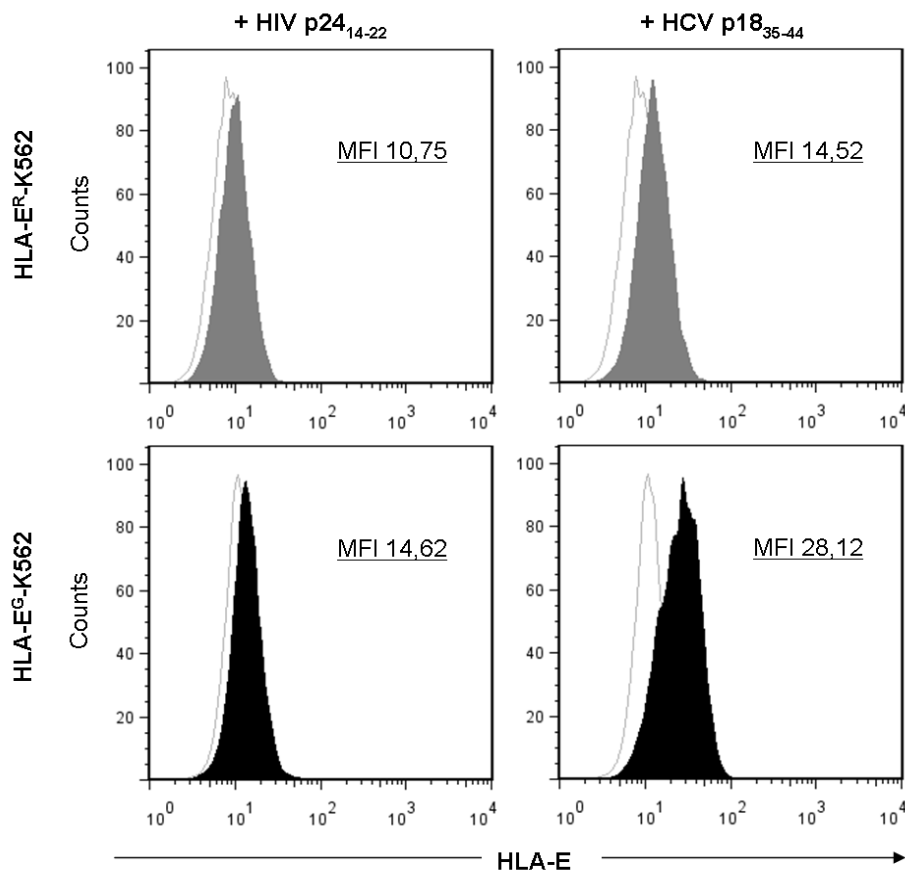


Abb. 10: Stabilisierung der Oberflächenexpression von HLA-E. Durchflusszytometrische Bestimmung der HLA-E Expression nach Inkubation der Zelllinie HLA-E^R-K562 (grau gefüllte Linie) und HLA-E^G-K562 (schwarz gefüllte Linie) mit den Peptiden HIV p24₁₄₋₂₂ (links) oder HCV p18₃₅₋₄₄ (rechts). Als Negativkontrolle sind unbeladene HLA-E^R-K562 bzw. HLA-E^G-K562 Zellen (graue Linie) dargestellt.

In Abbildung 10 ist dargestellt, dass beide Peptide zu einer verstärkten Oberflächenexpression der HLA-E Moleküle auf den getesteten Zelllinien führten. Das HIV p24₁₄₋₂₂ Peptid (HLA-E^R-K562: MFI 10,75; HLA-E^G-K562: MFI 14,62) übt jedoch im Vergleich zum HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid (HLA-E^R-K562: MFI 14,52; HLA-E^G-K562: MFI 28,12) einen geringeren Einfluss auf die Oberflächenstabilisierung von HLA-E bei beiden Transfektanten aus. Ebenfalls zeigte sich, dass in Übereinstimmung mit vorangehenden Arbeiten [51, 130] das HLA-E^R Allel unabhängig vom gebundenen Peptid deutlich geringer als das HLA-E^G Allel auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

2 Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HCV-Infektion

2.1 HLA-E restringierte Erkennung des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids durch CD8(+) T-Zellen

2.1.1 Nachweis HLA-E restringierter CD8(+) T-Zellen mittels ELISpot

Das HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid stellt ein gut charakterisiertes HLA-A2 restringiertes T-Zellepitop dar, welches im Verlauf der HCV-Infektion von CD8(+) T-Zellen erkannt werden kann [131]. Um zu untersuchen, ob das HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid ebenfalls im Kontext des nicht-klassischen MHC-I Moleküls HLA-E von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden kann, wurden 77 HCV(+) Patienten und 11 gesunde Probanden auf eine HLA-E restringierte T-Zellantwort untersucht (Kap.III.3.2).

Interessanterweise konnten bei 31 von 77 (40%) HCV-infizierten Patienten HLA-E restringierte CD8(+) T-Zellen mittels IFN- γ ELISpot nachgewiesen werden ($19,7 \pm 2,3$ SFC/ 10^5 Zellen). Die Spezifität dieses Ergebnisses wurde dadurch bestätigt, dass bei CD8(+) T-Zellen gesunder Probanden keine IFN- γ SFC nachgewiesen werden konnten (Abb. 11).

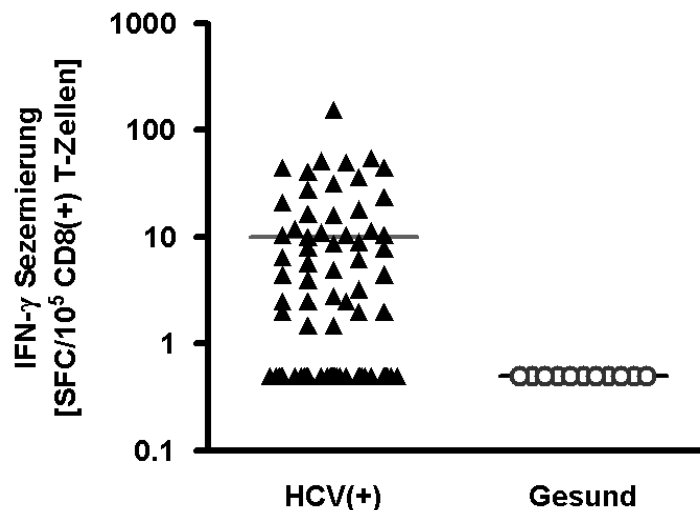


Abb. 11: HLA-E restringierte Erkennung des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids durch CD8(+) T-Zellen von HCV infizierten Patienten. 1×10^5 CD8(+) T-Zellen wurden mit 1×10^5 Peptidbeladenen HLA-E^G-K562 Zellen für 48 h auf einer mit anti-IFN- γ Antikörpern beschichteten ELISpot-membran kokultiviert. Der Nachweis des gebundenen Zytokins erfolgte nach Entfernen der Zellen mit einem IFN- γ spezifischen, biotin-gekoppelten Antikörper und durch Zugabe eines Streptavidin-Enzym Konjugates, welches die Umsetzung eines Substrats in ein farbliches Präzipitat katalysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem ELISpot-Reader (Biosys).

Um zu untersuchen, ob die Präsentation des HCV Peptids durch das HLA-E^G oder das HLA-E^R Allel einen Einfluss auf die CD8(+) T-Zellantwort ausübt, wurde im Folgenden bei 31 HCV-infizierten Patienten die T-Zellantworten nach Präsentation des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids über HLA-E^R- und HLA-E^G-K562 Zellen verglichen (Abb. 12). Es zeigte sich, dass sich die Frequenz der T-Zellantworten zwischen T-Zellen die mit HLA-E^R-K562 Zellen und T-Zellen, die mit HLA-E^G-K562 Zellen kokultiviert wurden, nicht unterschied ($13,8 \pm 5,6$ vs. $21,5 \pm 6,1$ SFC/ 10^5 Zellen).

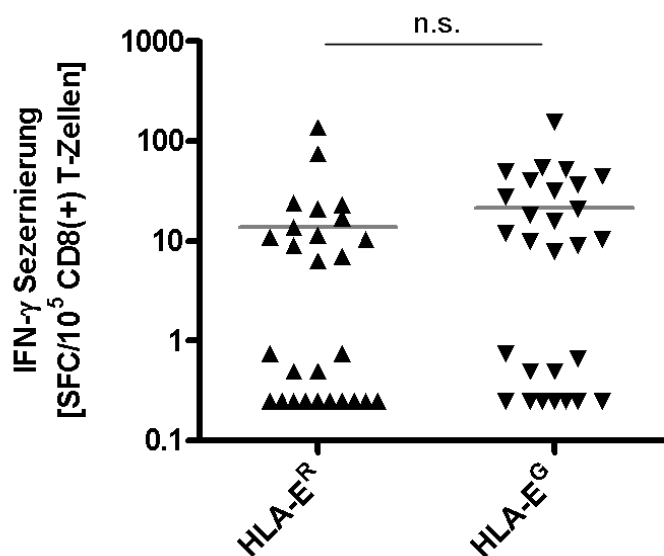


Abb. 12: T-Zellantworten HCV-infizierter Patienten nach Präsentation des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids über HLA-E^R- und HLA-E^G-K562 Zellen. 1×10^5 CD8(+) T-Zellen wurden mit 1×10^5 Peptidbeladenen HLA-E^R- oder HLA-E^G-K562 Zellen für 48 h auf einer anti-IFN-γ ELISpotmembran kokultiviert und die Anzahl spezifischer Spots [SFC] bestimmt.

2.1.2 Mutationsanalyse des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptidepitops

Da in einer Vielzahl von Patienten keine HLA-E restringierte T-Zellantwort nachgewiesen werden konnte, wurde nun untersucht, ob dies auf Mutationen im Epitop des Peptids HCV p18₃₅₋₄₄ zurückzuführen ist. Dazu wurde ein 260 Basenpaar- Segment des HCV core Gens (nt 344-360) amplifiziert, sequenziert und anschließend mit Hilfe des Programms BioEdit v.7.0.5 analysiert (Kap.III.4.9).

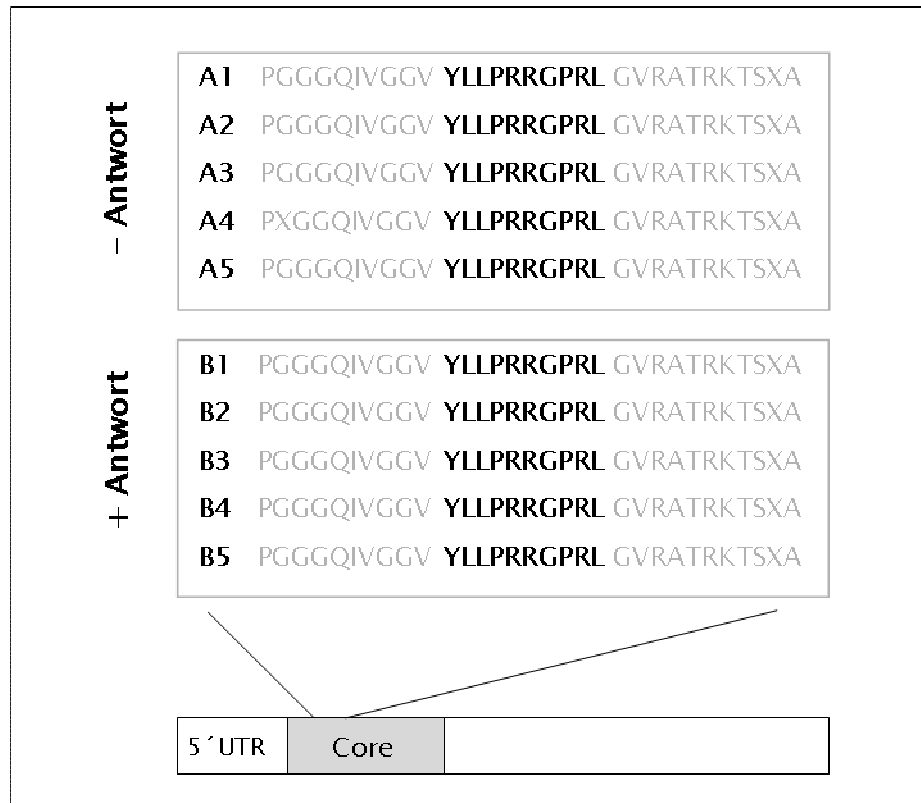


Abb.13: Sequenzvergleich des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptidepitops. Dargestellt sind je 5 repräsentative Aminosäuresequenzen (A) eines Patienten ohne und (B) eines Patienten mit HLA-E restringierter T-Zellantwort.

Die Sequenzierung ergab, dass in keinem der untersuchten Klone aller HCV-Patienten eine relevante Veränderung in der Peptidsequenz vorlag (Abb. 13). Dieses stimmt mit unserer Recherche in der Los Alamos Datenbank [204] überein, die ebenfalls ergab, dass die Aminosäuresequenz im Bereich des HCV p18₃₅₋₄₄ Epitops für alle HCV-Genotypen hoch konserviert ist.

2.1.3 HLA-E restringierte T-Zellantwort und klinische Parameter der HCV-Infektion

Um die mögliche klinische Bedeutung der nachgewiesenen HLA-E restringierten CD8(+) T-Zellantworten näher zu untersuchen, wurden diese mit Unterschieden in den klinischen Parametern einer HCV Infektion verglichen. Abbildung IV.5 zeigt den Vergleich der Viruslast (A), der ALT- und AST-Spiegel im Serum Therapie-naiver HCV(+) Patienten mit und ohne HLA-E restringierter T-Zellantwort. Interessanterweise wiesen Patienten, die eine HLA-E restringierte IFN- γ T-Zellantwort zeigten eine signifikant geringere HCV-

Viruslast auf als Patienten, bei denen eine solche Antwort nicht nachgewiesen wurde ($4,6 \times 10^6$ [$3,5 \times 10^5 - 1,6 \times 10^7$] vs. $2,5 \times 10^6$ [$0,7 \times 10^3 - 8,6 \times 10^6$] Kopien/ml; Median [range]; $p=0,017$) (Abb. 14A).

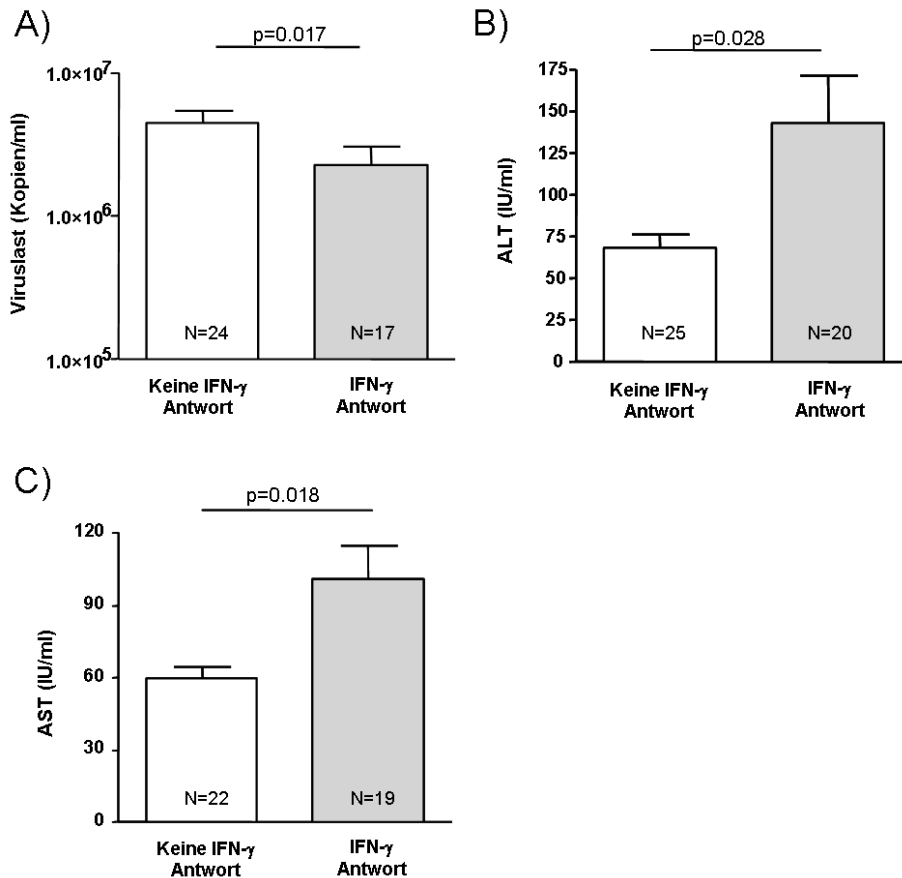


Abb. 14: Vergleich von (A) Viruslast, (B) ALT- und (C) AST-Serumspiegeln in Therapie-naiven HCV(+) Patienten mit (graue Balken) und ohne (weiße Balken) HLA-E restringierten T-Zellantworten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM.

Darüber hinaus zeigte sich, dass in diesen Patienten die HLA-E restringierte T-Zellantwort mit signifikant erhöhten ALT- (68 [25-215] vs. 143 [34-430] IU/ml; $p=0,028$) (Abb. 14B) und AST- Serumspiegeln (60 [24-215] vs. 101 [23-347] U/ml; $p=0,018$) (Abb. 14C) assoziiert war. Die Infektion mit verschiedenen HCV-Genotypen übte jedoch keinen Einfluss auf HLA-E restringierte T-Zellantworten aus (Daten nicht gezeigt).

2.1.4 HLA-A2 und HLA-E restringierte Erkennung des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids

HCV p18₃₅₋₄₄ stellt ein gut charakterisiertes HLA-A2 restringiertes T-Zellepitop dar, das von peripheren HCV-spezifischen CD8(+) T-Zellen erkannt wird [131]. Da unsere Daten gezeigt haben, dass das HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid sowohl über das klassische MHC-Molekül HLA-A2 als auch über das nicht-klassische MHC-Molekül HLA-E präsentiert werden kann, sollte nun untersucht werden, ob bei HCV infizierten Patienten HLA-A2 restringierte, HCV p18₃₅₋₄₄ -spezifische T-Zellen und auch HLA-E restringierte, HCV p18₃₅₋₄₄ -spezifische T-Zellen koexistieren. Dazu wurden 21 HLA-A2(+) positive HCV-Patienten simultan auf das Vorhandensein von HLA-E und HLA-A2 restringierten T-Zellantworten hin untersucht (Kap.III.3.2).

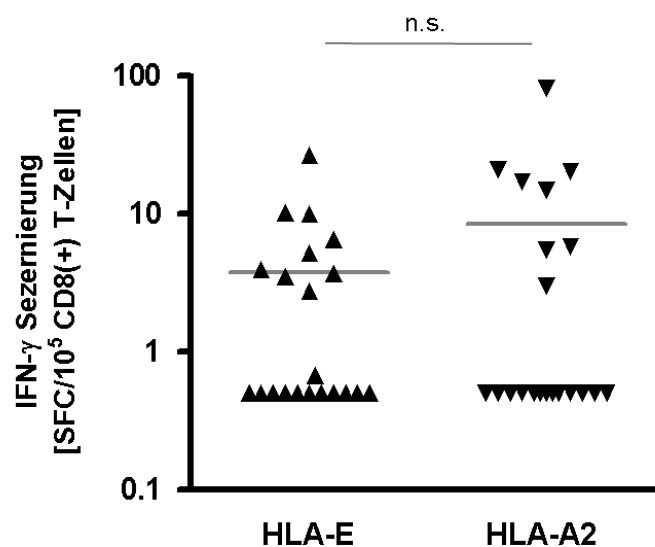


Abb. 15: HLA-E und HLA-A2 restringierte Erkennung von HCV p18₃₅₋₄₄. Vergleich der HLA-E und HLA-A2 restringierten Erkennung von HCV p18₃₅₋₄₄ bei HLA-A2(+) Patienten.

In Abbildung 15 ist dargestellt, dass sich bei diesen Patienten die Frequenz spezifischer T-Zellantworten (9/21 (42,9%) vs. 8/21 (38,1%); p=n.s.) nicht signifikant unterschied. Die Stärke (Anzahl der Spots) der HLA-A2 restringierten IFN-γ T-Zellantworten schien höher als die der HLA-E restringierten T-Zellantworten zu sein ([SFC/10⁵Zellen]: 5,1 ± 1,6 vs. 8,4 ± 3,9), jedoch erreichte diese Tendenz keine statistische Signifikanz. Des Weiteren konnten bei drei von neun Patienten mit HLA-E restringierter T-Zellantwort ebenfalls HLA-A2 restringierte T-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

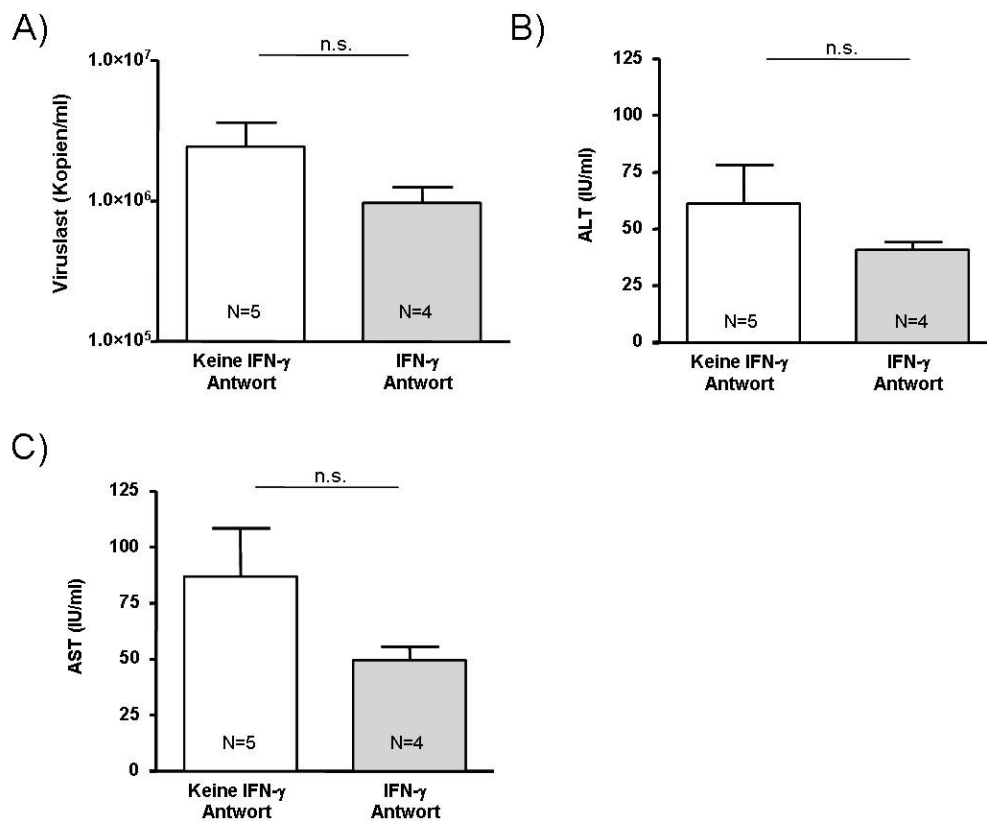


Abb. 16: HLA-A2 restringierte Erkennung von HCV p18₃₅₋₄₄. Vergleich der HCV Viruslast (A), ALT-(B) und AST-Serumspiegel (C) bei Therapie-naiven HCV(+) Patienten mit (graue Balken) und ohne (weiße Balken) HLA-A2 restringierter T-Zellantwort. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM.

Im Gegensatz zur HLA-E restringierten Erkennung des Peptids war die HLA-A2 restringierte Erkennung nicht mit einer signifikanten Veränderung der HCV-Viruslast ($2,6 \times 10^6$ [$1,6 \times 10^5 - 8,6 \times 10^6$] vs. $9,6 \times 10^5$ [$3,6 \times 10^5 - 1,7 \times 10^7$] Kopien/ml; Median [range]; $p=n.s.$) (Abb. 16A), der ALT- (61 [28-125] vs. 40 [31-45] IU/ml; $p=n.s.$) (Abb. 16B) oder der AST-Serumspiegel (87 [25–141] vs. 50 [32–60] U/ml; $p=n.s.$) (Abb. 16C) assoziiert.

2.1.5 HLA-E Genotypverteilung bei Patienten mit nachweisbarer HLA-E restringierter T-Zellantwort

In einer früheren Arbeit konnte in einer afrikanischen Kohorte gezeigt werden, dass das HLA-E^G Allel mit einem vierfach verringerten Risiko einer HIV-Infektion assoziiert war [52]. Um einen möglichen Einfluss des HLA-E Polymorphismus auf die HLA-E restringierte T-Zellantwort zu untersuchen, wurden die HLA-E Genotypen in der verwendeten HCV-Patientenkohorte

mittels Light Cycler *real time* PCR (Kap.III.4.9.1) bestimmt. In Abbildung 17 ist die Frequenz der HLA-E restringierten T-Zellantworten nach Präsentation des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids über das HLA-E^G Molekül in Abhängigkeit der jeweiligen HLA-E Genotypen der HCV(+) Patienten dargestellt.

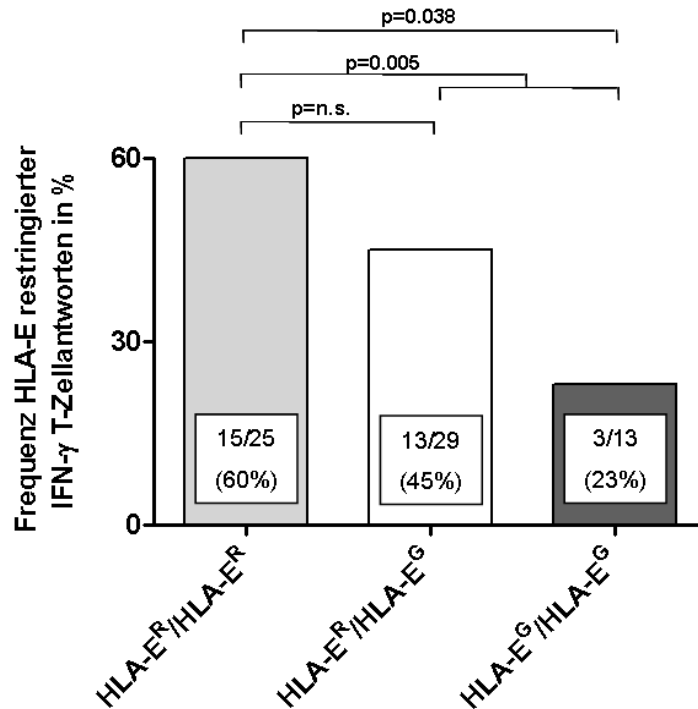


Abb. 17: Frequenz HLA-E restringierter T-Zellantworten bei HCV(+) Patienten mit unterschiedlichen HLA-E Genotypen. Patienten mit homozygotem HLA-E^R Genotyp weisen signifikant häufiger eine HCV p18₃₅₋₄₄-spezifische, HLA-E restringierte T-Zellantwort auf.

Interessanterweise zeigten Patienten mit homozygotem HLA-E^R Genotyp (60 %) signifikant häufiger eine HLA-E restringierte T-Zellantwort als Patienten, die den heterozygoten (45 %) oder den homozygoten HLA-E^G Genotyp (23 %) tragen. Von 26 Patienten (13 Patienten mit und 13 Patienten ohne HLA-E restringierte T-Zellantworten) standen genügend Zellen zur Verfügung, um die IFN-γ T-Zellantwort in Abhängigkeit des HLA-E Genotyps zu untersuchen. Unabhängig davon, ob HCV p18₃₅₋₄₄ über das HLA-E^G oder HLA-E^R Molekül präsentiert wurde, unterschied sich die Frequenz HLA-E restringierter CD8(+) T-Zellantworten nicht zwischen Patienten mit verschiedenen HLA-E Genotypen (Abb. 18).

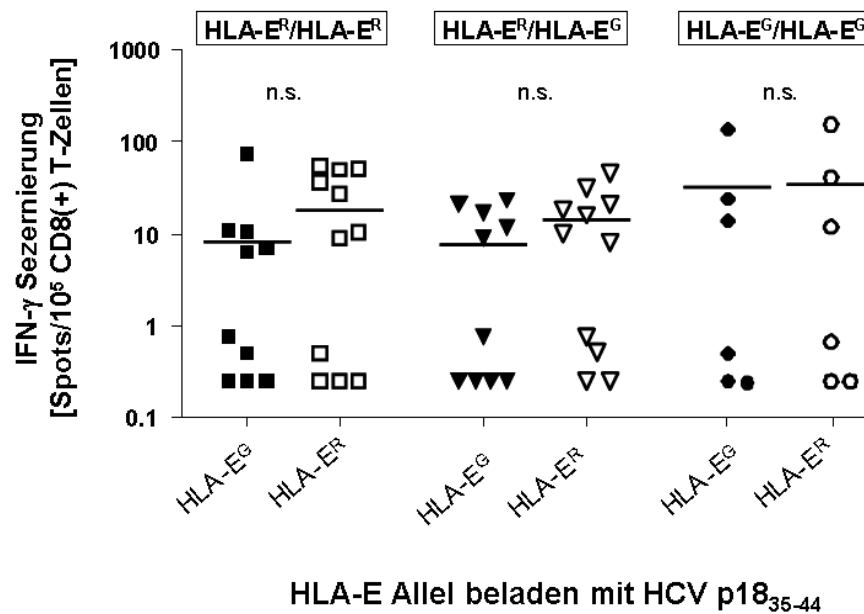


Abb. 18: Vergleich HLA-E restringierter T-Zellantworten bei Patienten mit unterschiedlichen HLA-E Genotypen nach Koinkubation von CD8(+) T-Zellen mit Peptidbeladenen HLA-E^G (ausgefüllte Symbole) und HLA-E^R-K562 Zellen (leere Symbole).

2.2. Verteilung der HLA-E Genotypen bei HCV(+) Patienten

2.2.1 HLA-E Genotypverteilung in Patienten, die mit unterschiedlichen HCV-Genotypen infiziert sind

Um Einflussfaktoren auf die Verteilung der HLA-E Genotypen (GT) in einer größeren Patientenkohorte zu analysieren, wurde die Gesamtzahl der genetisch untersuchten Individuen auf 308 HCV-infizierte Patienten und 140 gesunde Kontrollen erhöht. Bei der weiteren Auswertung wurden HCV(+) Patienten in zwei Gruppen unterschieden, abhängig vom HCV Genotyp, mit dem sie infiziert wurden. Dabei wurden Patienten, die mit den HCV Genotypen 1 oder 4 (HCV GT 1/4) infiziert waren, und Patienten, die mit dem HCV Genotyp 2 oder 3 (HCV GT 2/3) infiziert waren, als getrennte Gruppen betrachtet.

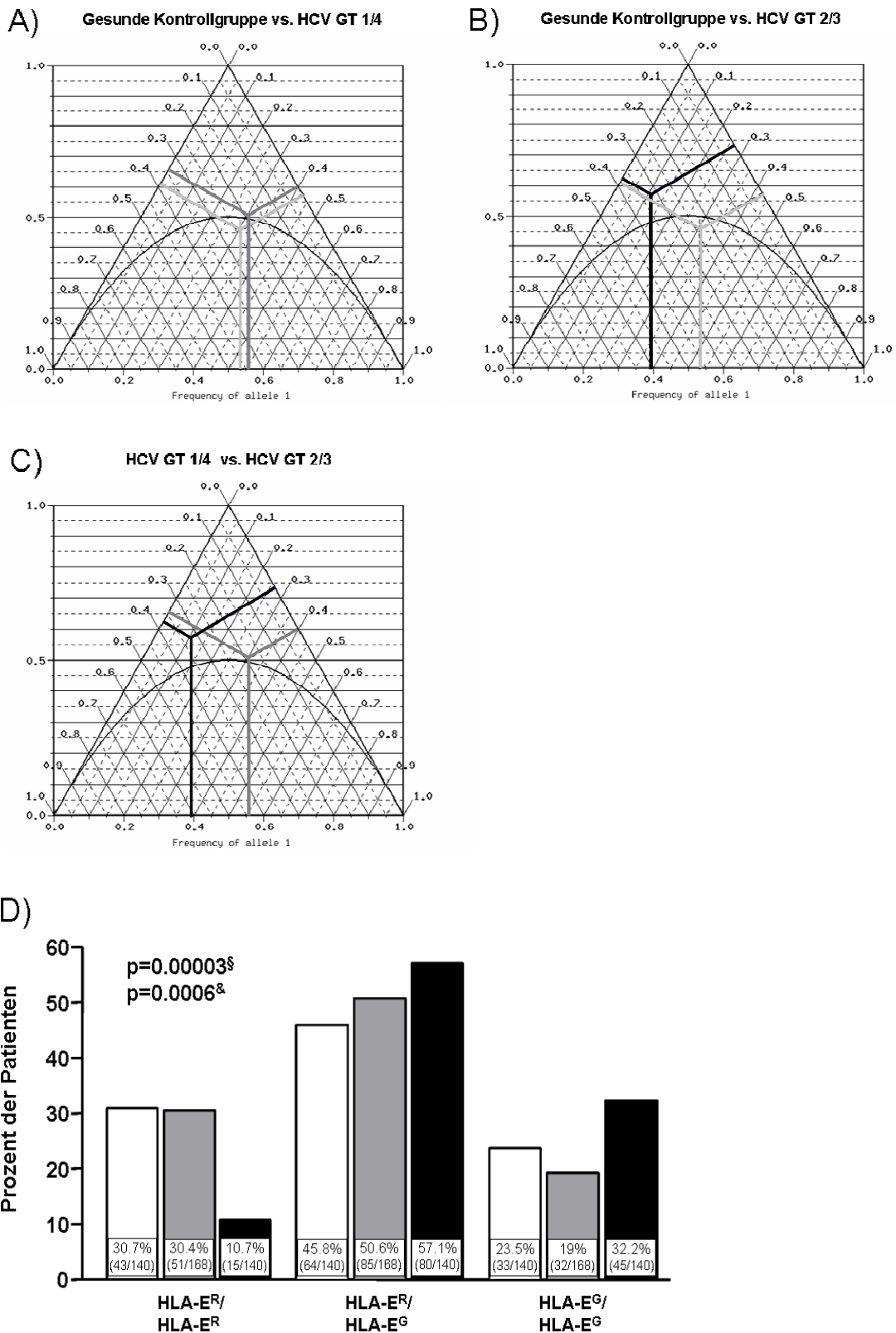


Abb. 19: Verteilung der HLA-E Genotypen bei gesunden Kontrollen, Patienten mit chronischer HCV Genotyp 1/4 und chronischer HCV Genotyp 2/3 Infektion. (A-C) De Finetti-Diagramme des HLA-E Polymorphismus. (A) Verteilung der HLA-E Genotypen bei gesunden Kontrollen (hellgrau) und Patienten mit chronischer HCV GT 1/4 Infektion (grau), (B) Verteilung der HLA-E Genotypen bei gesunden Kontrollen (hellgrau) und Patienten mit

chronischer HCV GT 2/3 Infektion (schwarz), (C) Verteilung der HLA-E Genotypen bei Patienten mit chronischer HCV GT 1/4 (grau) und Patienten mit chronischer HCV GT 2/3 Infektion (schwarz). (D) Säulendiagramm der Verteilung der HLA-E Genotypen bei gesunden Kontrollen (weiße Säulen), Patienten mit chronischer HCV Genotyp 1/4 (graue Säulen) und chronischer HCV Genotyp 2/3 (schwarze Säulen) Infektion. §: Signifikanzniveau des Vergleichs HCV GT 2/3 vs. HCV GT 1/4, &: Signifikanzniveau des Vergleichs HCV GT 2/3 vs. gesunde Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde mittels Armitage's trend test [<http://ihg2.helmholtzmuenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>] errechnet.

Interessanterweise zeigte sich, dass sich die Verteilung der HLA-E Genotypen bei Patienten mit einer HCV Genotyp 2/3 Infektion (E^R/E^R 15/140 (10,7 %), E^R/E^G 80/140 (57,1 %), E^G/E^G 45/140 (32,2 %)) signifikant von Patienten mit einer HCV Genotyp 1/4 Infektion (E^R/E^R 51/168 (30,4 %), E^R/E^G 85/168 (50,6 %), E^G/E^G 32/168 (19 %); $p=0,00003$) unterschied (Abb. 19). Die Verteilung der HLA-E Allele bei Patienten mit einer HCV Genotyp 2/3 Infektion war ebenfalls signifikant verschieden von der Verteilung der gesunden Kontrollgruppe (E^R/E^R 43/140 (30,7 %), E^R/E^G 64/140 (45,8 %), E^G/E^G 33/140 (23,5 %); $p=0,0006$).

1.2.2 HLA-E Genotypverteilung bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion im Vergleich zu Patienten mit spontaner Ausheilung der HCV-Infektion

Die akute Infektion mit HCV führt in 55 - 85 % der Fälle zu einer chronischen Hepatitis, während nur wenige Patienten in der Lage sind, das Virus spontan zu eliminieren [132]. Um den Einfluss des HLA-E Genotyps auf den Verlauf der HCV-Infektion näher zu untersuchen, wurde die Verteilung der HLA-E Genotypen zwischen Patienten mit chronischer HCV-Infektion und Patienten, die das Virus spontan eliminiert hatten, verglichen.

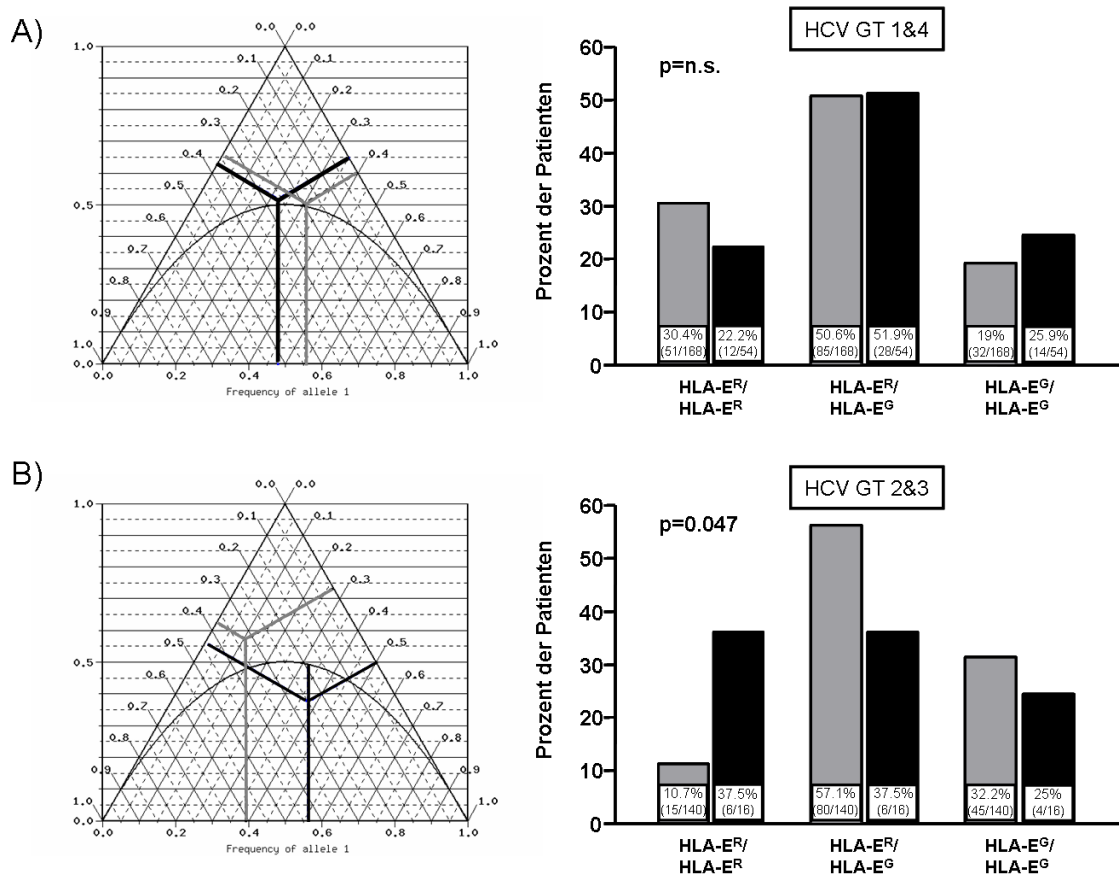


Abb. 20: Verteilung von HLA-E Genotypen bei Patienten mit chronischer und spontan ausgeheilter HCV-Infektion. (A) Verteilung der HLA-E Genotypen bei Patienten mit HCV Genotyp 1/4 Infektion, (B) Verteilung der HLA-E Genotypen in Patienten mit HCV Genotyp 2/3 Infektion. Dargestellt sind De Finetti-Diagramme und Säulendiagramme der HLA-E Genotypen von Patienten mit chronischer (graue Linien, bzw. Säulen) und ausgeheilter HCV-Infektion (schwarze Linien, bzw. Säulen).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der HLA-E Genotypen zwischen chronischen (E^R/E^R 51/168 (30,4 %), E^R/E^G 85/168 (50,6 %), E^G/E^G 32/168 (19,0 %) und ausgeheilten Patienten (E^R/E^R 12/54 (22,2 %), E^R/E^G 28/54 (51,9 %), E^G/E^G 14/54 (25,9 %), $p=n.s.$) bei einer HCV Genotyp 1/4 Infektion (Abb. 20A). Im Gegensatz dazu wiesen HCV Genotyp 2/3 infizierte Patienten, die das Virus spontan eliminierten, signifikant häufiger den HLA- $E^R/HLA-E^R$ Genotyp auf (E^R/E^R 6/16 (37,5 %), E^R/E^G 6/16 (37,5 %), E^G/E^G 4/16 (25,0 %) als Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion (E^R/E^R 15/140 (10,7 %), E^R/E^G 80/140 (57,1 %), E^G/E^G 45/140 (32,2 %), $p=0.047$). Es zeigte sich jedoch eine Abweichung der Genotypverteilung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium, so dass ein möglicher Selektionsbias bei der untersuchten Probanden-Stichprobe nicht ausgeschlossen werden kann (Abb. 20B).

3 Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HIV-Infektion

3.1 HLA-E restringierte Erkennung des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids durch CD8(+) T-Zellen

3.1.1 Nachweis HLA-E restringierter CD8(+) T- Zellen mittels ELISpot

Bei 73 HIV(+) Patienten und 10 gesunden Probanden wurde untersucht, ob das HIV p24₁₄₋₂₂ Peptid im Kontext des nicht-klassischen MHC-I Moleküls HLA-E von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden kann (Kap.III.3.2).

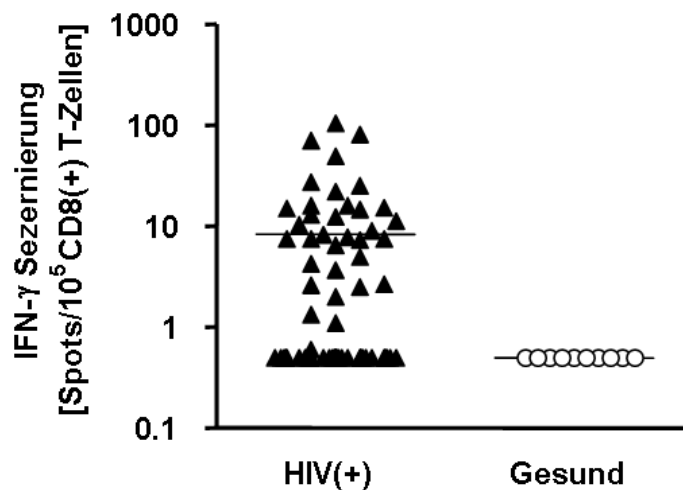


Abb. 21: HLA-E restringierte Erkennung des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids durch CD8(+) T-Zellen von HIV(+) Patienten. 1×10^5 CD8(+) T-Zellen wurden mit 1×10^5 Peptidbeladenen HLA-E^G-K562 Zellen für 48 h auf einer mit anti-IFN- γ Antikörpern beschichteten ELISpot-Membran kokultiviert. Der Nachweis des gebundenen Zytokins erfolgte mit einem IFN- γ spezifischen, Biotin-gekoppelten Antikörper und durch Zugabe eines Streptavidin-Enzym Konjugates, welches die Umsetzung eines Substrats in ein farbiges Präzipitat katalysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem ELISpot-Reader (Biosys).

Eine HLA-E restringierte, HIV-spezifische CD8(+) T-Zellantwort konnte bei 28/73 HIV(+) Patienten (38 %) nachgewiesen werden. Die Spezifität dieses Ergebnisses wurde dadurch bestätigt, dass keine Spots bei CD8(+) T-Zellen gesunder Spender detektiert wurden (Abb. 21).

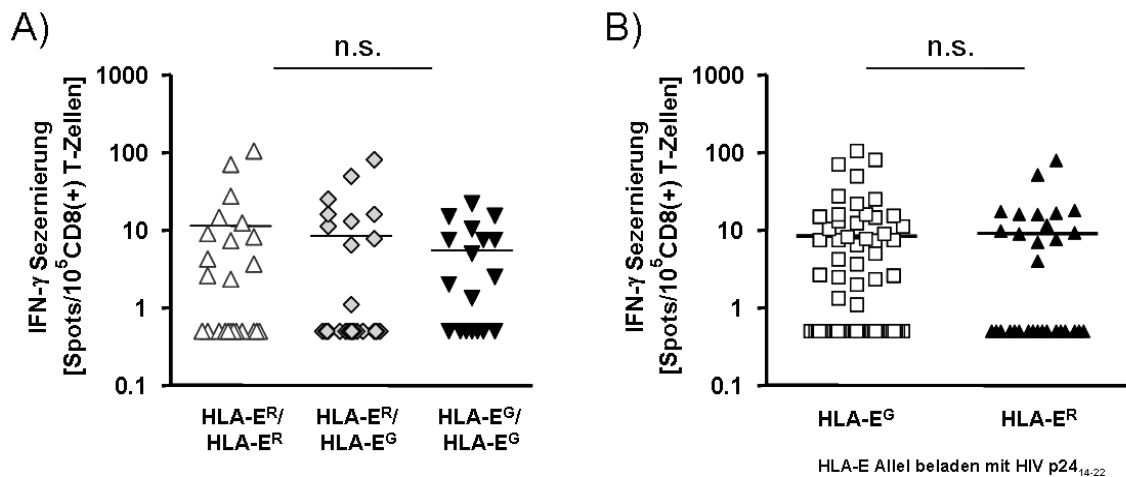


Abb. 22: HLA-E restringierte Erkennung des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids durch CD8(+) T-Zellen. A) HLA-E restringierte CD8(+) T-Zellantworten bei HIV(+) Patienten mit unterschiedlichen HLA-E Genotypen, B) Vergleich HLA-E restringierter T-Zellantworten nach Präsentation des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids über HLA-E^G- (rechteckige Symbole) und HLA-E^R-K562 Zellen (dreieckige Symbole).

Des Weiteren konnte im Unterschied zur Hepatitis C kein signifikanter Unterschied bezüglich der Frequenz und der Stärke HLA-E restringierter T-Zellantworten zwischen Patienten mit homozygotem HLA-E^G Genotyp und Patienten mit anderen HLA-E Genotypen nachgewiesen werden (HLA-E^R/HLA-E^R: 11,41 ± 5,09; HLA-E^R/HLA-E^G: 7,92 ± 3,16; HLA-E^G/HLA-E^G: 5,53 ± 1,52, p=n.s.) (Abb. 22A). Um zu untersuchen, ob eine Präsentation des HIV Peptids durch das HLA-E^G oder das HLA-E^R Allel Einfluss auf die CD8(+) T-Zellantwort ausübt, wurde bei 23 HIV-infizierten Patienten zusätzlich die T-Zellantwort nach Präsentation des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids über HLA-E^R-K562 Zellen untersucht. Es zeigten sich keine Unterschiede in den IFN-γ T-Zellantworten, wenn das HIV p24₁₄₋₂₂ Peptid über HLA-E^R oder HLA-E^G präsentiert wurde (HLA-E^G: 8,41 ± 2,14 v.s. HLA-E^R: 9,14 ± 3,02; p=n.s.) (Abb. 22B).

3.1.2 HLA-E restringierte T-Zellantwort und klinische Parameter der HIV-Infektion

Um die Bedeutung der HLA-E restringierten CD8(+) T-Zellantworten näher zu untersuchen, wurden diese im Zusammenhang mit klinischen Parametern der HIV-Infektion betrachtet. Es konnte keine Assoziation zwischen HLA-E

restringierter Erkennung des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids und der HIV-Viruslast nachgewiesen werden ($3,6 \times 10^4$ [$3,6 \times 10^3 - 1,2 \times 10^5$] vs. $7,4 \times 10^4$ [$4,5 \times 10^3 - 4,7 \times 10^5$] Kopien/ml; Median [range]; p=n.s.) (Abb. 23A). Des Weiteren zeigte sich kein Unterschied in der Frequenz HLA-E restringierter T-Zellantworten beim Vergleich von Patienten mit und ohne HAART (engl. *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), bzw. bei der Analyse der Patienten in Abhängigkeit von der CD4(+) T-Zellzahl (Abb. 23B & C).

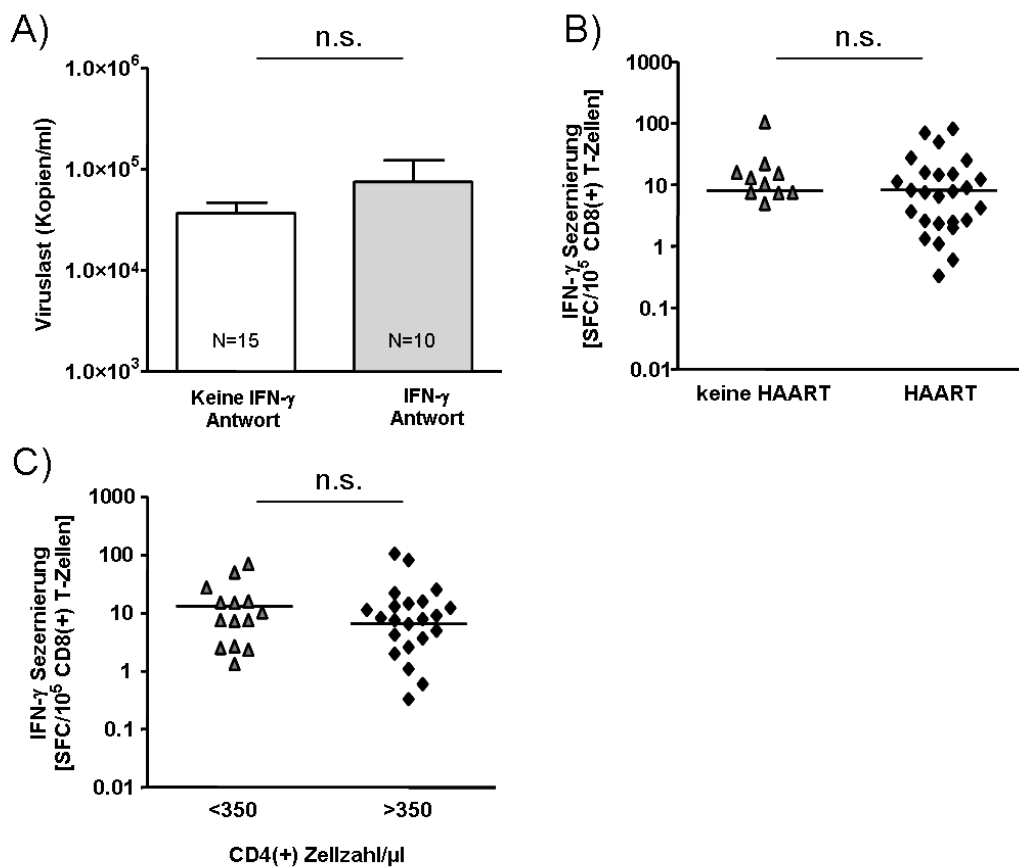


Abb. 23: Einfluss der HLA-E restringierten Erkennung des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids auf klinische Parameter der HIV-Infektion. A) Viruslast in Therapie-naiven HIV(+) Patienten mit (graue Balken) und ohne (weiße Balken) HLA-E restringierte T-Zellantworten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. B) Frequenz HLA-E restringierter T-Zellantworten in Patienten mit und ohne Therapie und C) mit unterschiedlichen CD4(+) T-Zellzahlen.

Da das HIV p24₁₄₋₂₂ Peptid ein gut charakterisiertes HLA-A2 restringiertes T-Zellepitop darstellt, wurde bei 27 HIV-infizierten Patienten untersucht, ob HLA-A2 und HLA-E restringierte HIV p24₁₄₋₂₂ spezifische T-Zellen ko-existieren. Die Frequenz (11/27 (40,7 %) vs. 16/27 (59,3 %); p=n.s.) und die Stärke der

HIV p24₁₄₋₂₂ spezifischen T-Zellantworten ([SFC/10⁵Zellen]: 8,9 ± 3,9 vs. 16,2 ± 4,1) unterschied sich bei diesen Patienten nicht (Abb. 24). Ebenfalls konnte bei lediglich 8 von 27 Patienten eine duale Erkennung des Peptids sowohl über HLA-A2 als auch über HLA-E Moleküle nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

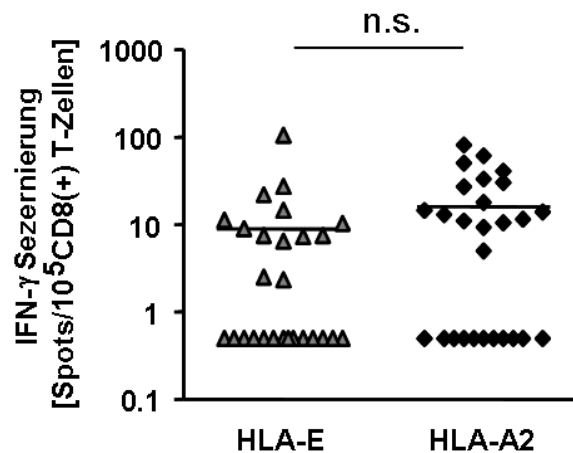


Abb. 24: HLA-E und HLA-A2 restringierte Erkennung von HIV p24₁₄₋₂₂. Vergleich der HLA-E und HLA-A2 restringierten Erkennung von HIV p24₁₄₋₂₂ bei HLA-A2(+) Patienten.

Des Weiteren konnte kein Einfluss der HLA-A2 restringierten Erkennung des HIV-Peptids auf klinische Parameter der HIV-Infektion wie HIV-Viruslast und CD4(+) T-Zellzahl nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2 Modulation der NK-Zellantwort durch HLA-E

Da HLA-E über die Interaktion mit CD94 / NKG2A/C Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Modulation von NK-Zellantworten spielt, sollte ebenfalls der Frage nachgegangen werden, ob der Polymorphismus im HLA-E Gen Einfluss auf die NK-Zellantwort bei HIV(-) Patienten ausübt. NK-Zellen von HIV(-) Patienten wurden mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G- und HLA-E^R-K562 Zellen koinkubiert. Anschließend wurde die zytotoxische Aktivität und die Aktivierung der NK-Zellen anhand der Expression der Oberflächenmarker CD107a und CD69 durchflusszytometrisch untersucht.

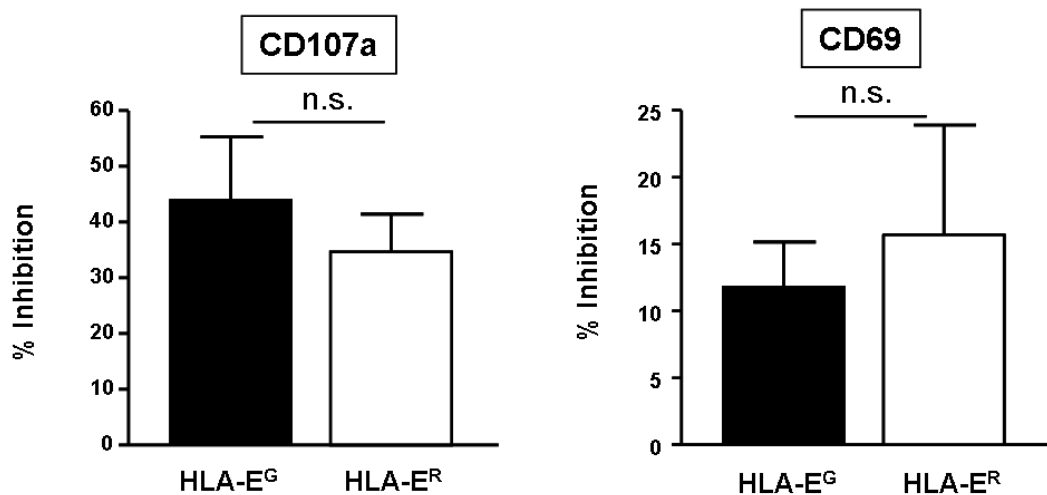


Abb. 25: Inhibierung der zytolytischen Aktivität (CD107a Expression, N=5) und der Aktivierung (CD69 Expression, N=13) peripherer NK-Zellen von HIV(-) Patienten nach Koinkubation mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G- und HLA-E^R-K562 Zellen. Angegeben sind Mittelwert ± SEM.

In Abbildung 25 ist die Inhibierung der zytolytischen Aktivität (CD107a) und der Aktivierung (CD69) von NK-Zellen von HIV(-) Probanden dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der CD107a und der CD69 Induktion zwischen NK-Zellen, die mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Zellen und NK-Zellen, die mit HIV p24₁₄₋₂₂ HLA-E^R-K562 Zellen stimuliert wurden, festgestellt werden (CD107a: HLA-E^G: 43,91 % ± 11,36 % v.s. HLA-E^R: 34,68 % ± 6,74 %, p=n.s; CD69: HLA-E^G: 11,79 % ± 3,36 % v.s. HLA-E^R: 15,71 % ± 8,21 %, p=n.s).

3.3 Einfluss von HLA-E auf den Crosstalk von NK-Zellen und DC

3.3.1 Expression von NKG2-Rezeptoren auf CD56(+) NK-Zellen

Die Expression des inhibitorischen NK-Zellrezeptors NKG2A und des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2C auf peripheren CD56(+) NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch bei 18 HIV(+) Patienten und 19 gesunden Kontrollen bestimmt. Wie in Abbildung 26 dargestellt, zeigte sich in Übereinstimmung mit vorangehenden Publikationen eine verringerte NKG2A-Expression auf CD56(+) NK-Zellen HIV-infizierter Patienten (Mittelwert ± SEM:

30,72 %± 4,88 %) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (42,73 %± 3,31 %, p=0,028).

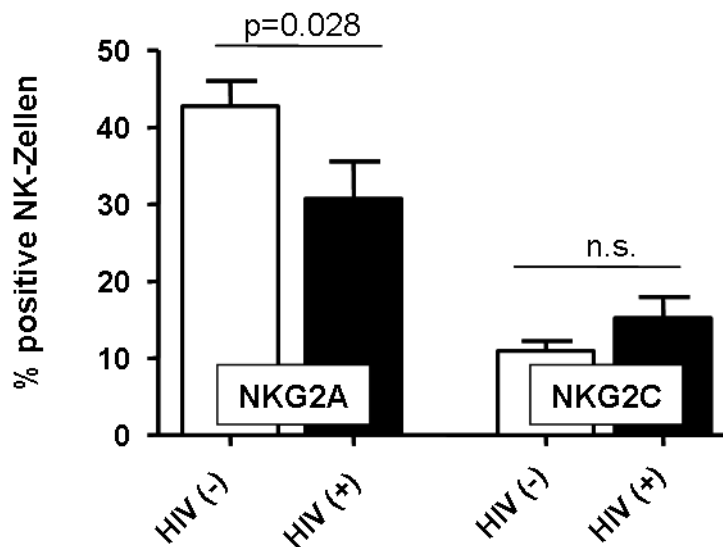


Abb. 26: Expression von NKG2-Rezeptoren auf CD56(+) NK-Zellen. Die Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors sowie des aktivierenden NKG2C-Rezeptors wurde durchflusszytometrisch bei HIV(-) Kontrollen (weiße Säulen) und HIV(+) Patienten (schwarze Säulen) bestimmt. Angegeben sind Mittelwert sowie Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Im Gegensatz dazu, ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der NKG2C-Expression zwischen HIV(+) Patienten und der gesunden Kontrollgruppe nachweisen (15,21 % ± 2,8 % vs. 10,93 % ± 1,3 %; p=n.s.).

3.3.2 Einfluss von NK-Zellen auf die Ausreifung von MODC

Die Methode zur Generierung von *monocyte-derived-dendritic cells* (MODC) nutzt die Fähigkeit humaner Monozyten in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF zu unreifen dendritischen Zellen zu differenzieren. Durch die durchflusszytometrische Analyse charakteristischer Oberflächenmarker wie CD14 kann dieser Differenzierungsschritt nachgewiesen werden. Monozyten weisen eine hohe Expression von CD14 auf, unreife dendritische Zellen exprimieren hingegen kein CD14 auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 27).

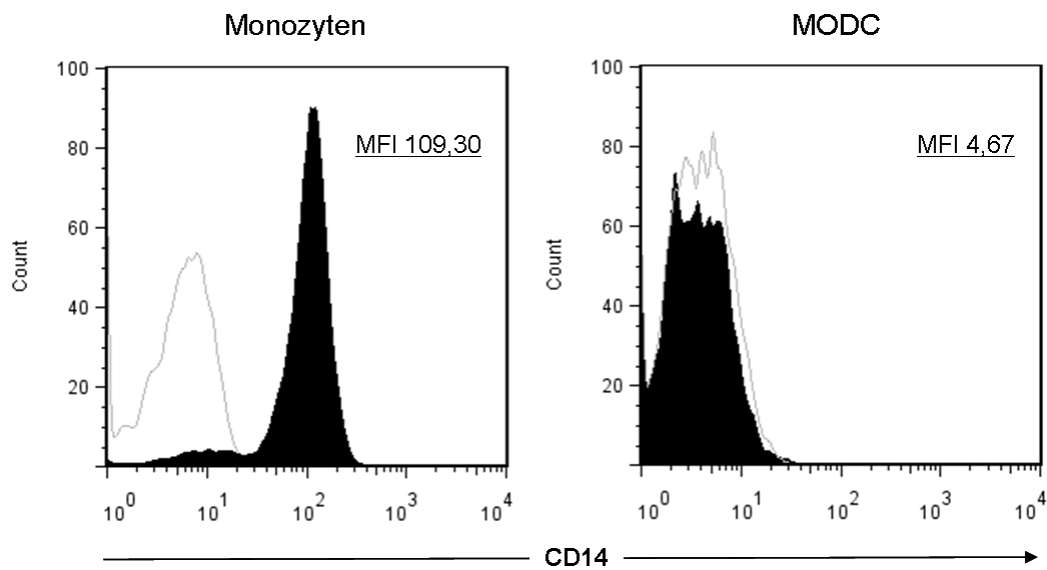


Abb. 27: Expression von CD14 auf Monozyten und MODC. Die Expression von CD14 wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die im Folgenden beschriebenen MODC-Kokulturrexperimente wurden ausschließlich HLA-E^G transfizierte-K562 Zellen verwendet, da in Pilotexperimenten kein signifikanter Unterschied in der Verwendung beider HLA-E Transfektanten nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). NK-Zellen von HIV(+) Patienten und gesunden Probanden wurden isoliert (Kap.III.3.1), mit HLA-E^G-K562 Zellen für sechs Stunden kokultiviert, und unreife MODC mit den daraus resultierenden Überständen für 12 h stimuliert (Kap.III.2.6). Anschließend wurde die Expression von MHC-I, HLA-DR, CD86 und CD40 durchflusszytometrisch auf den MODC untersucht (Abb. 28).

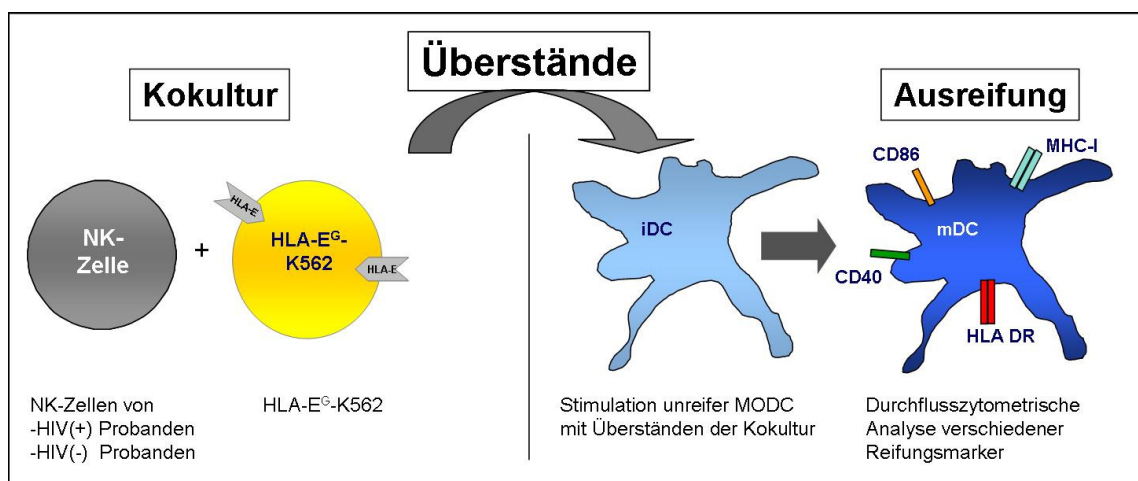


Abb. 28: Schematische Darstellung der Versuchsbedingungen.

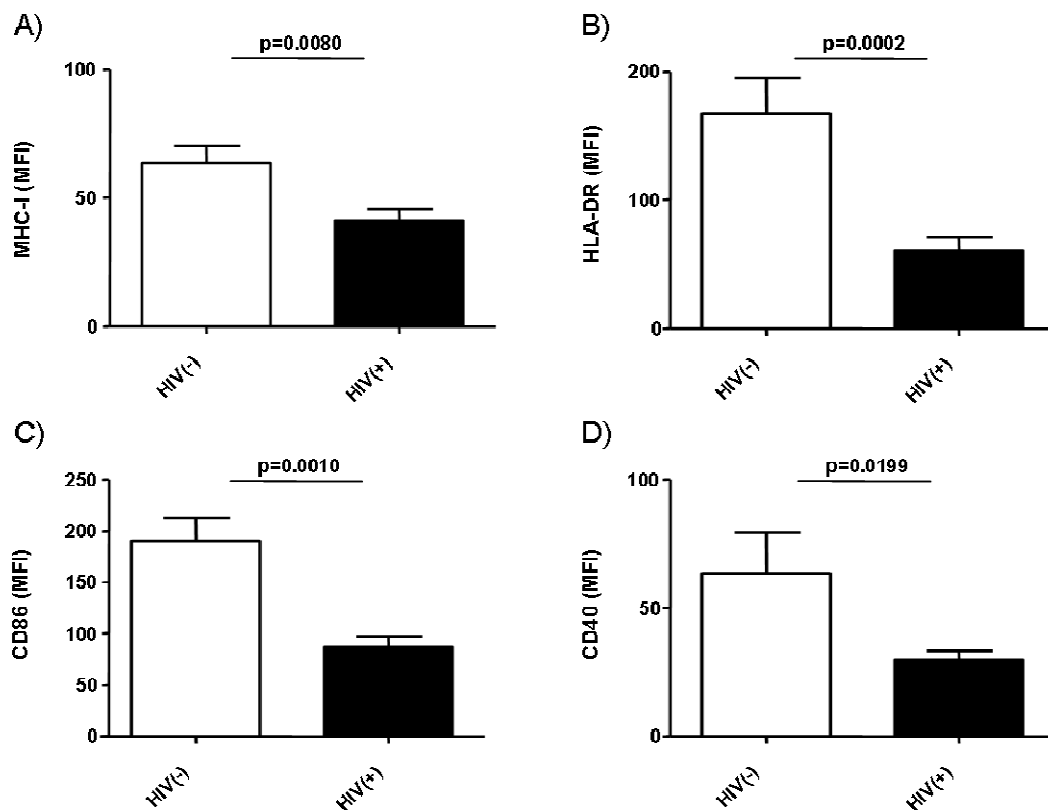


Abb. 29: NK-Zellen von HIV(+) Patienten führen zu einer verminderten Ausreifung von MODC im Vergleich zu gesunden Kontrollen. NK-Zellen von HIV(+) Patienten und gesunden Kontrollen wurden mit HLA-E^G-K562 Zellen koinkubiert und die resultierenden Überstände wurden benutzt, um MODC zu stimulieren. Die Expression von MHC-I (A), HLA-DR (B), CD86 (C) und CD40 (D) war bei MODC, die mit HIV(+) NK / HLA-E^G Überständen stimuliert wurden, signifikant verringert. Angegeben sind Mittelwert ± SEM.

Wie in Abbildung 29A dargestellt, war die Expression von MHC-I auf MODC, die mit Überständen von HIV(+) NK-Zellen mit HLA-E^G-K562 Zellen inkubiert wurden, signifikant geringer als bei MODC, die mit Überständen von HIV(-) NK-Zellen und HLA-E^G-K562 Zellen stimuliert wurden (41,40 % ± 4,26 % vs. 63,54 % ± 6,79 %, p=0,0080). Parallel dazu konnte eine verringerte Expression des MHC-II Moleküls HLA-DR nachgewiesen werden (60,97 % ± 10,52 % vs. 167,3 % ± 27,55 %, p=0,0002) (Abb. 29B). Des Weiteren zeigten MODC, die mit HIV(+) NK / HLA-E^G-K562 Überständen stimuliert wurden, eine verringerte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 (87,28 % ± 10,03 % vs. 190,1 % ± 22,05 %, p=0,0010) und CD40 (29,70 % ± 3,67 % vs. 63,56 % ± 15,88 %, p=0,0199) (Abb. 29C & D).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass MODC, die mit HIV(+) NK / HLA-E^G-K562 Überständen stimuliert wurden, ein geringeres Ausmaß an Ausreifung

aufweisen als MODC, die mit Überständen von HIV(-) NK-Zellen nach Kokultur mit HLA-E^G-K562 Zellen stimuliert wurden.

3.3.3 Einfluss der HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelten HLA-E Stabilisierung auf die Ausreifung von MODC

Um den Einfluss der HIV p24₁₄₋₂₂-vermittelten Stabilisierung der HLA-E Oberflächenexpression auf den Crosstalk zwischen NK-Zellen und DC zu untersuchen, wurden NK-Zellen von HIV(+) Patienten und gesunden Kontrollen mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Zellen kokultiviert und dann MODC mit den resultierenden Überständen stimuliert. Anschließend wurde die Expression von MHC-I, HLA-DR, CD86 und CD40 durchflusszytometrisch auf den MODC bestimmt.

In Abbildung 30 ist die Expression der Reifungsmarker MHC-I, HLA-DR, CD40 und CD86 auf MODC dargestellt, die mit Überständen von NK / HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Kokulturen und NK / unbeladenen HLA-E^G-K562 Kokulturen stimuliert wurden. Dabei wurden zur Generierung der Überstände NK-Zellen von HIV(-) und HIV(+) Probanden verwendet. Es zeigte sich, dass MODC, die mit NK / HLA-E^G-K562 Überständen von gesunden Probanden stimuliert wurden, eine signifikant geringere Menge an MHC-I Molekülen exprimieren, wenn HLA-E durch HIV p24₁₄₋₂₂ stabilisiert wurde (MFI Überstände ohne vs. MFI Überstände mit HIV p24₁₄₋₂₂: 62,25 % ± 8,14 % vs. 55,74 % ± 7,71 %; p=0,035). Des Weiteren exprimierten MODC, die mit NK-Zellüberständen gesunder Probanden stimuliert wurden, in Gegenwart des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids signifikant weniger HLA-DR (171,7 % ± 28,74 % vs. 139,0 % ± 23,30 %; p=0,0231) und CD40 (52,21 % ± 11,87 % vs. 36,90 % ± 4,49 %; p=0,0084) auf ihrer Zelloberfläche, während die CD86 Expression nicht beeinflusst wurde (190,1 % ± 22,05 % vs. 185,6 % ± 23,38 %; p=n.s.). Interessanterweise konnte dieser Effekt bei der Stimulation der MODC mit Überständen der HIV(+) Probanden bei keinem der untersuchten Reifungsmarker nachgewiesen werden (MHC-I: 47,25 % ± 5,94 % vs. 48,23 % ± 6,50 %; HLA-DR: 60,97 % ± 10,52 % vs. 69,48 % ± 13,96 %; CD40: 30,69 % ± 3,74 % vs. 33,10 % ± 5,06 %; CD86: 87,28 % ± 10,03 % vs. 94,22 % ± 10,29 %; p=n.s.).

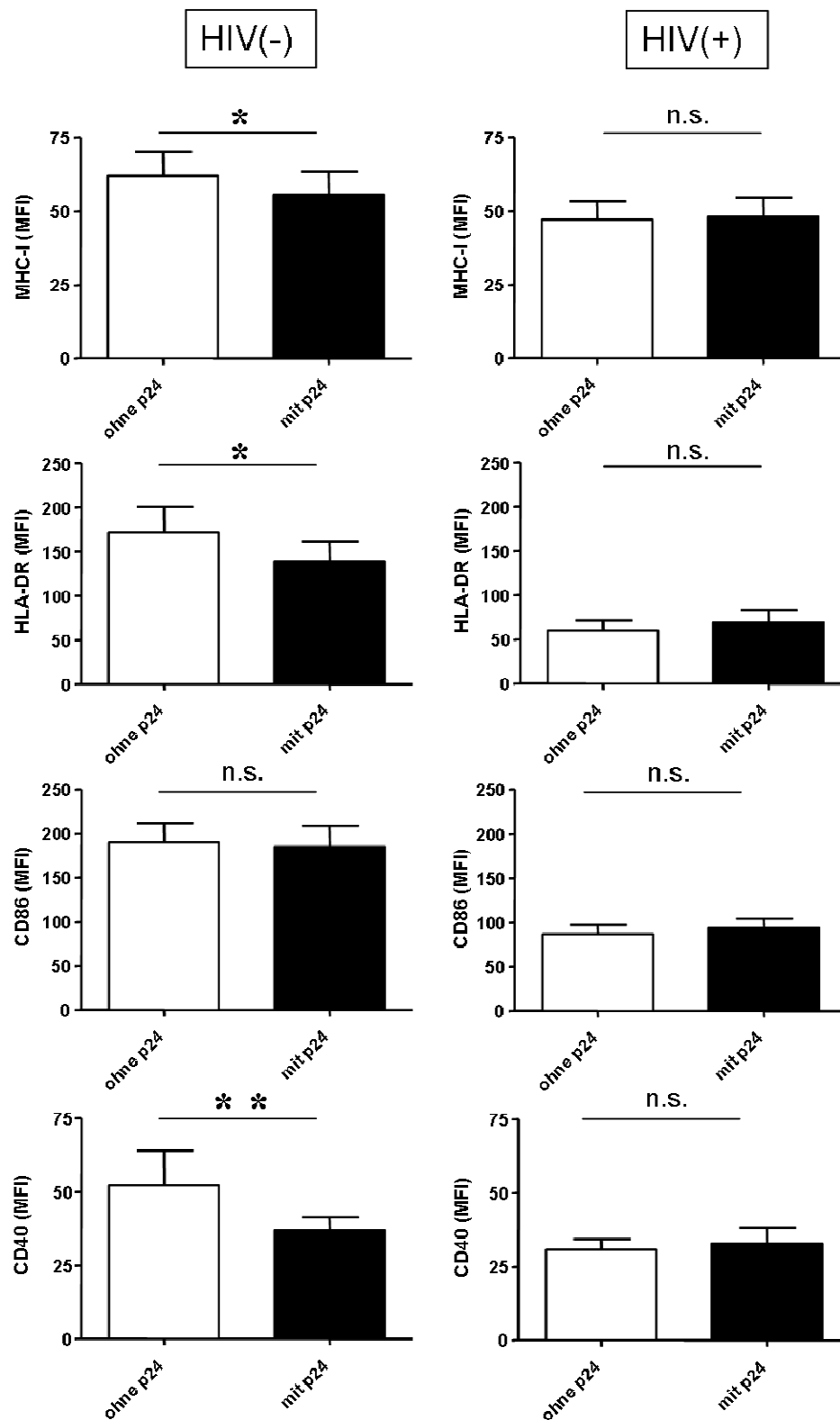


Abb. 30: Die HIV p24₁₄₋₂₂ induzierte HLA-E Stabilisierung beeinflusst die NK-Zell vermittelte Reifung von MODC. NK-Zellen von HIV(+) und HIV(-) Probanden wurden mit unbeladenen und HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Zellen kokubiert, die resultierenden Überstände zur Stimulation von MODC eingesetzt und die Expression von MHC-I, HLA-DR, CD86 und CD40 durchflusszytometrisch bestimmt. Angegeben sind Mittelwert ± SEM Signifikanzniveau: * = < 0,05; ** = < 0,01.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass NK-Zellen gesunder Probanden nach Koinkubation mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Zellen nur vermindert in der Lage waren, die Ausreifung von MODC zu induzieren. Zudem sind die NK-Zellen HIV(+) Patienten durch die *in vivo* Exposition wahrscheinlich bereits maximal über HLA-E inhibiert, so dass die HLA-E Stabilisierung durch HIV p24₁₄₋₂₂ *in vitro* keinen zusätzlichen Effekt mehr zeigt.

3.3.4 Untersuchung der Zytokinsekretion von HIV(+) und HIV(-) NK-Zellen

Im Folgenden sollten die Mediatoren, die zu einer verringerten Ausreifung von MODC führten, näher charakterisiert werden. Da NK-Zellen von HIV(+) Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine veränderten Phänotyp aufweisen (Kap.IV.4.1), wurden NK-Zellen von HIV(+) und HIV(-) Probanden mit unbeladenen und HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G-K562 Zellen koinkubiert und die Konzentration der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-10 mittels ELISA im Zellüberstand bestimmt. Es zeigte sich, dass nach Koinkubation mit HLA-E^G-K562 Zellen die NK-Zellen gesunder HIV(-) Probanden signifikant mehr IFN- γ in den Überstand sezernierten als NK-Zellen von HIV(+) Probanden (HIV(-): 1048,0 pg/ml \pm 516,8 pg/ml vs. HIV(+): 80,84 pg/ml \pm 35,17 pg/ml; $p=0,05$). Dieser Effekt konnte ebenfalls für das Zytokin TNF- α nachgewiesen werden (HIV(-): 3351 pg/ml \pm 1315 pg/ml vs. HIV(+): 867,8 pg/ml \pm 543,7 pg/ml, $p=0,049$) (Abb. 31A).

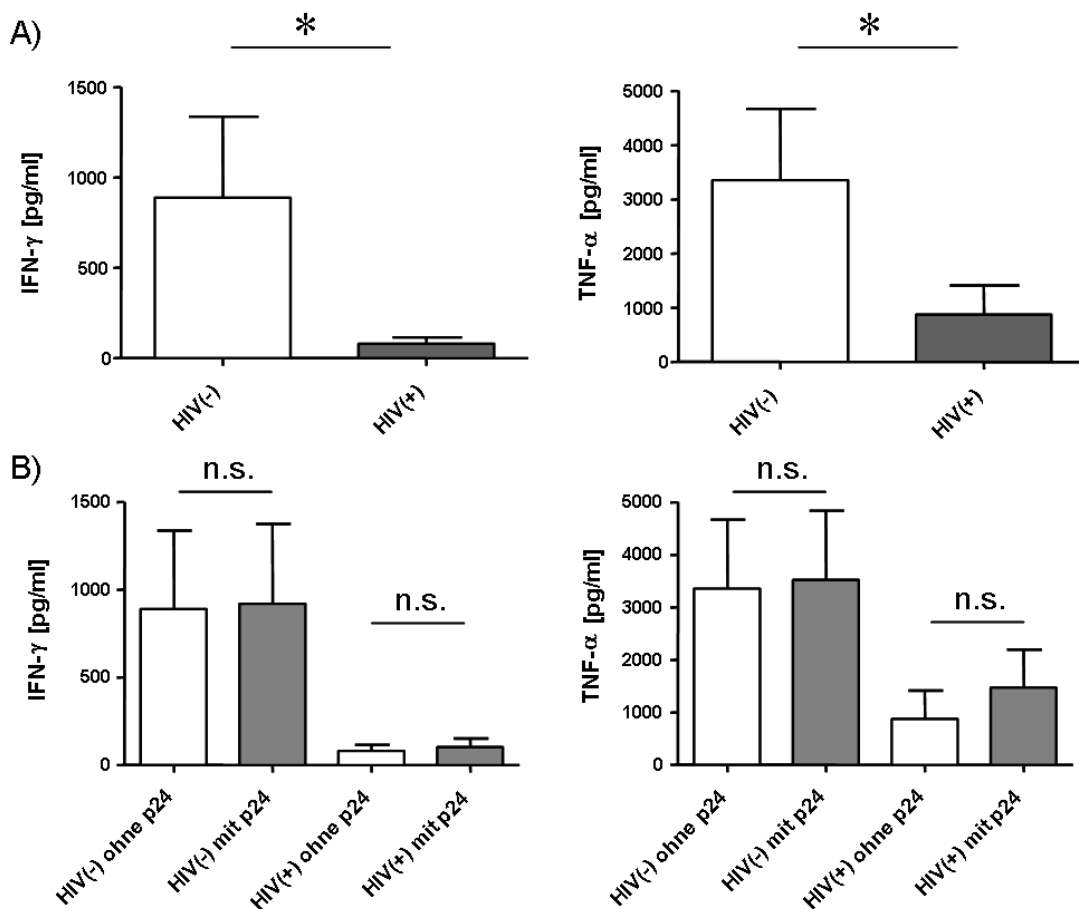


Abb. 31: Nachweis der Zytokine IFN- γ und TNF- α im Überstand nach Koinkubation von NK-Zellen und HLA-E^G-K562 Zellen. A) NK-Zellen von HIV(+), (weiße Säule) und HIV(-) Probanden (graue Säule) wurden mit unbeladenen HLA-E^G-K562 Zellen koinkubiert und mittels ELISA die Produktion von IFN- γ und TNF- α durch NK-Zellen ermittelt. B) Einfluss der HLA-E Stabilisation durch HIV p24₁₄₋₂₂ auf die Produktion von IFN- γ und TNF- α . Angegeben sind Mittelwert \pm SEM, Signifikanzniveau: * = < 0,05.

Die HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelte HLA-E Stabilisierung scheint jedoch bei beiden Patientengruppen die Sekretion der Zytokine IFN- γ und TNF- α durch NK-Zellen nicht zu verändern (Abb. 31B). Überraschenderweise konnte das Zytokin IL-10 weder bei Stimulation der NK-Zellen von HIV(+) Patienten noch bei gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.4 Einfluss von HLA-E auf die Sekretion von TNF- α

Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte zeigen, dass durch das Zytokin TNF- α die sexuelle Transmission von HIV-1 wesentlich beeinflusst wird [101]. Da keine signifikanten Unterschiede in der NK-Zellantwort und CD8(+) T-Zellantwort in Abhängigkeit von den beiden HLA-E Allelen nachgewiesen werden konnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die beobachteten Effekte auf ein *linkage disequilibrium* mit den Genen in Nachbarschaft zu HLA-E beruhen könnte. Da TNF ein Kandidat für ein derartiges Gen sein könnte, wurde daher als nächstes die Zellpopulation der Monozyten im peripheren Blut näher untersucht (Kap.III.2.3). Denn diese stellen den Hauptproduzenten des Zytokins TNF- α dar.

Interessanterweise zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass sich die Frequenz TNF- α positiver Monozyten bei HIV(-) Probanden signifikant zwischen den Trägern verschiedener HLA-E Genotypen unterschied. Dabei wiesen Individuen mit einem homozygoten HLA-E^G Genotyp (3,28 % \pm 0,80 %) eine signifikant geringere Anzahl TNF- α positiver Monozyten im Vergleich zu Individuen auf, die das HLA-E^R Allel trugen (8,49 % \pm 1,39 %; $p=0,02$) (Abb. 32A, linker Graph). Dieser Effekt konnte ebenfalls bei HIV(+) Probanden nachgewiesen werden (5,68 % \pm 1,11 % vs. 10,15 % \pm 1,19 %; $p=0,05$) (Abb. 32A, rechter Graph). Darüber hinaus zeigten weniger Monozyten von HIV(-) Individuen mit dem HLA-E^G/HLA-E^G Genotyp (43,93 % \pm 6,91 %) nach Stimulation mit LPS eine signifikant niedrigere Produktion von TNF- α als Monozyten von Individuen mit dem HLA-E^G/HLA-E^R (71,67 % \pm 4,94 %; $p=0,02$) oder dem HLA-E^R/HLA-E^R (64,70 % \pm 5,22 %; $p=0,04$) Genotyp. Im Gegensatz dazu unterschied sich die TNF- α Produktion von Monozyten zwischen Trägern des HLA-E^G/HLA-E^R und des HLA-E^R/HLA-E^R Genotyps nicht (Abb. 32B, linker Graph).

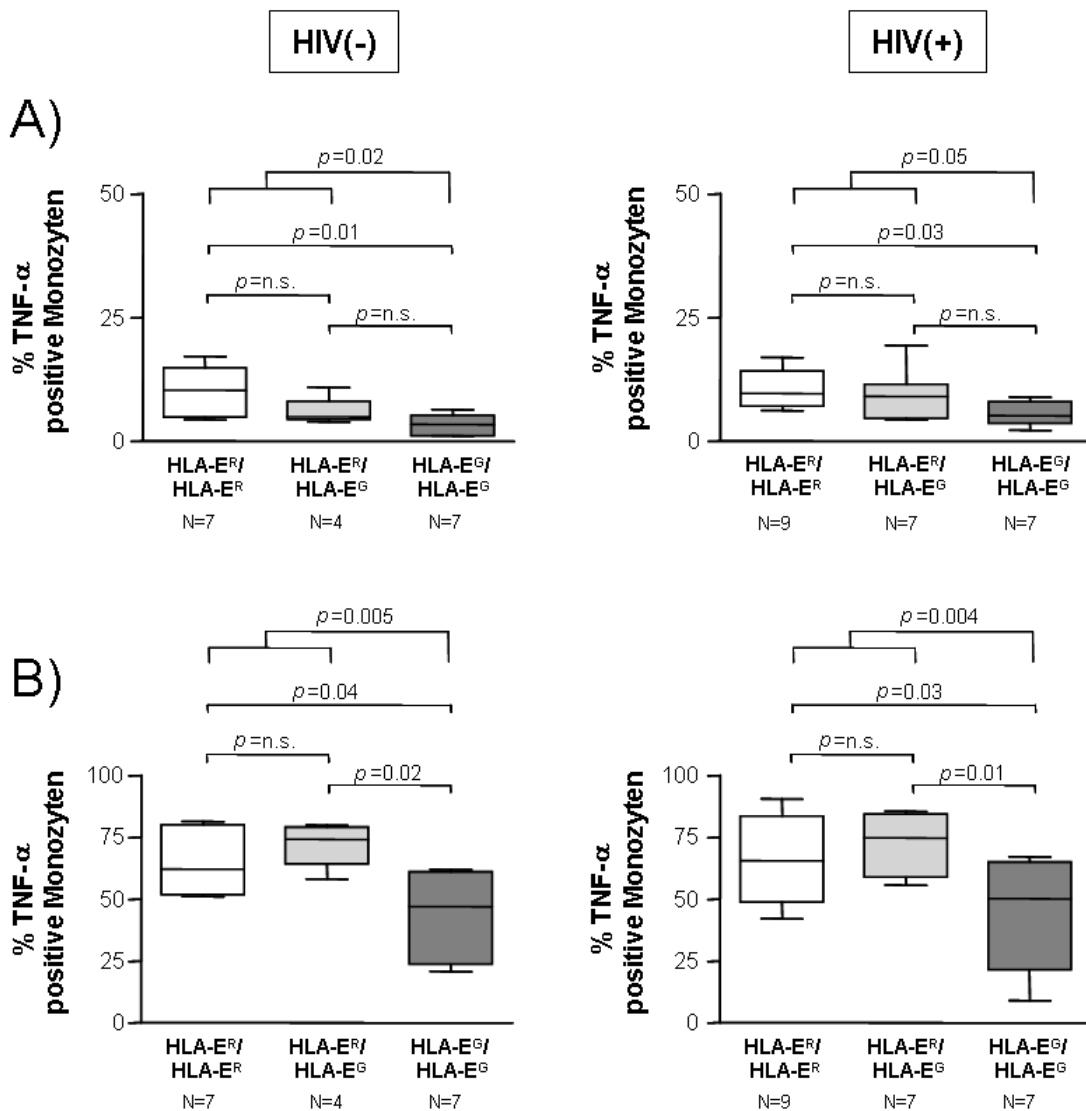


Abb. 32: TNF-α Sekretion durch CD14(+) Monozyten bei Probanden mit unterschiedlichen HLA-E Genotypen. Intrazellulärer Nachweis von TNF-α in A) unstimulierten und B) LPS stimulierten CD14+ Monozyten bei HIV(-) und HIV(+) Probanden mit verschiedenen HLA-E Genotypen. Gezeigt sind Boxplot-Diagramme. Die Boxen markieren die 25-, 50- (Median) und 75-Perzentile.

Dieser Effekt konnte analog auch bei HIV(+) Probanden nachgewiesen werden (HLA-E^G/HLA-E^G: 42,76 % ± 8,51 %; HLA-E^R/HLA-E^R: 66,50 % ± 5,87 %; p=0,03; HLA-E^R/HLA-E^G: 72,21 % ± 4,85 %; p=0,01) (Abb. 32B, rechter Graph).

3.5 Verteilung von TNF-α Genotypen in HIV(+) Patienten

Basierend auf der Assoziation des TNF-α -308 A/G Polymorphismus mit der Menge an produziertem TNF-α lassen sich Individuen in so genannte TNF-α

high (TNF- α A/A, TNF- α G/A) und TNF- α *low* (TNF- α G/G) Produzenten klassifizieren. Da das TNF- α Gen im MHC-Komplex in der Nähe des HLA-E Gens lokalisiert ist (Kap.I.4.1), wurde nun untersucht, ob genetische Assoziationen zwischen einer differentiellen TNF- α Produktion und dem HLA-E Genotyp bestehen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der TNF- α -308 A/G Genotypen bei gesunden Probanden mit unterschiedlichen HLA-E Genotypen. Dabei wiesen Probanden, die homozygot das HLA-E^G Allel trugen, signifikant häufiger einen „TNF- α low producer“ (LP) Genotyp auf als Probanden, die Träger eines anderen HLA-E Genotyps waren (HLA-E^G/HLA-E^G: 73/77 (94,81 %); HLA-E^R/HLA-E^R: 66/144 (45,83 %), HLA-E^R/HLA-E^G: 122/185 (65,95 %); $p=2,2 \times 10^{-7}$). Diese Assoziation konnte bei den HIV(+)-Patienten bestätigt werden (HLA-E^G/HLA-E^G: 76/89 (85,40 %); HLA-E^R/HLA-E^R: 60/100 (60,0 %), HLA-E^R/HLA-E^G: 130/183 (71,04 %); $p=0,00012$) (Abb. 33).

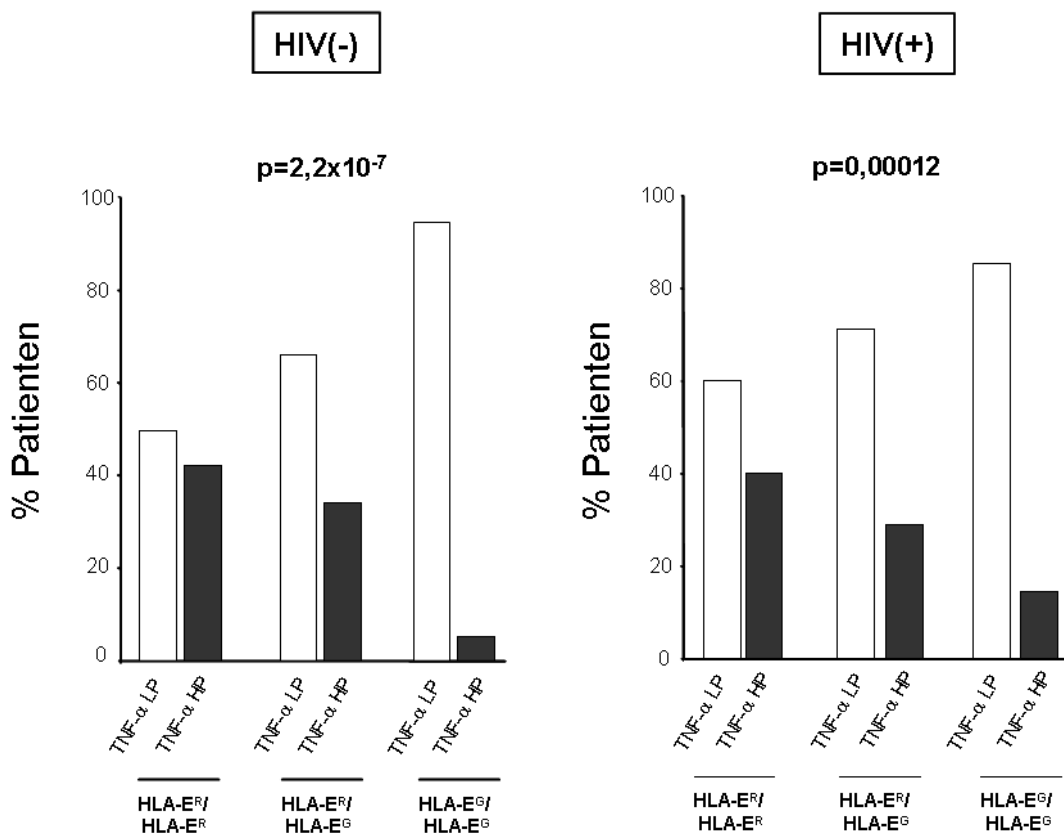


Abb. 33: Verteilung von TNF- α Genotypen bei gesunden Kontrollen und HIV(+)-Patienten mit verschiedenen HLA-E Genotypen. Das Signifikanzniveau wurde mittels Armitage's trend test [<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>] errechnet.

3.6 Assoziation anderer Gene des MHC- Komplexes mit HLA-E

Aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts (*linkage disequilibrium*) der Gene des gesamten MHC-Komplexes ist es möglich, dass andere Gene bei der HLA-E vermittelten Protektion gegen HIV-1 eine Rolle spielen. Um dies zu untersuchen, wurden abschließend verschiedene HLA-Allele der Patientenkohorte bestimmt. In Tabelle 5 sind die Allelfrequenzen für verschiedene HLA-B Allele in Abhängigkeit der HLA-E Genotypen dargestellt. Es lies sich keine Assoziation zwischen HLA-E Genotyp und dem Auftreten bekannter, protektiver HLA-Allele, wie HLA-B*27 (Allelfrequenzen HLA-E^G/HLA-E^G: 6,1 %, HLA-E^R/HLA-E^R: 3,1 % und HLA-E^R/HLA-E^G: 4,1 %) und HLA-B*57 (Allelfrequenzen: HLA-E^G/HLA-E^G: 0 %, HLA-E^R/HLA-E^R: 0,4 % und HLA-E^R/HLA-E^G: 0,3 %) nachweisen.

Tabelle 5: Allelfrequenzen der untersuchten HLA-B Allele in Abhängigkeit verschiedener HLA-E Genotypen.

HLA-B		HLA-E Genotyp					
		HLA-E ^R /HLA-E ^R		HLA-E ^R /HLA-E ^G		HLA-E ^G /HLA-E ^G	
		n	Allelfrequenz	n	Allelfrequenz	n	Allelfrequenz
*07	82	18,4%	200	27,5%	96	29,3%	
*08	104	23,3%	108	14,9%	10	3,0%	
*13	26	5,8%	38	5,2%	8	2,4%	
*14	16	3,6%	32	4,4%	8	2,4%	
*15	26	5,8%	78	10,7%	52	15,9%	
*18	26	5,8%	40	5,5%	32	9,8%	
*27	14	3,1%	30	4,1%	20	6,1%	
*35	44	9,9%	76	10,5%	38	11,6%	
*37	8	1,8%	4	0,6%	0	0,0%	
*38	10	2,2%	18	2,5%	2	0,6%	
*39	10	2,2%	8	1,1%	6	1,8%	
*40	20	4,5%	22	3,0%	26	7,9%	
*41	0	0,0%	2	0,3%	6	1,8%	
*42	4	0,9%	0	0,0%	0	0,0%	
*44	38	8,5%	42	5,8%	8	2,4%	
*45	0	0,0%	0	0,0%	2	0,6%	
*46	0	0,0%	0	0,0%	2	0,6%	
*49	0	0,0%	2	0,3%	2	0,6%	
*50	2	0,4%	0	0,0%	2	0,6%	
*51	10	2,2%	18	2,5%	8	2,4%	
*53	0	0,0%	4	0,6%	0	0,0%	
*55	2	0,4%	0	0,0%	0	0,0%	
*56	0	0,0%	2	0,3%	0	0,0%	
*57	2	0,4%	2	0,3%	0	0,0%	
*81	2	0,4%	0	0,0%	0	0,0%	

Tabelle 6: Kreuztabelle zur Assoziation von HLA-E Genotyp mit der CCR5Δ32 Mutation.

		HLA-E			Gesamt
		HLA-E ^R /HLA-E ^R	HLA-E ^R /HLA-E ^G	HLA-E ^G /HLA-E ^G	
CCR5	CCR5/CCR5	89	131	56	276
	CCR5/CCR5Δ32	21	37	17	75
	CCR5Δ32/CCR5Δ32	1	2	2	5
Gesamt		111	170	75	356

Weiterhin konnte bei 356 Patienten der Kohorte eine CCR5 Genotypisierung durchgeführt werden. In Tabelle 6 ist dargestellt, dass ebenfalls keine Assoziation des HLA-E Genotyps mit der CCR5Δ32 Mutation nachgewiesen werden konnte.

V DISKUSSION

HLA-E spielt eine bedeutende immunmodulatorische Rolle bei der Regulation der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität und der zytotoxischen CD8(+) T-Zellantwort. Im Gegensatz zu klassischen MHC-I Molekülen ist HLA-E wenig polymorph und für das HLA-E Gen wurden bislang nur zwei HLA-E Allele, das HLA-E^G und das HLA-E^R Allel, beschrieben. In vorangegangenen Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass HLA-E bei der HCV- und der HIV-Infektion verstärkt exprimiert wird, und über die Interaktion mit NKG2A-Rezeptoren die Hemmung der zytotoxischen Aktivität NKG2A-positiver NK-Zellen vermittelt wird. Als möglichen zugrunde liegenden Mechanismus wiesen wir nach, dass das Hepatitis C Virus (HCV p18₃₅₋₄₄) und auch das HI-Virus (HIV p24₁₄₋₂₂) für ein Peptid kodieren, welches an HLA-E binden und dadurch dessen Expression auf der Zelloberfläche stabilisieren kann [44, 45]. Unklar war jedoch, welche weiteren regulatorischen und zytolytischen Immunfunktionen durch HLA-E/ Peptid-Komplexe im Rahmen der HCV- und HIV-Infektion beeinflusst werden, denn beide Viren sind in der Lage, eine chronische Infektion zu etablieren.

Ziel dieser Dissertation war es daher, die Rolle von HLA-E als Regulator der Immunantwort bei der Hepatitis-C- und der HIV-Infektion näher zu charakterisieren.

1. Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HCV-Infektion

1.1 HLA-E restringierte Erkennung des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids durch CD8(+) T-Zellen

Neben der Interaktion mit NKG2-Rezeptoren können Peptid-beladene HLA-E Moleküle auch durch den T-Zellrezeptor (TCR) von CD8(+) T-Zellen erkannt werden [59, 60]. So konnten Pietra et al. zeigen, dass ein Peptid des Zytomegalie-Virus, das über HLA-E präsentiert wurde, durch CD8(+) T-Zellen erkannt wird und dass diese Erkennung zur anschließenden Lyse der HLA-E(+)

Zielzelle führt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch bei der HCV-Infektion CD8(+) T-Lymphozyten ein HCV-Peptid (HCV p18₃₅₋₄₄) im Kontext von HLA-E erkennen können. Die Spezifität dieses Ergebnisses wird durch die Beobachtung, dass bei gesunden Probanden keine HLA-E restringierten CD8(+) T-Zellen nachgewiesen werden konnten, nachgewiesen.

HCV-spezifische HLA-E restringierte T-Zellen konnten nur bei 40 % der untersuchten HCV(+) Patienten nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse von HCV-Isolaten aus Seren von Patienten mit und ohne HLA-E restringierter T-Zellantwort zeigte, dass in Übereinstimmung mit vorangehenden Arbeiten und der Recherche in der Los Alamos HCV-Datenbank, die Aminosäuresequenz des HCV p18₃₅₋₄₄ Peptids hoch konserviert ist. Somit kann man vermuten, dass die HLA-E restringierte Erkennung des Peptids HCV p18₃₅₋₄₄ bei den meisten HCV-Isolaten möglich sein sollte und keine Mutationen im Peptidepitop für die differentielle Erkennung durch CD8(+) T-Zellen verantwortlich sind. Die anschließende immungenetische Analyse der in diese Studie eingeschlossenen Patienten ergab, dass die Träger des HLA-E^R/HLA-E^R Genotyps eine höhere Frequenz an HCV p18₃₅₋₄₄-spezifischen, HLA-E restringierten T-Zellantworten aufwiesen als die Träger eines anderen HLA-E Genotyps.

Eine mögliche funktionelle Relevanz dieser T-Zellen konnte durch zwei indirekte Hinweise belegt werden. Als Erstes wiesen Patienten mit HLA-E restringierten IFN- γ CD8(+) T-Zellantworten eine signifikant niedrigere HCV-Viruslast auf, als Patienten die eine solche Antwort nicht zeigten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vorangehenden Arbeiten, die demonstrierten, dass die HCV-spezifische IFN- γ Sekretion durch klassische T-Zellen mit einer Ausheilung der HCV-Infektion assoziiert ist [133]. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen von Grüner et al. [134]. Virus-spezifische CD8(+) T-Zellen können eine Virusinfektion über zytolytische und nicht-zytolytische Mechanismen kontrollieren. Die Sekretion von IFN- γ durch CD8(+) T-Zellen ist ein nicht-zytolytischer Wirkmechanismus, da eine Verringerung der Viruslast ohne eine wesentliche Leberzellschädigung erfolgt. Das Zytokin IFN- γ kann unter anderem über antivirale Effekte direkt die Virusreplikation infizierter Zellen hemmen [111, 135]. So konnten Frese et al. zeigen, dass durch IFN- γ die

Amplifikation eines HCV-Replikons in Huh-7 Zellen gehemmt wird [136]. Des Weiteren führt IFN- γ zu einer verstärkten Expression von MHC-I Molekülen auf infizierten Zellen, so dass die Wahrscheinlichkeit gesteigert wird, dass CD8(+) T-Zellen infizierte Zellen erkennen können. Ebenfalls werden durch IFN- γ die Effektorfunktionen von CD8(+) T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen gesteigert [28].

Der zweite indirekte Hinweis auf die funktionelle Bedeutung HLA-E restringierter T-Zellen ist, dass die HLA-E restringierte IFN- γ Sekretion mit signifikant erhöhten Serumspiegeln der Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) assoziiert war. Diese Ergebnisse weisen auf einen zytolytischen Wirkmechanismus der CD8(+) T-Zellpopulation hin. Dabei tritt eine fortschreitende Schädigung der Leberzellen durch Zellen des Immunsystems auf, da infizierte Hepatozyten durch CD8(+) T-Zellen über verschiedene Mechanismen lysiert werden.

Es ist bekannt, dass der Verlauf der akuten HCV-Infektion wesentlich von der viruspezifischen Immunantwort beeinflusst wird, und die Elimination des HCV-Virus ist mit einer starken, multispezifischen und andauernden CD8(+) T-Zellantwort in der Leber assoziiert [64, 134]. Anhand von Leberbiopsien HCV-infizierter Schimpansen konnten Thimme et al. zeigen, dass die intrahepatische viruspezifische T-Zellantwort mit der Entwicklung einer Hepatitis und der Viruselimination korreliert [135]. Ebenfalls zeigte diese Arbeitsgruppe, dass Virus-spezifische T-Zellen nur in sehr geringer Frequenz im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten, wohingegen in der Leber, dem Ort der hauptsächlichen Virusreplikation, eine Akkumulation dieser Zellen erfolgt. Auch andere Arbeiten bei chronisch infizierten HCV-Patienten zeigten, dass HLA-A2 restringierte Virus-spezifische T-Zellen mit einer deutlich höheren Frequenz in der Leber als im peripheren Blut vorhanden sind [137, 138]. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen HCV-spezifischen HLA-E restringierten T-Zellen scheinen ebenfalls nur niedrigfrequent im Blut HCV-infizierter Patienten vorhanden zu sein. In diesem Zusammenhang wäre die nähere Charakterisierung intrahepatischer T-Zellen von großer Bedeutung für diese Arbeit gewesen, dies war leider nicht möglich, da aus ethischen Gründen keine ausreichenden Gewebeproben bei HCV-infizierten Patienten gewonnen werden können. Da

das HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid ein gut charakterisiertes HLA-A2 restringiertes T-Zellepitop darstellt [50, 68, 139, 140], wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die HLA-A2 restringierte Erkennung des HCV-Peptids untersucht. Im Gegensatz zu HLA-E restringierten T-Zellantworten konnte jedoch ein Einfluss dieser HLA-A2 restringierten T-Zellen nicht nachgewiesen werden. Denn eine Assoziation zwischen HLA-A2 restringierter Erkennung des Peptids und klinischen Parametern wie HCV-Viruslast oder Serumkonzentration der Leberenzyme war nicht zu erkennen.

1.2 Immungenetische Analyse der HCV(+) Patienten

Im Gegensatz zu klassischen MHC-I Molekülen ist das nicht-klassische MHC-I Molekül HLA-E nur wenig polymorph. Bislang konnten zwei HLA-E Allele beschrieben werden, das HLA-E^R (HLA-E*0101) und das HLA-E^G (HLA-E*0103) Allel [51].

Wie oben angeführt, konnte bei Trägern des HLA-E^R/HLA-E^R Genotyps eine höhere Frequenz HCV p18₃₅₋₄₄-spezifischer, HLA-E restringierter T-Zellantworten nachgewiesen werden. Daher untersuchten wir anschließend die Verteilung der HLA-E Allele in einer größeren Kohorte HCV-infizierter Patienten. In diese wurden insgesamt 201 Patienten mit chronischer HCV-Infektion und 140 gesunde Kontrollen eingeschlossen. Durch diese Untersuchung konnte in der vorliegenden Dissertation erstmals eine unterschiedliche Verteilung der HLA-E Varianten HLA-E^G und HLA-E^R bei HCV-infizierten Patienten nachgewiesen werden. Dagegen zeigten vorangehende Populationsstudien bei gesunden Patientenkollektiven bislang eine gleichmäßige Verteilung der Frequenz beider HLA-E Allele [141]. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion mit den Genotypen 2 oder 3 signifikant weniger oft den HLA-E^R/HLA-E^R Genotyp aufwiesen, als dies bei Patienten mit chronischer HCV Genotyp 1 oder 4 Infektion oder in der gesunden Kontrollgruppe der Fall war. Die genauere Betrachtung von Patienten mit chronischer HCV-Infektion und Patienten mit spontan eliminiertes HCV-Infektion zeigte, dass eine signifikant unterschiedliche Verteilung der HLA-E Genotypen zwischen diesen Patientengruppen vorlag. Dabei wiesen Patienten, die das Virus spontan eliminierten, signifikant häufiger den HLA-E^R/HLA-E^R Genotyp auf, als Patienten

mit einer chronischen HCV-Infektion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der HLA-E Genotyp den Verlauf der HCV-Infektion beeinflussen kann.

Nach einer akuten Infektion mit dem Hepatitis C-Virus kann bei 20 - 50 % der Patienten eine spontane Ausheilung der Virusinfektion beobachtet werden, während sich bei 50 - 80 % der Patienten eine chronische Infektion mit HCV entwickelt. Die zugrunde liegenden Mechanismen, die zur viralen Elimination oder Persistenz beitragen, sind bislang nur unzureichend geklärt. Wie bereits erwähnt, spielt die Immunantwort, insbesondere die T-Zellantwort, für den Verlauf der HCV-Infektion eine wichtige Rolle [142, 143]. Darüber hinaus scheinen virale Faktoren, wie z.B. der HCV-Genotyp und auch genetische Wirtsfaktoren eine große Bedeutung bei der Frage zu spielen, ob eine akute Hepatitis C spontan ausheilt oder chronisch verläuft. So wurde beispielsweise demonstriert, dass der HLA-Hintergrund eines Individuums einen wichtigen Einfluss auf die HCV-spezifische Immunantwort und den Ausgang der Infektion hat. Bei irischen Frauen, die im Rahmen einer Anti-D Prophylaxe mit einem einheitlichen HCV-Inokulum infiziert wurden, konnten McKiernan et al. zeigen, dass die HLA-Allele HLA-A3, -B27 und -Cw01 signifikant mit einer spontanen Viruselimination assoziiert sind, wobei das HLA-B27 Allel den stärksten Effekt mit einer spontanen Ausheilungsrate von 80 % aufwies [38]. Ein weiterer wichtiger Wirtsfaktor, der in diesem Zusammenhang erst kürzlich beschrieben wurde, scheint ein Polymorphismus zu sein, der nahe des Interleukin 28B-Gens lokalisiert ist. Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass dieser mit dem Ansprechen auf eine HCV-Therapie und mit der spontanen Ausheilung der HCV Infektion assoziiert ist [144-147]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals über eine mögliche Rolle von HLA-E Allelen bei der HCV-Infektion berichtet. Hier zeigte sich, dass Patienten, die eine spontane Viruselimination aufweisen, signifikant häufiger den HLA-E^R/HLA-E^R Genotyp trugen. Wie bereits beschrieben, ist bislang nur wenig über die Rolle der nicht-klassischen HLA-E Allele bei der HCV-Infektion bekannt. Verschiedene Arbeiten konnten jedoch einen Zusammenhang des HLA-E Polymorphismus mit anderen Erkrankungen demonstrieren. So zeigten Lajoie et al., dass das HLA-E^G Allel mit einem vierfach verringerten Risiko, an HIV zu erkranken, assoziiert war [52]. Des Weiteren konnten Arbeiten unter anderem einen Zusammenhang zwischen

dem HLA-E Polymorphismus und einer schwerer verlaufenden bakteriellen Infektion nach Knochenmarkstransplantation [148], dem Kawasaki-Syndrom [149] oder dem Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion nach Knochenmarkstransplantation [150] (Risikoallel = HLA-E^R) nachweisen. Eine mögliche Erklärung für den protektiven Effekt des homozygoten HLA-E^R Genotyps bei der HCV-Infektion könnte die hier nachgewiesene höhere Frequenz HLA-E restringierter T-Zellantworten bei diesen Patienten darstellen. Zwei Ursachen können als möglicher Mechanismus in Betracht gezogen werden. Zunächst könnte die Interaktion von HLA-E Molekülen mit CD94 / NKG2 Rezeptoren eine Rolle spielen. Denn diese haben eine wichtige Bedeutung für die Regulation der zellulären Immunität [81, 82, 151]. Vorangehende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, 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 das HCV-Peptid HCV p18₃₅₋₄₄, welches an HLA-E binden und so die Oberflächenexpression von HLA-E stabilisieren kann [44]. Weiterhin konnte eine Heraufregulation des inhibitorischen NKG2A-Rezeptors auf CD8(+) T-Zellen und NK-Zellen von HCV(+) Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch funktionell gezeigt, dass die verstärkte Interaktion von HLA-E mit CD94 / NKG2A Rezeptoren zu einer Hemmung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen führte. Dies stellt einen möglichen Mechanismus dar, der die Chronifizierung der HCV-Infektion fördert. In der vorliegenden Arbeit konnte nun als neuer Befund gezeigt werden, dass das HLA-E^R Molekül im Vergleich zum HLA-E^G Molekül eine deutlich geringere Oberflächenexpression aufweist. Dies steht im Einklang mit früheren Arbeiten, die diese Beobachtung unabhängig vom gebundenen Peptid ebenfalls beschrieben [51, 152]. Aufgrund der differentiellen Oberflächenexpression der HLA-E Allele ist es möglich, dass die HLA-E vermittelte Inhibierung von NKG2A(+) NK- und CD8(+) T-Zellen weniger stark bei Trägern des homozygoten HLA-E^R Genotyps ausfällt, als dies bei Trägern des HLA-E^G Allels der Fall ist. Dies würde die höhere Frequenz HLA-E restringierter T-Zellantworten bei Patienten mit homozygotem HLA-E^R Genotyp erklären.

Eine weitere Möglichkeit, die Beobachtungen dieser Doktorarbeit zu erklären, könnte der Unterschied in der Molekülstruktur der HLA-E Allele sein. Die zwei beschriebenen Allele des HLA-E Gens unterscheiden sich an Position 107 des Polyproteins durch eine Aminosäuresubstitution von Arginin (HLA-E^R, bzw. HLA-E*0101) zu Glyzin (HLA-E^G, bzw. HLA-E*0103) [51, 153, 154]. Strong et al. konnten zeigen, dass sich die beiden beschriebenen Allelvarianten nicht nur hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression unterscheiden, sondern es konnte auch andererseits durch die Analyse der Kristallstruktur von Peptid / HLA-E-Komplexen gezeigt werden, dass die $\alpha 1\alpha 2$ -Peptidbindungsgrube der Moleküle größtenteils identisch ist und die Interaktion mit CD94 / NKG2-Rezeptoren und dem T-Zellrezeptor scheinbar nicht beeinflusst wird [51, 155]. Aber ein weiterer, wichtiger Unterschied zwischen den beiden HLA-E Molekülen ist die Peptid-Bindungsaffinität und ihre thermale Stabilität. HLA-E Moleküle binden nonamere Peptide, die sich von der Signal-Sequenz klassischer MHC-I Moleküle ableiten. Diese stellen die natürlichen Liganden für HLA-E dar, die für die Oberflächenexpression der HLA-E Moleküle von essentieller Bedeutung sind. Es zeigte sich, dass die Bindungsaffinität des HLA-E^G Moleküls für diese Liganden wesentlich höher ist, als dies beim HLA-E^R Molekül der Fall ist. Dadurch weisen HLA-E^G / Ligand Komplexe eine höhere Thermostabilität als Komplexe mit HLA-E^R Molekülen auf [51]. Aufgrund dieser Eigenschaft von HLA-E^G Molekülen ist es möglich, dass das HCV p18₃₅₋₄₄ Peptid leichter gebundene Peptide aus der Bindungsgrube von HLA-E^R Molekülen verdrängen und ersetzen kann, als dies bei HLA-E^G / Peptid Komplexen möglich ist. Diese Unterschiede in der Peptidaffinität könnten eine weitere mögliche Erklärung für die Beobachtung sein, dass die Frequenz HLA-E restringierter T-Zellantworten bei Patienten mit homozygotem HLA-E^R Genotyp signifikant erhöht war. Weiterhin konnte durch die Aufteilung der HCV(+) Patientenkohorte in Patienten, die mit den HCV-Genotypen 1 oder 4 infiziert waren, und solchen Patienten, die mit den HCV-Genotypen 2 oder 3 infiziert waren, gezeigt werden, dass sich die Verteilung der HLA-E Genotypen signifikant zwischen diesen beiden Gruppen HCV-infizierter Patienten unterschied. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, worauf die unterschiedlichen Effekte der HLA-E Genotypen, insbesondere bei Patienten, die mit den HCV-

Genotypen 2 oder 3 infiziert sind, zurückzuführen sind. Jedoch steht diese Beobachtung im Einklang mit den Ergebnissen von Bortolotti et al. und Lehmann et al., die zeigten, dass Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 3 infiziert sind, öfter eine spontane Viruselimination aufweisen als Patienten, die mit HCV-Genotyp 1 infiziert sind [156, 157]. Ebenso zeigen Patienten mit HCV-Genotyp 2 und 3 Infektionen ein besseres Therapieansprechen als Patienten, die mit den HCV-Genotypen 1 oder 4 infiziert sind. So kann bei Patienten mit Genotyp 2 oder 3 Infektion ein dauerhafter Therapieerfolg von über 80 % erreicht werden, wohingegen bei Patienten, die mit den HCV-Genotypen 1 oder 4 infiziert sind, mit den heutigen Therapieansätzen ein dauerhaftes virologisches Ansprechen (*Sustained Virological Response*, SVR) von nur 50 % erzielt wird. Wichtig ist, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich demographischer Variablen, Infektionsweg, Leberenzyme, HCV-Genotypen und HCV-Viruslast zwischen den HCV(+) Patienten mit unterschiedlichem HLA-E Genotyp gefunden wurden. Somit konnten Unterschiede in der Zusammensetzung der Studiengruppen als Ursache für die Verteilung der HLA-E Genotypen weitgehend ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten lassen vielmehr darauf schließen, dass Infektionen mit HCV-Genotyp 2 oder 3 besser durch die anti-virale Immunantwort beeinflusst werden, als dies bei HCV-Genotyp 1 oder 4 der Fall ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Immunantwort bei der HCV-Infektion sehr komplex ist und von einer Vielzahl von Komponenten beeinflusst wird. Dies können zelluläre und lösliche Komponenten des angeborenen Immunsystems, aber auch humorale und zelluläre Komponenten der adaptiven Immunantwort sein. Ebenso haben genetische und virale Faktoren einen Einfluss auf den Verlauf der HCV-Infektion. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der homozygote HLA-E^R Genotyp vermutlich mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber der HCV-Infektion oder einer spontanen Ausheilung der HCV assoziiert ist und dass dieser Effekt möglicherweise durch die höhere Frequenz HLA-E restringierter T-Zellantworten bei diesen Individuen erklärt werden kann.

2. Untersuchungen zur Rolle von HLA-E bei der HIV-Infektion

2.1 Assoziation von HLA-E Genotyp und sexueller Transmission von HIV-1

Eine sexuelle Transmission stellt weltweit den Hauptübertragungsweg des HI-Virus dar [24]. Allerdings sind die viralen Faktoren, wie auch die Wirtsfaktoren, die eine Transmission des HI-Virus und die Empfänglichkeit des Empfängers beeinflussen, nur teilweise verstanden. In diesem Zusammenhang wurde in einer afrikanischen Kohorte gezeigt, dass nach sexueller Exposition das HLA-E^G Allel (HLA-E*0103) mit einem vierfach verringerten Risiko einer HIV-1 Infektion assoziiert ist [52]. Die zugrunde liegenden Mechanismen für diese Assoziation konnten jedoch bislang nicht aufgeklärt werden. Da HLA-E eine wichtige Rolle in der Regulation von NK- und T-Zellen spielt, spekulierten die Autoren, dass der HLA-E Polymorphismus die anti-virale Aktivität immunkompetenter Zellen beeinflussen könnte. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher der Fragestellung nachgegangen, über welche Mechanismen diese Assoziation vermittelt wird.

Da HLA-E ein wichtiger Modulator der Immunantwort darstellt [158], wurde untersucht, ob eine unterschiedliche Regulation von CD8(+) T-Zellen und / oder NK-Zellen durch die beiden Allelvarianten HLA-E^G und HLA-E^R für die beobachtete Assoziation von HLA-E Genotyp und sexueller Transmission von HIV verantwortlich ist. Zunächst wurde daher geprüft, ob HLA-E restringierte T-Zellen bei HIV-infizierten Patienten existieren und ob diese Antwort gegebenenfalls durch die beiden HLA-E Moleküle unterschiedlich beeinflusst wird. Interessanterweise konnten bei 38 % der untersuchten HIV(+) Patienten erstmals HIV-spezifische, HLA-E restringierte CD8(+) T-Zellen mittels ELISpot nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da das HI-Virus über das nef Protein in der Lage ist, die Expression klassischer MHC-I Moleküle herabzusetzen, um der Immunantwort durch CD8(+) T-Zellen zu entgehen [159, 160]. HIV-spezifische CD8(+) T-Zellen haben auf der anderen Seite eine wesentliche Bedeutung für den Verlauf der HIV-Infektion. Dies wurde schon in frühen Arbeiten belegt, die zeigten, dass der initiale Abfall der Virämie mit dem Auftreten virus-spezifischer CD8(+) T-Zellen korreliert [161, 162]. Des

Weiteren konnten durch die Untersuchung von so genannten Langzeitüberlebenden (*Long term nonresponder*, LTNR) wichtige Erkenntnisse über die Bedeutung der CD8(+) T-Zellen gewonnen werden. So findet sich bei LTNR im Vergleich zu Patienten mit raschen Krankheitsverlauf eine hohe Zahl HIV-spezifischer Vorläufer-CD8(+) T-Zellen mit breiter Spezifität gegen verschiedenste Virusproteine [63]; und ein Abfall der effektiven CD8(+) T-Zellzahlen geht mit einer stärkeren Krankheitsprogression einher [163]. Entgegen dieser beschriebenen Daten für klassische CD8(+) T-Zellen konnte für die HIV-spezifischen HLA-E restringierten T-Zellen keine Assoziation mit klinischen Parametern der HIV-Infektion, wie Viruslast oder CD4(+) T-Zellzahl, nachgewiesen werden. Weiterhin konnte weder ein Unterschied bezüglich der T-Zellantworten zwischen Patienten mit den unterschiedlichen HLA-E Genotypen nachgewiesen werden, noch zeigte sich ein Unterschied in der T-Zellantwort, wenn das HIV-Peptid über das HLA-E^G oder das HLA-E^R Molekül präsentiert wurde. Obwohl in dieser Arbeit erstmals eine HLA-E restringierte Erkennung eines HIV-Peptids beschrieben wird, lassen die bisher vorliegenden Daten nicht darauf schließen, dass HLA-E restringierte T-Zellen eine funktionelle Bedeutung bei der sexuellen Transmission spielen, da weder eine Assoziation mit klinischen Parametern der HIV-Infektion, noch eine differentielle T-Zellantwort nach Präsentation des HIV-Peptids durch die HLA-E Moleküle nachgewiesen werden konnte.

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort. Ihre Aktivität wird durch eine Vielzahl von aktivierenden und hemmenden Rezeptoren bestimmt. Jedoch sind CD94 / NKG2A und CD94 / NKG2C die einzigen bekannten Rezeptoren, die mit HLA-E interagieren [40, 42]. Aufgrund der schon beschriebenen Allel-spezifischen Eigenschaften der beiden HLA-E Moleküle, wie z.B. eine unterschiedliche Oberflächenexpression, ist es vorstellbar, dass derartige Unterschiede die NK-Zellantwort unterschiedlich modulieren können. Die Untersuchung der NK-Zellantwort von HIV(-) Patienten zeigte jedoch, dass sich die zytotoxische Aktivität (gemessen an der CD107a Expression) und auch die Aktivierung (gemessen an der CD69 Expression) von NK-Zellen, die mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E^G- oder HLA-E^R-Molekülen koinkubiert wurden, nicht unterschied. Dieses Ergebnis ist schwierig zu

verstehen, da CD94 / NKG2-Rezeptoren in der Regulation der NK-Zellantwort eine bedeutende Rolle spielen. Jedoch wird die Aktivierung von NKG2-Rezeptoren wesentlich von der Sequenz des an HLA-E gebundenen Peptids beeinflusst [164-166]. Andererseits fanden Maier et al. Hinweise, dass eine unterschiedliche HLA-E Oberflächenexpression zu keinen Unterschieden in der Fähigkeit führt, die NK-Zell vermittelten Zellyse zu inhibieren [130].

Reynolds et al. beschreiben anhand eines Primatenmodells zur sexuellen Transmission des Simian Immundefizienz-Virus (SIV) die mukosale zelluläre Immunantwort als „zu spät und zu schwach“ [167]. Sie zeigten, dass eine systemische Infektion mit SIV erfolgt, noch bevor sich eine signifikante Virus-spezifische CD8(+) T-Zellantwort gegen verschiedene immunodominante SIV-Epitope entwickelt. Somit erfolgt die Immunantwort zeitlich „zu spät“, um das Virus lokal zu eliminieren und die systemische Virusausbreitung zu verhindern und „zu schwach“, da nicht verhindert werden kann, dass eine Depletion der CD4(+) T-Zellen erfolgt. Auch die hier erbrachten Ergebnisse weisen nicht darauf hin, dass eine Assoziation zwischen HLA-E Genotyp und der Funktion von NK- oder CD8(+) T-Lymphozyten vorliegt, die mit dem protektiven Effekt des homozygoten HLA-E^G Genotyps in Zusammenhang stehen könnte.

Langerhans Zellen (LCs) stellen eine Subpopulation dendritischer Zellen dar, die in der Epidermis mukosaler Epithelien wie der Ektozervix, Vagina oder der Vorhaut residieren [103]. Aufgrund ihrer Lokalisation nimmt man an, dass LCs die ersten Zellen sind, die bei der sexuellen Transmission in Kontakt mit dem HI-Virus treten. In der Literatur wird jedoch kontrovers diskutiert, ob LC tatsächlich eine Rolle bei der Etablierung einer systemischen HIV-Infektion spielen [105, 168, 169]. De Witte et al. konnten erstmals zeigen, dass LCs nicht effizient mit HIV-1 infiziert werden. Anders als ursprünglich vermutet, verhindert Langerin die Transmission von HIV-1, indem Langerin mit HIV-1-Virionen interagiert und diese dann in so genannte Birbeck Granula internalisiert, so dass diese dann degradiert werden [105]. Eine neuere Studie wies interessanterweise nach, dass die „Barrierefunktion“ der LC durch die Aktivierung über TNF- α herabgesetzt wird, so dass die HIV-Transmission erleichtert wird [101]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass TNF- α die Replikation von HIV-1 in T-Zellen und Makrophagen steigert [170]. Das TNF- α Gen ist auf

Chromosom 6 inmitten des MHC-Komplexes lokalisiert und liegt in direkter Nähe zum HLA-E Gen. Analog zu anderen Genen, die für Zytokine kodieren, ist das TNF- α Gen ebenfalls polymorph. Der -308 Polymorphismus [171] beruht auf einem Nukleotidaustausch von Guanin (G) zu Adenin (A) im Bereich des Promotors des TNF- α Gens. Dieser Polymorphismus wurde schon mehrfach mit einer unterschiedlichen transkriptionalen Aktivität [117, 118] und mit einer erhöhten TNF- α Produktion des -308 TNF A Allels in Verbindung gebracht [115, 119]. Man kann daher Probanden in so genannte TNF- α *high*-Produzenten (Probanden mit TNF- α A/A und TNF- α G/A Genotyp) und TNF- α *low*-Produzenten (Probanden mit TNF- α G/G Genotyp) klassifizieren. Die Bestimmung des TNF- α Genotyps in der untersuchten Patientenkohorte zeigte, dass eine signifikante Kopplung zwischen HLA-E Genotyp und TNF- α -308 Polymorphismus vorliegt. Dabei wiesen Individuen, die homozygot das HLA-E^G Allel trugen, häufiger den TNF- α *low* (TNF- α G/G) Genotyp auf als Patienten mit einer der beiden anderen HLA-E Genotyp Kombinationen. Dies konnte für HIV(-) Individuen, als auch für HIV(+) Patienten nachgewiesen werden. Die Assoziation von HLA-E und TNF- α Genotyp kann durch das starke Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*), das die Gene des MHC-Komplexes umfasst, erklärt werden. Dadurch segregieren die Gene des MHC-Komplexes nicht einzeln, sondern werden en Block als so genannter Haplotyp vererbt.

In Übereinstimmung mit den oben genannten genetischen Daten zeigte sich, dass bei Individuen mit homozygotem HLA-E^G Genotyp eine signifikant geringere Frequenz TNF- α positiver Monozyten im peripheren Blut vorhanden ist, als dies bei Individuen mit anderen HLA-E Genotypen der Fall ist. Auch zeigten Monozyten von Individuen mit HLA-E^G/HLA-E^G Genotyp nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) eine deutlich geringere TNF- α Antwort im Vergleich zu Individuen mit anderen HLA-E Genotypen. Die hier erbrachten Daten lassen also darauf schließen, dass eine verminderte Produktion von TNF- α bei Individuen mit dem HLA-E^G/HLA-E^G Genotyp für die geringere Empfänglichkeit gegenüber einer HIV-Infektion verantwortlich ist. Aufgrund des schon beschriebenen Kopplungsungleichgewichts der Gene im MHC-Lokus kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass auch andere

Gene in dieser Region bei der HLA-E vermittelten Protektion gegen HIV-1 eine Rolle spielen. Daher wurde in einer erweiterten Analyse untersucht, ob eine Assoziation des HLA-E Genotyps mit einzelnen HLA-Allelen im hochpolymorphen HLA-B Locus besteht, da der Verlauf der HIV-Infektion durch verschiedene HLA-B Allele stark beeinflusst wird [37, 172-174]. Es konnte jedoch keine Assoziation zwischen HLA-E Genotyp und einem gehäuften Auftreten von HLA-B*27 oder HLA-B*57 nachgewiesen werden. Ein weiterer genetischer Wirtsfaktor, der Schutz gegen die HIV-Infektion vermittelt und den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann, ist die $\Delta 32$ Mutation des CCR5 Gens, das auf Chromosom 3 kodiert wird [175-177]. Die Analyse der hier untersuchten Patientenkohorte schloss jedoch ebenfalls eine Assoziation des HLA-E Genotyps mit dieser Mutation aus.

Zusammenfassend weisen die hier erbrachten Daten darauf hin, dass der funktionell relevante TNF- α -308 Polymorphismus zumindest teilweise für die von Lajoie et al. beschriebene Assoziation zwischen HLA-E Genotyp und der Empfänglichkeit des Wirtsorganismus, an einer sexuell übertragenen HIV-1 Infektion zu erkranken, verantwortlich ist.

2.2 Untersuchungen zum Crosstalk zwischen NK-Zellen und DC

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass die HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelte Stabilisierung von HLA-E über die Interaktion mit CD94 / NKG2A zur direkten Hemmung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen führt. Unklar war jedoch, welchen Einfluss die HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelte Stabilisierung von HLA-E auf die immunmodulatorische Funktion der NK-Zellen und insbesondere auf den Crosstalk zwischen NK-Zellen und Dendritischen Zellen hat.

Wie bereits erwähnt, führt eine länger bestehende HIV-Infektion zu einer verminderten Expression des hemmenden NK-Zell-Rezeptors NKG2A auf den NK-Zellen [34, 178]. In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit diesen Daten nachgewiesen werden, dass NKG2A auf NK-Zellen chronisch HIV-infizierter Patienten signifikant geringer exprimiert wird, als dies bei gesunden Probanden der Fall ist. Dendritische Zellen (DC) finden sich in peripheren Geweben als unreife DC und üben dort eine so genannte Wächterfunktion aus, indem sie durch hohe endozytotische Aktivität ihre

Umgebung kontinuierlich auf Pathogene untersuchen. Die Aufnahme von Antigen induziert eine Aktivierung und die anschließende Reifung der DC. Dieser Prozess ist mit zahlreichen Veränderungen des Phänotyps verbunden und führt dazu, dass reife DC als äußerst effektive Antigen-präsentierende Zellen in die T-Zellregionen der sekundären Lymphorgane einwandern, um dort aufgenommene Antigene an T-Zellen zu präsentieren. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass DC und NK-Zellen interagieren und dass diese Interaktion die Ausreifung von DC und die Funktion von NK-Zellen beeinflusst [90, 179-181]. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war auch gezeigt worden, dass Lymphozyten von HIV(+) Patienten eine erhöhte Oberflächenexpression des HLA-E Moleküls aufweisen. In Übereinstimmung mit diesen Daten führte die *in vitro* Infektion von Lymphozyten mit HIV-1 ebenfalls zur Heraufregulation der HLA-E Oberflächenexpression und über die Interaktion mit CD94 / NKG2A zur direkten Hemmung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde anschließend der HLA-E Ligand HIV p24₁₄₋₂₂ identifiziert. In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob die HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelte Stabilisierung des HLA-E Moleküls über Interaktion mit CD94 / NKG2A Rezeptoren die Sekretion löslicher Mediatoren durch NK-Zellen verändert und ob dadurch die Ausreifung von Dendritischen Zellen beeinflusst wird. Es zeigte sich, dass MODC, die mit NK-Zellüberständen aus der Kokultur mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E-K562 Zellen stimuliert wurden, signifikant weniger MHC-I, HLA-DR und CD40 exprimierten als MODC, die mit Überständen aus der Kokultur von NK-Zellen mit unbeladenen HLA-E-K562 Zellen stimuliert worden waren. Diese Beobachtung konnte jedoch ausschließlich bei NK-Zellen von HIV(-) Probanden gemacht werden, während sich dieser „hemmende“ Effekt von HLA-E nicht bei NK-Zellen von HIV(+) Probanden nachweisen ließ. Dieses Ergebnis scheint auch unter Berücksichtigung der Tatsache plausibel, dass NK-Zellen von HIV-infizierten Probanden eine signifikant verminderte Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors verglichen mit NK-Zellen gesunder Probanden aufweisen. So ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion von Peptid-stabilisierten HLA-E mit NKG2A auf NK-Zellen von gesunden Probanden zu einer veränderten Sekretion löslicher Mediatoren führt. Durch die Herabregulation des NKG2A-Rezeptors

auf NK-Zellen von HIV(+) Patienten hat die Peptid-vermittelte Stabilisierung von HLA-E aber dementsprechend weniger Auswirkung auf die Zytokinfreisetzung durch NK-Zellen. Zudem sind die NK-Zellen HIV(+) Patienten durch die *in vivo* Exposition wahrscheinlich bereits maximal über HLA-E inhibiert, so dass die HLA-E Stabilisierung durch HIV p24₁₄₋₂₂ *in vitro* keinen zusätzlichen Effekt mehr zeigt.

Aufgrund ihrer Schlüsselfunktion bei der Initiierung der antiviralen Immunantwort stellt die Modulation von DC einen wichtigen Angriffspunkt des HI-Virus dar, um einer effektiven zellulären Immunantwort zu entgehen. Es wird vermutet, dass bei der HIV-Infektion eine gestörte Antigenpräsentation durch DC wesentlich zur Chronifizierung der Infektion beiträgt. Der bi-direktionale Crosstalk von NK-Zellen und DC ist durch direkten Zell-Zellkontakt und durch lösliche Faktoren wie Zytokine charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln wider, dass durch die Interaktion von NKG2A(+) NK-Zellen und HLA-E dieser Crosstalk durch lösliche Mediatoren moduliert wird und dass der veränderte NK-Zellphänotyp chronischer HIV(+) Patienten die Expression von Reifungsmarkern auf der Zelloberfläche von MDC negativ beeinflusst. Dieser Mechanismus könnte zur allgemeinen Immundysfunktion, die bei HIV(+) Patienten beobachtet wird beitragen, indem die Initiierung einer T-Zellantwort durch DC negativ beeinflusst wird. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten schon frühere Arbeiten zeigen, dass periphere DC von HIV-infizierten Individuen im Vergleich zu DC von gesunden Probanden weniger effizient allogene T-Zellen stimulieren [102]. Weiterhin konnten Loré et al. zeigen, dass DCs von Patienten mit akuter HIV-Infektion eine verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aufwiesen [182]. Die Interaktion von DC mit T-Zellen kann durch das Fehlen des kostimulatorischen Signals wesentlich beeinflusst werden, denn die DC-vermittelte Differenzierung von T-Zellen erfolgt nur, wenn bestimmte Signale von der DC bereitgestellt werden. So muss die DC ein spezifisches Antigen über MHC präsentieren, das von der T-Zelle über den T-Zellrezeptor erkannt wird. Weiterhin muss die DC kostimulatorische Moleküle wie CD80 / 86 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, welche die Interaktion mit CD28 der T-Zelle vermitteln. Kann durch die verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle kein zweites Signal

vermittelt werden, führt dies zu einer peripheren T-Zelltoleranz. Über diesen Mechanismus könnte neben der verminderten Präsentation viraler Antigene auch eine verminderte Ausreifung von DC und Induktion von Toleranz eine wichtige Rolle bei der Persistenz des HI-Virus spielen [183].

Des Weiteren wurden MODC in dieser Arbeit mit NK-Zellüberständen aus der Koinkubation mit unbeladenen HLA-E^G-K562 Zellen stimuliert. Dabei weisen HLA-E^G-K562 Zellen, die nicht mit dem HIV-Peptid vorinkubiert wurden, nur eine geringere Oberflächenexpression von HLA-E auf. Hier zeigte sich, dass MODC, die mit NK-Zellüberständen von HIV(+) Patienten stimuliert wurden auf ihrer Zelloberfläche eine signifikant geringere Expression der Antigenpräsentierenden Moleküle MHC-I, HLA-DR und der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 aufwiesen, als MODC, die mit NK-Zellüberständen von gesunden Probanden stimuliert wurden. Diese Daten sind ein möglicher Hinweis darauf, dass neben der Herabregulation des NKG2A-Rezeptors weitere Veränderungen der NK-Zellen bei HIV(+) Patienten zu einer gestörten Sekretion löslicher Mediatoren führen, welche die Ausreifung von MODC beeinflussen. Dies scheint jedoch über einen anderen Mechanismus vermittelt zu werden, da bei den durchgeführten Experimenten die Interaktionsmöglichkeit von HLA-E mit CD94 / NKG2A aufgrund einer nur geringen Oberflächenexpression von HLA-E auf der Zielzelle und von CD94 / NKG2A auf der Effektorzelle stark herabgesetzt ist.

In dieser Arbeit konnte auch nachgewiesen werden, dass die Interaktion von Peptid-stabilisiertem HLA-E mit NKG2A(+) NK-Zellen gesunder Probanden über lösliche Mediatoren zu einer verminderten Ausreifung von MODC führt. Diese Mediatoren sollten daher näher charakterisiert werden. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass NK-Zellen von HIV(+) Patienten im Vergleich zu NK-Zellen gesunder Probanden eine verminderte Sezernierung der Zytokine IFN- γ und TNF- α aufweisen [34, 184-186]. Diese Zytokine können die Ausreifung von DC fördern [91-93]. Bezüglich der Zytokinsezernierung durch NK-Zellen konnte hier gezeigt werden, dass nach Stimulation mit HLA-E^G-K562 Zellen die beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α signifikant geringer durch die NK-Zellen von HIV(+) Patienten gebildet wurden als bei gesunden Probanden.

Die Zytokine IFN- γ und TNF- α spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Virusinfektionen [111, 187, 188]. Schon mehrfach wurde deshalb vermutet, dass eine gestörte Zytokinbildung durch NK-Zellen zur allgemeinen Dysfunktion der Immunantwort beiträgt. Die hier erbrachten Ergebnisse unterstützen diese These ebenfalls.

Ein weiteres Zytokin, das vielfältige Effekte auf DC ausübt, ist das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 [189]. Obwohl IL-10 eine bedeutende Rolle bei der HIV-Infektion zu spielen scheint [190], konnte in dieser Arbeit keine Sekretion dieses Zytokins durch NK-Zellen bei HIV(-) und HIV(+) Probanden nach Koinkubation mit HIV p24₁₄₋₂₂ beladenen HLA-E-K562 Zellen nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigen die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse, dass die HIV p24₁₄₋₂₂ vermittelte Stabilisierung von HLA-E die Sekretion der Zytokine IFN- γ und TNF- α durch NK-Zellen offensichtlich nicht beeinflusst. Dies konnte bei HIV(-) Probanden und HIV(+) Probanden gleichermaßen festgestellt werden. Da kein Zusammenhang zwischen der Bildung von IFN- γ und TNF- α und der Stabilisierung von HLA-E nachgewiesen werden konnte, bleibt unklar, über welchen Mechanismus die Expression der Reifungsmarker auf MODC nach Inkubation mit Peptid-haltigen Überständen reduziert wird. Die komplexe Interaktion zwischen NK-Zellen und DC könnte neben dem direkten Zell-Zellkontakt auch durch andere Mediatoren vermittelt werden, die im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher bestimmt werden konnten. Aber in der Literatur wurden solche Faktoren, wie extrazelluläres Adenosin-Triphosphat (ATP) [191, 192], Harnsäure [193] und das HMGB1 (engl. *human-mobility-group* B1) [194, 195] Protein, welche die Ausreifung von DC begünstigen, bereits mehrfach postuliert. Zum Beispiel zeigten Semino et al., dass der Crosstalk von unreifen DC und NK-Zellen zu einer verstärkten Bildung von HMGB1 durch NK-Zellen führt [196]. Einen weiteren Hinweis darauf, dass HMGB1 in der HIV-Infektion eine wichtige Rolle spielen könnte, gibt eine Arbeit von Nowak et al., die zeigen konnte, dass der Serumspiegel von HMGB1 bei chronisch HIV-1 infizierten Patienten erhöht ist [197]. Ein weiterer Faktor, der die Ausreifung von MODC beeinflussen könnte, stellt das Prostaglandin E₂ (PGE₂) dar. PGE₂ wird durch viele APC sezerniert und induziert eine gesteigerte Oberflächenexpression von MHC- und

kostimulatorischen Molekülen auf DC. Hierbei zeigte die Kombination von TNF und PGE₂ oder der Einsatz eines Reifungscocktails bestehend aus TNF, PGE₂, IL-1 β und IL-6 eine besonders effektive Wirkung auf die Ausreifung von MODC [198-200].

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Faktoren scheint das Zytokin TGF- β die Ausreifung von DC zu inhibieren [93, 201]. Es könnte somit ebenfalls eine Rolle bei der NK-Zellvermittelten Reifung von DC spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit die verminderte Ausreifung von MODC nach Stimulation mit Überständen, die in Anwesenheit des HIV p24₁₄₋₂₂ Peptids generiert wurden, nicht über die differentielle Sezernierung der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-10 durch NK-Zellen erklärt werden kann. Da jedoch eine Vielzahl von Faktoren die Ausreifung von DC induzieren und / oder regulieren können, könnten andere Zytokine wie beispielsweise HMBG1 für den beobachteten Effekt verantwortlich sein. Ebenfalls könnte die Balance zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Signalen wie z.B. TNF, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β und PGE₂ die Ausreifung von DC beeinflussen. Eine genauere Charakterisierung derartiger Interaktionen ist die Aufgabe zukünftiger Forschungsarbeiten.

VI Literaturverzeichnis

- [1] Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. und Houghton, M. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome". *Science*, 244, 359-362.
- [2] Choo, Q.L., Weiner, A.J., Overby, L.R., Kuo, G., Houghton, M. und Bradley, D.W. (1990). "Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis". *British Medical Bulletin*, 46, 423-441.
- [3] Heintges, T. und Wands, J.R. (1997). "Hepatitis C virus: epidemiology and transmission". *Hepatology*, 26, 521-526.
- [4] Zeuzem, S., Franke, A., Lee, J.H., Herrmann, G., Ruster, B. und Roth, W.K. (1996). "Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology". *Hepatology*, 24, 1003-1009.
- [5] Meisel, H., Reip, A., Faltus, B., Lu, M., Porst, H., Wiese, M., Roggendorf, M. und Krüger, D.H. (1995). "Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin". *Lancet*, 345, 1209-1211.
- [6] Wiese, M., Berr, F., Lafrenz, M., Porst, H. und Oesen, U. (2000). "Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study". *Hepatology*, 32, 91-96.
- [7] Dittmann, S., Roggendorf, M., Dürkop, J., Wiese, M., Lorbeer, B. und Deinhardt, F. (1991). "Long-term persistence of hepatitis C virus antibodies in a single source outbreak". *Journal of Hepatology*, 13, 323-327.
- [8] Power, J.P., Lawlor, E., Davidson, F., Holmes, E.C., Yap, P.L. und Simmonds, P. (1995). "Molecular epidemiology of an outbreak of infection with hepatitis C virus in recipients of anti-D immunoglobulin". *Lancet*, 345, 1211-1213.
- [9] Montalbano, M. und Neff, G.W. (2005). "An update in liver transplantation in patients with hepatitis B and hepatitis C". *Minerva Gastroenterologica E Dietologica*, 51, 109-126.
- [10] Bartenschlager, R., Frese, M. und Pietschmann, T. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence". *Advances in Virus Research*, vol. 63, 2004, S. 71-180.
- [11] Bartenschlager, R. (2002). "Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development". *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1, 911-916.
- [12] Wang, J.T., Sheu, J.C., Lin, J.T., Wang, T.H. und Chen, D.S. (1992). "Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells". *The Journal of Infectious Diseases*, 166, 1167-1169.
- [13] Lerat, H., Berby, F., Traubad, M.A., Vidalin, O., Major, M., Trépo, C. und Inchauspé, G. (1996). "Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells". *The Journal of Clinical Investigation*, 97, 845-851.
- [14] Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. und Abrignani S. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81," *Science*, 282, 938-941.
- [15] Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. und Vitelli, A. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus". *The EMBO Journal*, 21, 5017-5025.

- [16] Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. und Zhang, Q.X. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 12766-12771.
- [17] Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D. und Rice, C.M. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry," *Nature*, 446, 801-805.
- [18] Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P. und Rice, C.M. (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells," *Nature*, 457, 882-886.
- [19] Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D. und Bienz, K. (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex," *Journal of Virology*, 76, 5974-5984.
- [20] Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H.E. und Bienz, K. (2003). "Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex". *Antiviral Research*, 60, 103-109.
- [21] Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J. und Perelson, A.S. (1998). "Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy". *Science*, 282, 103-107.
- [22] Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genescà, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. und Gómez, J. (1992). "Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution". *Journal of Virology*, 66, 3225-3229.
- [23] Simmonds, P., Smith, D.B., McOmish, F., Yap, P.L., Kolberg, J., Urdea, M.S. und Holmes, E.C. (1994). "Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions," *The Journal of General Virology*, 75, 1053-1061.
- [24] "UNAIDS: The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS.", <http://www.unaids.org/en>. Abruf: 15.02.2010
- [25] "RKI HIV/AIDS.", <http://www.rki.de>. 15.02.2010
- [26] Modrow, S., *Molekulare Virologie*, Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akad. Verl., 2003.
- [27] Rockstroh, J.K., Kapitel 1, "HIV-Buch, das Buch zu HIV und Aids (2009). <http://www.hivbuch.de/einleitung-das-buch-zu-hiv-und-aids.html>
- [28] Janeway, C., *Janeway's immunobiology.*, New York: Garland Science, (2008).
- [29] Mariani, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König, R., Bollman, B., Münk, C., Nymark-McMahon, H. und Landau, N.R. (2003). "Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif". *Cell*, 114, 21-31.
- [30] Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. und Weiss, R.A. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus". *Nature*, 312, 763-767.
- [31] Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C. und Montagnier, L. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV," *Nature*, 312, 767-768.
- [32] Kottlil, S., Shin, K., Planta, M., McLaughlin, M., Hallahan, C.W., Ghany, M., Chun, T., Sneller, M.C. und Fauci, A.S. (2004). "Expression of chemokine and inhibitory receptors on natural killer cells: effect of immune activation and HIV viremia". *The Journal of Infectious Diseases*, 189, 1193-1198.

- [33] Ahmad, A. und Menezes, J. (1996). "Defective killing activity against gp120/41-expressing human erythroleukaemic K562 cell line by monocytes and natural killer cells from HIV-infected individuals". *AIDS*, 10, 143-149.
- [34] Mavilio, D., Benjamin, J., Daucher, M., Lombardo, G., Kottlil, S., Planta, M.A., Marcenaro, E., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. und Fauci, A.S. (2003). "Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 15011-15016.
- [35] Mayer, K., Rupprecht, W. und Hörmann, J. (2010). Analysetechniken in der Molekulargenetik, <http://www.medizinische-genetik.de>.
- [36] Streek, H. und Altfeld, M., Kapitel 5, "HIV-Buch, das Buch zu HIV und Aids, 2009". <http://www.hivbuch.de/hiv-buch-das-buch-zu-hiv-und-aids.html>
- [37] den Uyl, D., van der Horst-Bruinsma, I.E. und van Agtmael, M. (2004). "Progression of HIV to AIDS: a protective role for HLA-B27?". *AIDS Reviews*, 6, 89-96.
- [38] McKiernan, S.M., Hagan, R., Curry, M., McDonald, G.S.A., Kelly, A., Nolan, N., Walsh, A., Hegarty, J., Lawlor, E. und Kelleher, D. (2004). "Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source". *Hepatology*, 40, 108-114.
- [39] Lo Monaco, E., Sibilio, L., Melucci, E., Tremante, E., Suchànek, M., Horejsi, V., Martayan, A. und Giacomini, P. (2008). "HLA-E: strong association with beta2-microglobulin and surface expression in the absence of HLA class I signal sequence-derived peptides". *Journal of Immunology*, 181, 5442-5450.
- [40] Braud, V., Jones, E.Y. und McMichael, A. (1997). "The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9". *European Journal of Immunology*, 27, 1164-1169.
- [41] Lanier, L.L. (1998). "NK cell receptors." *Annual Review of Immunology*, 16, 359-393.
- [42] Lee, N., Goodlett, D.R., Ishitani, A., Marquardt, H. und Geraghty, D.E. (1998). "HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences". *Journal of Immunology*, 160, 4951-4960.
- [43] Lanier, L.L. (2005) "NK cell recognition". *Annual Review of Immunology*, 23, 225-274.
- [44] Nattermann, J., Nischalke, H.D., Hofmeister, V., Ahlenstiel, G., Zimmermann, H., Leifeld, L., Weiss, E.H., Sauerbruch, T. und Spengler, U. (2005). "The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells". *The American Journal of Pathology*, 166, 443-453.
- [45] Nattermann, J., Nischalke, H.D., Hofmeister, V., Kupfer, B., Ahlenstiel, G., Feldmann, G., Rockstroh, J., Weiss, E.H., Sauerbruch, T. und Spengler, U. (2005). "HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells". *Antiviral Therapy*, 10, 95-107.
- [46] "HIV Databases" (2009), Los Alamos National Security, <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>. Abruf: 30.08. 2008.
- [47] Miller, J.D., Weber, D.A., Ibegbu, C., Pohl, J., Altman, J.D. und Jensen, P.E. (2003). "Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2". *Journal of Immunology*, 171, 1369-1375.

- [48] Addo, M.M., Yu, X.G., Rathod, A., Cohen, D., Eldridge, R.L., Strick, D., Johnston, M.N., Corcoran, C., Wurcel, A.G., Fitzpatrick, C.A., Feeney, M.E., Rodriguez, W.R., Basgoz, N., Draenert, R., Stone, D.R., Brander, C., Goulder, P.J.R., Rosenberg, E.S., Altfeld, M. und Walker, B.D. (2003). "Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load". *Journal of Virology*, 77, 2081-2092.
- [49] Yusim, K., Kesmir, C., Gaschen, B., Addo, M.M., Altfeld, M., Brunak, S., Chigaev, A., Detours, V. und Korber, B.T. (2002). "Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation". *Journal of Virology*, 76, 8757-8768.
- [50] Bategay, M., Fikes, J., Di Bisceglie, A.M., Wentworth, P.A., Sette, A., Celis, E., Ching, W.M., Grakoui, A., Rice, C.M. und Kurokohchi, K. (1995). "Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus-encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules," *Journal of Virology*, 69, 2462-2470.
- [51] Strong, R.K., Holmes, M.A., Li, P., Braun, L., Lee, N. und Geraghty, D.E. (2003). "HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities". *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 5082-5090.
- [52] Lajoie, J., Hargrove, J., Zijenah, L.S., Humphrey, J.H., Ward, B.J. und Roger, M. (2006). "Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1". *The Journal of Infectious Diseases*, 193, 298-301.
- [53] Trinchieri G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity," *Nature Reviews. Immunology*, 3, 133-146.
- [54] Curtsinger, J.M., Lins, D.C. und Mescher, M.F. (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function". *The Journal of Experimental Medicine*, 197, 1141-1151.
- [55] Braud, V.M., Aldemir, H., Breart, B. und Ferlin, W.G. (2003). "Expression of CD94-NKG2A inhibitory receptor is restricted to a subset of CD8+ T cells". *Trends in Immunology*, 24, 162-164.
- [56] Jabri, B., Selby, J.M., Negulescu, H., Lee, L., Roberts, A.I., Beavis, A., Lopez-Botet, M., Ebert, E.C. und Winchester, R.J. (2002). "TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL" *Immunity*, 17, 487-499.
- [57] Moser, J.M., Gibbs, J., Jensen, P.E. und Lukacher, A.E. (2002). "CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses". *Nature Immunology*, 3, 189-195.
- [58] Speiser, D.E., Pittet, M.J., Valmori, D., Dunbar, R., Rimoldi, D., Liénard, D., MacDonald, H.R., Cerottini, J.C., Cerundolo, V. und Romero, P. (1999). "In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes". *The Journal of Experimental Medicine*, 190, 775-782.
- [59] Pietra, G., Romagnani, C., Mazzarino, P., Falco, M., Millo, E., Moretta, A., Moretta, L. und Mingari, M.C. (2003). "HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10896-10901.

- [60] Heinzl, A.S., Grotzke, J.E., Lines, R.A., Lewinsohn, D.A., McNabb, A.L., Streblow, D.N., Braud, V.M., Grieser, H.J., Belisle, J.T. und Lewinsohn, D.M. (2002). "HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells". *The Journal of Experimental Medicine*, 196, 1473-1481.
- [61] Salerno-Gonçalves, R., Fernandez-Viña, M., Lewinsohn, D.M. und Sztejn, M.B. (2004). "Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine". *Journal of Immunology*, 173, 5852-5862.
- [62] Wilson, J.D., Ogg, G.S., Allen, R.L., Davis, C., Shaunak, S., Downie, J., Dyer, W., Workman, C., Sullivan, S., McMichael, A.J. und Rowland-Jones, S.L. (2000). "Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection". *AIDS*, 14, 225-233.
- [63] Rubbert-Roth A. und Behrens, G., Kapitel 3, "HIV-Buch, das Buch zu HIV und Aids.", 2009. <http://www.hivbuch.de/pathophysiologie-der-hiv-infektion.html>
- [64] Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P. und Walker, B.D. (2000). "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus". *The Journal of Experimental Medicine*, 191, 1499-1512.
- [65] Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C. und Chisari, F.V. (2001). "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection". *The Journal of Experimental Medicine*, 194, 1395-1406.
- [66] Rehmann, B., Chang, K.M., McHutchison, J.G., Kokka, R., Houghton M. und Chisari, F.V. (1996). "Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection". *The Journal of Clinical Investigation*, 98, 1432-1440.
- [67] Nelson, D.R., Marousis, C.G., Davis, G.L., Rice, C.M., Wong, J., Houghton, M. und Lau, J.Y. (1997). "The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C". *Journal of Immunology*, 158, 1473-1481.
- [68] Wedemeyer, H., He, X., Nascimbeni, M., Davis, A.R., Greenberg, H.B., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Alter, H. und Rehmann, B. (2002). "Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection". *Journal of Immunology*, 169, 3447-3458.
- [69] Gruener, N.H., Lechner, F., Jung, M.C., Diepolder, H., Gerlach, T., Lauer, G., Walker, B., Sullivan, J., Phillips, R., Pape, G.R. und Klenerman, P. (2001). "Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus". *Journal of Virology*, 75, 5550-5558.
- [70] Carretero, M., Cantoni, C., Bellón, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodríguez, A., Pérez-Villar, J.J., Moretta, L., Moretta, A. und López-Botet, M. (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules". *European Journal of Immunology*, 27, 563-567.
- [71] Brooks, A.G., Posch, P.E., Scorzelli, C.J., Borrego, F. und Coligan, J.E. (1997). "NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor". *The Journal of Experimental Medicine*, 185, 795-800.
- [72] Ploegh, H.L. (1998). "Viral strategies of immune evasion". *Science*, 280, 248-253.
- [73] Algarra, I., Cabrera, T. und Garrido, F. (2000). "The HLA crossroad in tumor immunology". *Human Immunology*, 61, 65-73.
- [74] Alter, G. und Altfeld, M. (2009). "NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection". *Journal of Internal Medicine*, 265, 29-42.

- [75] Corado, J., Toro, F., Rivera, H., Bianco, N.E., Deibis, L. und De Sanctis, J.B. (1997). "Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection". *Clinical and Experimental Immunology*, 109, 451-457.
- [76] Tseng, C.K. und Klimpel, G.R. (2002). "Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions". *The Journal of Experimental Medicine*, 195, 43-49.
- [77] Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., Abrignani, S. und Valiante, N.M. (2002). "Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein". *The Journal of Experimental Medicine*, 195, 35-41.
- [78] Mavilio, D., Benjamin, J., Daucher, M., Lombardo, G., Kottlil, S., Planta, M.A., Marcenaro, E., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. und Fauci, A.S. (2003). "Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 15011-15016.
- [79] Brenner, B.G., Dascal, A., Margolese, R.G. und Wainberg, M.A. (1989). Natural killer cell function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related diseases". *Journal of Leukocyte Biology*, 46, 75-83.
- [80] Tarazona, R., Casado, J.G., Delarosa, O., Torre-Cisneros, J., Villanueva, J.L., Sanchez, B., Galiani, M.D., Gonzalez, R., Solana, R. und Peña, J. (2002). "Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals". *Journal of Clinical Immunology*, 22, 176-183.
- [81] Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J. und Wilkinson, G.W. (2000). "Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40". *Science*, 287, 1031.
- [82] Ulbrecht, M., Martinuzzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J.W., Pla, M. und Weiss, E.H. (2000). "Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis". *Journal of Immunology*, 164, 5019-5022.
- [83] Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. und Palucka, K. (2000). "Immunobiology of dendritic cells". *Annual Review of Immunology*, 18, 767-811.
- [84] Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A.Q., Weijer, K. und Uittenbogaart, C.H. (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2". *The Journal of Experimental Medicine*, 192, 1775-1784.
- [85] Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S. und Hartmann, G. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides," *Journal of Immunology*, 168, 4531-4537.
- [86] Palucka, A.K., Banchereau, J., Blanco, P. und Pascual, V. (2002). "The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus". *Immunology and Cell Biology*, 80, Okt. 484-488.
- [87] Donaghy, H., Wilkinson, J. und Cunningham, A.L. (2006). "HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow?". *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 1001-1012.

- [88] Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. und Liu, Y.J. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood". *Science*, 284, 1835-1837.
- [89] Sallusto, F., Cella, M., Danieli C. und Lanzavecchia, A. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products". *The Journal of Experimental Medicine*, 182, 389-400.
- [90] Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. und Valiante, N.M. (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells". *The Journal of Experimental Medicine*, 195, 335-341.
- [91] Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L. und Vivier, E. (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force" ". *Blood*, 106, 2252-2258.
- [92] Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. und Ugolini, S. (2008). "Functions of natural killer cells". *Nature Immunology*, 9, 503-510.
- [93] Moretta, A. (2002). "Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues". *Nature Reviews. Immunology*, 2, 957-964.
- [94] Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F. und Patterson, S. (2001). "Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load". *Blood*, 98, 2574-2576.
- [95] Chehimi, J., Campbell, D.E., Azzoni, L., Bacheller, D., Pappasavas, E., Jerandi, G., Mounzer, K., Kostman, J., Trinchieri, G. und Montaner, L.J. (2002). "Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals". *Journal of Immunology*, 168, 4796-4801.
- [96] Anthony, D.D., Yonkers, N.L., Post, A.B., Asaad, R., Heinzl, F.P., Lederman, M.M., Lehmann, P.V. und Valdez, H. (2004). "Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection". *Journal of Immunology*, 172, 4907-4916.
- [97] Dolganiuc, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Do, T., Romics, L., Mandrekar, P., Zapp, M. und Szabo, G. (2003). "Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation". *Journal of Immunology*, 170, 5615-5624.
- [98] Chehimi, J., Starr, S.E., Frank, I., D'Andrea, A., Ma, X., MacGregor, R.R., Sennelier, J. und Trinchieri, G. (1994). "Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients". *The Journal of Experimental Medicine*, 179, 1361-1366.
- [99] Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F., und Patterson, S. (2003). "Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1," *Blood*, 101, 4505-4511.
- [100] Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Fuchs, A., Colonna, M. und Caligiuri, M.A. (2004). "NK cell and DC interactions". *Trends in Immunology*, 25, 47-52.
- [101] de Jong, M.A.W.P., de Witte, L., Oudhoff, M.J., Gringhuis, S.I., Gallay, P. und Geijtenbeek, T.B.H. (2008). "TNF-alpha and TLR agonists increase susceptibility to HIV-1 transmission by human Langerhans cells ex vivo". *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 3440-3452.
- [102] Wu, L. und KewalRamani, V.N. (2006). "Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination". *Nature Reviews. Immunology*, 6, 859-868.

- [103] Hladik, F. und Hope, T.J. (2009). "HIV infection of the genital mucosa in women". *Current HIV/AIDS Reports*, 6, 20-28.
- [104] Piguet, V. und Blauvelt, A. (2002). "Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease". *The Journal of Investigative Dermatology*, 119, 365-369.
- [105] de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A.W.P., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y. und Geijtenbeek, T.B.H. (2007). "Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells". *Nature Medicine*, 13, 367-371.
- [106] Kirkland, T.N. und Viriyakosol, S. (1998). "Structure-function analysis of soluble and membrane-bound CD14". *Progress in Clinical and Biological Research*, 397, 79-87.
- [107] Kitchens, R.L. (2000). "Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides". *Chemical Immunology*, 74, 61-82.
- [108] Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S. und Ulevitch, R.J. (1990). "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein". *Science*, 249, 1429-1431.
- [109] Dobrovolskaia, M.A. und Vogel, S.N. (2002). "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS". *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 4, 903-914.
- [110] Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. und Howard, J.C. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma". *Annual Review of Immunology*, 15, 749-795.
- [111] Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C. und MacMicking, J.D. (1993). "Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase". *Science*, 261, 1445-1448.
- [112] Shalaby, M.R., Espevik, T., Rice, G.C., Ammann, A.J., Figari, I.S., Ranges, G.E. und Palladino, M.A. (1988). "The involvement of human tumor necrosis factors-alpha and -beta in the mixed lymphocyte reaction". *Journal of Immunology*, 141, 499-503.
- [113] Yokota, S., Geppert, T.D. und Lipsky, P.E. (1998). "Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha". *Journal of Immunology*, 140, 531-536.
- [114] Fernandes, H., Koneru, B., Fernandes, N., Hameed, M., Cohen, M.C., Raveche, E. und Cohen, S. (2002). "Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients". *Transplantation*, 73, 1886-1891.
- [115] Louis, E., Franchimont, D., Piron, A., Gevaert, Y., Schaaf-Lafontaine, N., Roland, S., Mahieu, P., Malaise, M., De Groote, D., Louis, R. und Belaiche, J. (1998). "Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans". *Clinical and Experimental Immunology*, 113, 401-406.
- [116] Bayley, J., Ottenhoff, T.H.M. und Verweij, C.L. (2004). "Is there a future for TNF promoter polymorphisms?". *Genes and Immunity*, 5, 315-329.
- [117] Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O. und Duff, G.W. (1997). "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 3195-3199.
- [118] Wu, W.S. und McClain, K.L. (1997). "DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH)". *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 17, 631-635.

- [119] Bouma, G., Crusius, J.B., Oudkerk Pool, M., Kolkman, J.J., von Blomberg, B.M., Kostense, P.J., Giphart, M.J., Schreuder, G.M., Meuwissen, S.G. und Peña, A.S. (1996). "Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease". *Scandinavian Journal of Immunology*, 43, 456-463.
- [120] Blackburn, S.D. und Wherry, E.J. (2007). "IL-10, T cell exhaustion and viral persistence". *Trends in Microbiology*, 15, 143-146.
- [121] Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. und O'Garra, A. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor". *Annual Review of Immunology*, 19, 683-765.
- [122] De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O. und Moser, M. (1997). "Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function". *European Journal of Immunology*, 27, 1229-1235.
- [123] Pietra, G., Romagnani, C., Mazzarino, P., Falco, M., Millo, E., Moretta, A., Moretta, L. und Mingari, M.C. (2003). "HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10896-10901.
- [124] Böyum, A. (1968). "Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction". *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, 97, 7.
- [125] Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha". *The Journal of Experimental Medicine*, 179, 1109-1118.
- [126] Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-1523.
- [127] Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 615-619.
- [128] Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. und Wittwer, C.T. (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction". *Analytical Biochemistry*, 245, 154-160.
- [129] Nischalke, H.D., Nattermann, J., Lichterfeld, M., Woitas, R.P., Rockstroh, J.K., Sauerbruch, T. und Spengler, U. (2004). "Rapid determination of the Delta32 deletion in the human CC-chemokine receptor 5 (CCR5) gene without DNA extraction by lightcycler real-time polymerase chain reaction". *AIDS Research and Human Retroviruses*, 20, 750-754.
- [130] Maier, S., Grzeschik, M., Weiss, E.H. und Ulbrecht, M. (2000). "Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells". *Human Immunology*, 61, 1059-1065.
- [131] Bategay, M., Fikes, J., Di Bisceglie, A.M., Wentworth, P.A., Sette, A., Celis, E., Ching, W.M., Grakoui, A., Rice, C.M. und Kurokohchi, K. (1995). "Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus-encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules". *Journal of Virology*, 69, 2462-2470.
- [132] Hoofnagle, J.H. (2002). "Course and outcome of hepatitis C". *Hepatology*, 36, 21-29.

- [133] Lauer, G.M., Barnes, E., Lucas, M., Timm, J., Ouchi, K., Kim, A.Y., Day, C.L., Robbins, G.K., Casson, D.R., Reiser, M., Dusheiko, G., Allen, T.M., Chung, R.T., Walker, B.D. und Klenerman, P. (2004). "High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection". *Gastroenterology*, 127, 924-936.
- [134] Grüner, N.H., Gerlach, T.J., Jung, M.C., Diepolder, H.M., Schirren, C.A., Schraut, W.W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., Cucchiaroni, M., Cerny, A. und Pape, G.R. (2000). "Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C". *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1528-1536.
- [135] Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H. und Chisari, F.V. (2002). "Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15661-15668.
- [136] Frese, M., Schwärzle, V., Barth, K., Krieger, N., Lohmann, V., Mihm, S., Haller, O. und Bartenschlager, R. (2002). "Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs". *Hepatology*, 35, 694-703.
- [137] He, X.S., Rehmann, B., López-Labrador, F.X., Boisvert, J., Cheung, R., Mumm, J., Wedemeyer, H., Berenguer, M., Wright, T.L., Davis, M.M. und Greenberg, H.B. (1999). "Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 5692-5697.
- [138] Grabowska, A.M., Lechner, F., Klenerman, P., Tighe, P.J., Ryder, S., Ball, J.K., Thomson, B.J., Irving, W.L. und Robins, R.A. (2001). "Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection". *European Journal of Immunology*, 31, 2388-2394.
- [139] Wentworth, P.A., Sette, A., Celis, E., Sidney, J., Southwood, S., Crimi, C., Stitely, S., Keogh, E., Wong, N.C., Livingston, B., Alazard, D., Vitiello, A., Grey, H.M., Chisari, F.V., Chesnut, R.W. und Fikes, J. (1996). "Identification of A2-restricted hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes from conserved regions of the viral genome". *International Immunology*, 8, 651-659.
- [140] Takao, Y., Yamada, A., Yutani, S. und Itoh, K. (2004). "Antibody reactive to a hepatitis C virus (HCV)-derived peptide capable of inducing HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes is detectable in a majority of HCV-infected individuals without HLA-A2 restriction". *Microbiology and Immunology*, 48, 507-517.
- [141] Grimsley, C. und Ober, C. (1997). "Population genetic studies of HLA-E: evidence for selection". *Human Immunology*, 52, 33-40.
- [142] Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M. und Walker, C.M. (2003). "HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help". *Science*, 302, 659-662.
- [143] Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann K.A. und Walker, C.M. (2003). "Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection". *The Journal of Experimental Medicine*, 197, 1645-1655.
- [144] Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., Goedert, J.J., Kirk, G.D., Donfield, S.M., Rosen, H.R., Tobler, L.H., Busch, M.P., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B. und Carrington, M. (2009). "Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus". *Nature*, 461, 798-801.

- [145] Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G. und Goldstein, D.B. (2009). "Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance". *Nature*, 461, 399-401.
- [146] Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M.L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G.J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D., Smedile, A., Fragomeli, V., Müller, T., Bahlo, M., Stewart, G.J., Booth, D.R. und George, J. (2009). "IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy". *Nature Genetics*, 41, 1100-1104.
- [147] Tillmann, H.L., Thompson, A.J., Patel, K., Wiese, M., Tenckhoff, H., Nischalke, H.D., Lokhnygina, Y., Kullig, U., Göbel, U., Capka, E., Wiegand, J., Schiefke, I., GÜthoff, W., Grüngreiff, K., König, I., Spengler, U., McCarthy, J., Shianna, K.V., Goldstein, D.B., McHutchison, J.G., Timm, J. und Nattermann, J. (2010). "A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance, of acute hepatitis C virus and jaundice," *Gastroenterology*, [Epub ahead of print].
- [148] Tamouza, R., Rocha, V., Busson, M., Fortier, C., El Sherbini, S.M., Esperou, H., Filion, A., Socié, G., Dulphy, N., Krishnamoorthy, R., Toubert, A., Gluckman, E. und Charron, D. (2005). "Association of HLA-E polymorphism with severe bacterial infection and early transplant-related mortality in matched unrelated bone marrow transplantation". *Transplantation*, 80, 140-144.
- [149] Lin, Y., Wan, L., Wu, J., Sheu, J.J., Lin, C., Lan, Y., Lai, C., Hung, C., Tsai, Y., Tsai, C., Lin, T., Lin, J., Hsueh, K., Huang, Y., Chang, J. und Tsai F. (2009). "HLA-E gene polymorphism associated with susceptibility to Kawasaki disease and formation of coronary artery aneurysms". *Arthritis and Rheumatism*, 60, 604-610.
- [150] Tamouza, R., Busson, M., Rocha, V., Fortier, C., Haddad, Y., Brun, M., Boukouaci W., Bleux, H., Socié, G., Krishnamoorthy, R., Toubert, A., Gluckman, E. und Charron, D. (2006). "Homozygous status for HLA-E*0103 confers protection from acute graft-versus-host disease and transplant-related mortality in HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation". *Transplantation*, 82, 1436-1440.
- [151] Braud V.M. und McMichael A.J. (1999). "Regulation of NK cell functions through interaction of the CD94/NKG2 receptors with the nonclassical class I molecule HLA-E". *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 244, 85-95.
- [152] Ulbrecht, M., Couturier, A., Martinuzzi, S., Pla, M., Srivastava, R., Peterson, P.A. und Weiss, E.H. (1999). "Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences". *European Journal of Immunology*, 29, 537-547.
- [153] Geraghty, D.E., Stockscheider, M., Ishitani, A. und Hansen, J.A. (1992). "Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism". *Human Immunology*, 33, 174-184.
- [154] Matte, C., Lacaille, J., Zijenah, L., Ward, B. und Roger, M. (2000). "HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. The ZVITAMBO Study Group". *Human Immunology*, 61, 1150-1156.
- [155] Lee, N., Goodlett, D.R., Ishitani, A., Marquardt, H. und Geraghty, D.E. (1998). "HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences". *Journal of Immunology*, 160, 4951-4960.

- [156] Bortolotti, F., Resti, M., Marcellini, M., Giacchino, R., Verucchi, G., Nebbia, G., Zancan, L., Marazzi, M.G., Barbera, C., Maccabruni, A., Zuin, G., Maggiore, G., Balli, F., Vajro, P., Lepore, L., Molesini, M., Guido, M., Bartolacci, S. und Noventa, F. (2005). "Hepatitis C virus (HCV) genotypes in 373 Italian children with HCV infection: changing distribution and correlation with clinical features and outcome". *Gut*, 54, 852-857.
- [157] Lehmann, M., Meyer, M.F., Monazahian, M., Tillmann, H.L., Manns, M.P. und Wedemeyer, H. (2004). "High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection". *Journal of Medical Virology*, 73, 387-391.
- [158] Sullivan, L.C., Clements, C.S., Rossjohn, J. und Brooks, A.G. (2008). "The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity". *Tissue Antigens*, 72, 415-424.
- [159] Williams, M., Roeth, J.F., Kasper, M.R., Fleis, R.I., Przybycin, C.G. und Collins, K.L. (2002). "Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking". *Journal of Virology*, 76, 12173-12184.
- [160] Swann, S.A., Williams, M., Story, C.M., Bobbitt, K.R., Fleis, R. und Collins, K.L. (2001). "HIV-1 Nef blocks transport of MHC class I molecules to the cell surface via a PI 3-kinase-dependent pathway". *Virology*, 282, 267-277.
- [161] Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M. und Oldstone, M.B. (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection". *Journal of Virology*, 68, 6103-6110.
- [162] Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. und Ho, D.D. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome". *Journal of Virology*, 68, 4650-4655.
- [163] Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P., Cao, Y., Rowland-Jones, S.L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D.D., Nixon, D.F. und McMichael, A.J. (1998). "Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA". *Science*, 279, 2103-2106.
- [164] Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E. und Brooks, A.G. (1998). "Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis". *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 813-818.
- [165] Valés-Gómez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., López-Botet, M. und Strominger, J.L. (1999). "Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E". *The EMBO Journal*, 18, 4250-4260.
- [166] Michaëlsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L.L., Kärre, K., und Söderström, K. (2002). "A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition". *The Journal of Experimental Medicine*, 196, 1403-1414.
- [167] Reynolds, M.R., Rakasz, E., Skinner, P.J., White, C., Abel, K., Ma, Z., Compton, L., Napoé, G., Wilson, N., Miller, C.J., Haase, A. und Watkins, D.I. (2005). "CD8+ T-lymphocyte response to major immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little". *Journal of Virology*, 79, 9228-9235.

- [168] Spira, A.I., Marx, P.A., Patterson, B.K., Mahoney, J., Koup, R.A., Wolinsky, S.M. und Ho, D.D. (1996). "Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques". *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 215-225.
- [169] Kawamura, T., Kurtz, S.E., Blauvelt, A. und Shimada, S. (2005). "The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV". *Journal of Dermatological Science*, 40, 147-155.
- [170] Matsuyama, T., Yoshiyama, H., Hamamoto, Y., Yamamoto, N., Soma, G., Mizuno, D. und Kobayashi, N. (1989). "Enhancement of HIV replication and giant cell formation by tumor necrosis factor". *AIDS Research and Human Retroviruses*, 5, 139-146.
- [171] Wilson, A.G., di Giovine, F.S., Blakemore, A.I. und Duff, G.W. (1992). "Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product". *Human Molecular Genetics*, 1, 353.
- [172] Bihl, F., Frahm, N., Di Giammarino, L., Sidney, J., John, M., Yusim, K., Woodberry, T., Sango, K., Hewitt, H.S., Henry, L., Linde, C.H., Chisholm, J.V., Zaman, T.M., Pae, E., Mallal, S., Walker, B.D., Sette, A., Korber, B.T., Heckerman, D. und Brander, C. (2006). "Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses". *Journal of Immunology* 176, 4094-4101.
- [173] Kiepiela, P., Leslie, A.J., Honeyborne, I., Ramduth, D., Thobakgale, C., Chetty, S., Rathnavalu, P., Moore, C., Pfafferott, K.J., Hilton, L., Zimbwa, P., Moore, S., Allen, T., Brander, C., Addo, M.M., Altfeld, M., James, I., Mallal, S., Bunce, M., Barber, L.D., Szinger, J., Day, C., Klenerman, P., Mullins, J., Korber, B., Coovadia, H.M., Walker, B.D. und Goulder, P.J.R (2004). "Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA". *Nature*, 432, 769-775.
- [174] Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M, Schwartz, D., Sullivan, J. und Connors, M. (2000). "HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2709-2714.
- [175] Huang, Y., Paxton, W.A., Wolinsky, S.M., Neumann, A.U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N.R., Phair, J., Ho, D.D. und Koup, R.A. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression". *Nature Medicine*, 2, 1240-1243.
- [176] Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R. und O'Brien, S.J. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, SF City Cohort, ALIVE Study". *Science*, 273, 1856-1862.
- [177] Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G. und Parmentier, M. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene". *Nature*, 382, 722-725.

- [178] Zeddou, M., Rahmouni, S., Vandamme, A., Jacobs, N., Fripiat, F., Leonard, P., Schaaf-Lafontaine, N., Vaira, D., Boniver, J. und Moutschen, M. (2007). "Downregulation of CD94/NKG2A inhibitory receptors on CD8+ T cells in HIV infection is more pronounced in subjects with detected viral load than in their aviraemic counterparts". *Retrovirology*, 4, 72.
- [179] Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Marchesini, V., Carra, G. und Trinchieri, G. (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells". *The Journal of Experimental Medicine*, 195, 327-333.
- [180] Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G. und Trinchieri, G. (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions". *Journal of Immunology*, 174, 727-734.
- [181] Fernandez, N.C., Flament, C., Crépineau, F., Angevin, E., Vivier, E. und Zitvogel, L. (2002). "Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk". *European Cytokine Network*, 13, 17-27.
- [182] Loré, K., Sönnnerborg, A., Broström, C., Goh, L., Perrin, L., McDade, H., Stellbrink, H., Gazzard, B., Weber, R., Napolitano, L.A., van Kooyk, Y. und Andersson, J. (2002). "Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection". *AIDS*, 16, 683-692.
- [183] Steinman, R.M. und Nussenzweig, M.C. (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 351-358.
- [184] Azzoni, L., Papasavvas, E., Chehimi, J., Kostman, J.R., Mounzer, K., Ondercin, J., Perussia, B. und Montaner, L.J. (2002). "Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity". *Journal of Immunology*, 168, 5764-5770.
- [185] Jacobs, R., Weber, K., Wendt, K., Heiken, H. und Schmidt, R.E. (2004). "Altered coexpression of lectin-like receptors CD94 and CD161 on NK and T cells in HIV patients". *Journal of Clinical Immunology*, 24, 281-286.
- [186] Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A. und Fauci, A.S. (2005). "Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2886-2891.
- [187] Guidotti, L.G. und Chisari, F.V. (2001). "Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response". *Annual Review of Immunology*, 19, 65-91.
- [188] Sindhu, S., Toma, E., Cordeiro, P., Ahmad, R., Morisset, R. und Menezes, J. (2006). "Relationship of in vivo and ex vivo levels of TH1 and TH2 cytokines with viremia in HAART patients with and without opportunistic infections." *Journal of Medical Virology*, 78, 431-439.
- [189] Chan, A., Baird, M., Mercer, A.A. und Fleming, S.B. (2006). "Maturation and function of human dendritic cells are inhibited by orf virus-encoded interleukin-10". *The Journal of General Virology*, 87, 3177-3181.
- [190] Meroni, L., Trabattoni, D., Balotta, C., Riva, C., Gori, A., Moroni, M., Luisa Villa, M., Clerici, M. und Galli, M. (1996). "Evidence for type 2 cytokine production and lymphocyte activation in the early phases of HIV-1 infection". *AIDS*, 10, 23-30.

- [191] Schnurr, M., Then, F., Galambos, T., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S. und Eigler, A. (2000). "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells". *Journal of Immunology*, 165, 4704-4709.
- [192] la Sala, A., Ferrari, D., Corinti, S., Cavani, A., Di Virgilio, F. und Girolomoni, G. (2001). "Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses". *Journal of Immunology*, 166, 1611-1617.
- [193] Shi, Y., Evans, J.E. und Rock, K.L. (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells". *Nature*, 425, 516-521.
- [194] Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K.J. und Chiorazzi, N. (2004). "High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization," *Journal of Immunology*, 173, 307-313.
- [195] Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentini, B., Catalanotti, F., Giazon, M., Dumitriu, I.E., Müller, S., Iannacone, M., Traversari, C., Bianchi, M.E. und Manfredi, A.A. (2004). "HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells". *EMBO Reports*, 5, 825-830.
- [196] Semino, C., Angelini, G., Poggi, A. und Rubartelli, A. (2005). "NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1". *Blood*, 106, 609-616.
- [197] Nowak, P., Barqasho, B. und Sönnnerborg, A. (2007). "Elevated plasma levels of high mobility group box protein 1 in patients with HIV-1 infection". *AIDS*, 21, 869-871.
- [198] Rubio, M.T., Means, T.K., Chakraverty, R., Shaffer, J., Fudaba, Y., Chittenden, M., Luster, A.D. und Sykes, M. (2005). "Maturation of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) in the presence of prostaglandin E2 optimizes CD4 and CD8 T cell-mediated responses to protein antigens: role of PGE2 in chemokine and cytokine expression by MoDCs". *International Immunology*, 17, 1561-1572.
- [199] Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Förster, R. und Groettrup, M. (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells". *Blood*, 100, 1354-1361.
- [200] Kaliński, P., Schuitemaker, J.H., Hilkens, C.M. und Kapsenberg, M.L. (1998). "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation". *Journal of Immunology*, 161, 2804-2809.
- [201] Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O. und Durandy, A. (1999). "TGF- β 1 Prevents the Noncognate Maturation of Human Dendritic Langerhans Cells". *J Immunol*, 162, 4567-4575.
- [202] Handbuch des Durchflusszytometers FACS Calibur der Firma Becton, Dickinson and Company, <http://www.bdbeurope.com/>. Stand: 20.05.2010
- [203] "HCV Databases" (2009), Los Alamos National Security, <http://hcv.lanl.gov/content/index>. Abruf: 05.05.2008
- [204] Hall, Tom (2008), Biological Sequence Alignment Editor (BioEdit), <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Abruf: 12.05.2008
- [205] Strom, T.M. und Wienker, T.F., Case Control Studies, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Abruf: 03.02.2009

VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige Zellzytotoxizität <i>engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AIDS	<i>engl. acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
	Allophycocyanin
AS	Aminosäuren
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl. bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
cDNA	<i>engl. complementary deoxyribonucleic acid</i>
CD	<i>engl. cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>engl. cytotoxic T-lymphocytes</i>)
D	Dalton
DC	Dendritische Zelle (<i>engl.: dendritic cell</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl. enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	et aliter (und andere)
Fa.	Firma
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>engl. fluorescence activated cell sorting</i>)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins
FCS	Fötale Kälberserum (<i>engl. fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	<i>engl. fluorescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>engl. forward scatter</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HAART	<i>engl. highly active antiretroviral therapy</i>
HCV	Hepatitis-C Virus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HLA	<i>engl. human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
i.v.	intravenös
IRES	<i>engl. internal ribosomal entry site</i>
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LAMP	Lysosomen assoziiertes Membran Glycoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LTNP	<i>engl. long time non progressors</i>
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	milli
	Meter
μ	mikro
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>engl. magnetic activated cell sorter</i>)
MFI	mittelere Fluoreszenzintensität (<i>engl. mean fluorescence intensity</i>)
Min.	Minute
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl. major histocompatibility complex</i>)
mRNA	<i>engl. messenger ribonucleic acid</i>
NK	Natürliche Killer-
NKR	NK-Zell-Rezeptor
OD	optische Dichte
p	statistische Wahrscheinlichkeit
PAMP	<i>engl. pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>engl. peripheral blood mono-nucleatear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
pH	<i>lat. potentia Hydrogenii</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pg	Pikogramm
<i>rev</i>	<i>engl. regulator of expression of virion proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse-Transkription
Sek.	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>engl. standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>engl. standard error of the mean</i>)
SSC	<i>engl. sideward scatter</i>
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TAE	<i>engl. tris-acetate-EDTA</i>
TAP	<i>engl. transporter-associated with antigen processing</i>
<i>tat</i>	<i>engl. transactivator of transcription</i>
TCR	T Zell-Rezeptor (<i>engl. T cell receptor</i>)

TLR	<i>engl. Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Unit(s), Einheit von Enzymaktivität
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>engl. untranslated region</i>
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen (<i>engl. volume to volume</i>)
vs	<i>lat. versus</i>
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen (<i>engl. weight to volume</i>)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

VIII VERÖFFENTLICHUNGEN

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikationen und Kongressbeiträge:

Eigene Veröffentlichungen als Erstautor:

Schulte D, Vogel M, Langhans B, Krämer B, Körner C, Nischalke HD, Steinberg V, Michalk M, Berg T, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. The HLA-ER/HLA-ER genotype affects the natural course of HCV infection and is associated with HLA-E restricted recognition of a HCV-derived peptide by IFN-g secreting human CD8+ T cells.

J Infect Dis. 2009 Nov 1;200(9):1397-401

Schulte D, Krämer B, Körner C, Zwank C, Nischalke HD, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U, Nattermann J.

Differential production of TNF- α as a potential mechanism underlying the association between HLA-E genotype and susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1.

zur Publikation eingereicht

Veröffentlichungen als Koautor:

Nattermann J, Sherzada R, Iwan A, Bogen D, Niederle IM, Schulte D, Mertens E, Nischalke HD, Krämer B, Sauerbruch T, Leifeld L, Spengler U. Hepatitis C virus-induced secretion of inflammatory chemokines preferentially recruits NKG2A+CD8+ T cells.

J Infect Dis. 2008;198(2):213-7.

Krämer B, Schulte D, Körner C, Zwank C, Hartmann A, Michalk M, Söhne J, Langhans B, Nischalke HD, Coenen M, Möhl C, Vogt A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Regulation of NK cell trafficking by CD81.

Eur J Immunol. 2009;(12):3447-58.

Körner C, Krämer B, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fätkenheuer G, Oldenburg J, Nattermann J, Rockstroh JK, Spengler U. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4+ T-cells in HIV-positive patients.

Clin Sci (Lond). 2009;116(12):861-70.

Körner C, Tolksdorf F, Riesner, K, Krämer B, Schulte D, Nattermann J, Rockstroh JK, Spengler U. Hepatitis-C co-infection sensitizes CD4+ T cells towards Fas-induced apoptosis in HIV-positive patients.

Antivir Ther., in Revision

Kongressbeiträge:

2007 **Posterpräsentation** auf dem 3. Deutsch-Österreichischen AIDS-Kongress. Titel: Peptide HIV p24 aa14-22-mediated HLA-E stabilization alters cross-talk between natural killer cells and dendritic cells. Abstract-Nr. F.3.

Posterpräsentation auf der 58. Jahrestagung der American Association for the Study of Liver Diseases (AALSD). Titel: HLA-E restricted recognition of hepatitis C virus by a subset of IFN- γ secreting CD8+ T cells. Abstract-Nr. 499.

2008 **Posterpräsentation:** 15th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Titel: Altered Cross-talk between natural killer cells and dendritic cells due to peptide HIV p24 aa14-22 peptide-mediated HLA-E expression. Abstract-Nr. 485.

Posterpräsentation auf der 59. Jahrestagung der American Association for the Study of Liver Diseases (AALSD). Titel: Distribution of HLA-E allelic variants in HCV-infection. Abstract-Nr. 1079.

2009 **Posterpräsentation** auf der Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL). Titel: Bedeutung des HLA-E Polymorphismus bei der HCV-Infektion. Abstract-Nr. P.4.33.

Posterpräsentation auf der 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Titel: Einfluss des HLA-ER/HLA-ER Genotyps auf die HCV-Infektion. Abstract-Nr. P4_20.

Posterpräsentation auf der 44. Jahrestagung der European Association for the Study of the Liver (EASL). Titel: HLA-E-restricted recognition of a HCV-derived peptide by human CD8(+) cytolytic T lymphocytes. Abstract-Nr. 894.

Posterpräsentation auf der 12. European AIDS Conference (EACS)
Titel: HLA-E restricted recognition of a HIV- derived peptide by human CD8 (+) T-cells. Abstract-Nr. P.2.3/1.

Vortrag auf dem 1. Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen AIDS Kongress (SÖDAK). Titel: HLA-E restricted recognition of a HIV- derived peptide by human CD8 (+) T-cells. Abstract-Nr. OSC/3.

Vortrag auf dem 2nd European Congress of Immunology (ECI). Titel: HLA-E-restricted recognition of a HCV-derived peptide by human CD8(+) cytolytic T lymphocytes. Abstract-Nr. WSC15/1.

DANKE

Herrn Prof. Dr. Ulrich Spengler und Herrn Prof. Dr. Jacob Nattermann danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Betreuung und für die Unterstützung bei dieser Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Volker Herzog bedanken, der als zweiter Betreuer diese Arbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät vertrat, sowie bei Prof. Kolanus und Prof. Nattermann für die weitere Begutachtung der Arbeit.

Danke an alle Mitglieder des immunologischen Labors für das nette Zusammenleben und die tolle Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank an M. Benjamin, Christian, Marianne und Andreas mit denen das Doktoranden-Dasein wahnsinnig viel Spaß gemacht hat, an Bettina und besonders an Hans-Dieter für die fachliche Unterstützung. Außerdem möchte ich mich bei Claudia und Moni bedanken, die mich von der ersten Stunde an praktisch und vor allem moralisch unterstützten und ohne die viele Ergebnisse dieser Arbeit nicht zustande gekommen wären.

Ein dickes Dankeschön geht an Maari und meine Schwester Kerstin, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben.

Das größte Dankeschön geht an meine Eltern, meine gesamte Familie und an meine Freunde, die mich stets unterstützten und immer wieder ermutigt haben. Ganz besonders möchte ich mich bei Johannes für seine geduldige Unterstützung, den Rückhalt und die Motivation bedanken.