

**Der Einfluss physiologischer  
Sauerstoffkonzentrationen auf natürliche  
Killerzellen bei der Hepatitis C Virus- und der  
Humanes Immundefizienzvirus-Infektion**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Franziska Wolter**

aus

Königswinter

Bonn, 2016

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

1. Gutachter: PD Dr. Jacob Nattermann
2. Gutachter: Prof. Dr. Sven Burgdorf

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2016

Erscheinungsjahr: 2016

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1	Die Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion.....	3
2.1.1	Krankheitsverlauf und Therapie.....	3
2.1.2	Virusaufbau und Replikation.....	4
2.2	Die Humanes Immundefizienzvirus (HIV)-Infektion.....	4
2.2.1	Krankheitsverlauf und Therapie.....	5
2.2.2	Virusaufbau und Replikation.....	6
2.3	Natürliche Killerzellen.....	6
2.3.1	Die Regulationsmechanismen der NK-Zellen.....	7
2.3.2	NK-Zellen bei der HCV-Infektion.....	8
2.3.3	NK-Zellen bei der HIV-Infektion.....	10
2.4	Hypoxie als physiologischer Zustand.....	11
2.4.1	Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen.....	12
2.4.2	Metabolische Veränderungen bei Hypoxie.....	13
2.5	Zielsetzung.....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>16</b>
3.1	Geräte.....	16
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	17
3.3	Reagenzien.....	17
3.4	Antikörper.....	19
3.5	Primer.....	20
3.6	Kits.....	21
3.7	Zelllinien und primäre Zellen.....	21
3.8	Puffer und Medien.....	22
3.9	Untersuchungsmaterial.....	24

<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>27</b>
4.1	Zellisolation .....	27
4.1.1	Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) .....	27
4.1.2	Isolation von natürlichen Killerzellen aus PBMC .....	27
4.1.3	Isolation von Lymphozyten aus Leberresektaten.....	28
4.2	Zellkultur.....	29
4.2.1	Kulturbedingungen bei Normoxie und Hypoxie .....	29
4.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	30
4.2.3	Passagieren von Zellen .....	31
4.2.4	Bestimmung der Zellzahl .....	31
4.2.5	Stimulation mit Zytokinen .....	31
4.3	Durchflusszytometrie.....	31
4.3.1	Oberflächenfärbungen.....	32
4.3.2	Intrazellulärfärbungen.....	32
4.3.3	Degranulationsassay (CD107a).....	33
4.3.4	Apoptoseassay .....	34
4.3.5	Hypoxienachweis in der Zelle durch Pimonidazol.....	35
4.4	Assay zur Bestimmung der Virusreplikation .....	35
4.5	Western Blot.....	36
4.5.1	Proteinextraktion aus Zellkernen .....	36
4.5.2	Proteinbestimmung mittels Spektrophotometer .....	37
4.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
4.5.4	Semi-Dry-Blot .....	38
4.5.5	Proteindetektion.....	38
4.6	Molekularbiologische Methoden .....	39
4.6.1	RNA-Isolation aus Zellen.....	39
4.6.2	Reverse Transkription .....	39
4.6.3	Quantitative PCR.....	39

4.7	Statistische Methoden .....	40
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>41</b>
5.1	Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HCV-Infektion .....	42
5.1.1	Der Einfluss von Hypoxie auf die antivirale Aktivität von gesunden NK-Zellen.....	42
5.1.2	Der Einfluss von Hypoxie auf die antivirale Aktivität von NK-Zellen von HCV-Patienten .....	47
5.1.3	Die IFN $\gamma$ -Produktion gesunder und HCV-NK-Zellen unter Hypoxie .....	48
5.1.4	Die Expression aktivierender NK-Zellrezeptoren unter Hypoxie .....	52
5.1.5	Die Auswirkung von niedrigen Sauerstoffkonzentrationen auf intrahepatische NK-Zellen .....	55
5.1.6	Die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$ in NK-Zellen von Gesunden und HCV-Patienten .....	57
5.1.7	Die Expression von Glykolyse-Genen in NK-Zellen bei Hypoxie .....	59
5.1.8	Der Einfluss von Hypoxie auf die antifibrotische Aktivität von NK-Zellen..	60
5.2	Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HIV-Infektion .....	64
5.2.1	Die IFN $\gamma$ -Produktion bei NK-Zellen von HIV-Patienten bei Hypoxie .....	64
5.2.2	Die zytotoxische Aktivität von HIV-NK-Zellen bei Hypoxie .....	65
5.2.3	Die NK-Zellrezeptorexpression auf HIV-NK-Zellen bei Hypoxie .....	66
5.2.4	Die Expression von Glykolyse-Genen in HIV-NK-Zellen bei Hypoxie.....	68
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>70</b>
6.1	Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HCV-Infektion .....	70
6.2	Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen in der HIV-Infektion .....	79
6.3	Schlussfolgerung und Fazit .....	82
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>85</b>
7.1	Literaturverzeichnis .....	85
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	93
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	95

7.4 Veröffentlichungen .....	98
Eidesstattliche Erklärung.....	101

---

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen als wichtiger Bestandteil des innate Immunsystems eine zentrale Rolle bei Viruserkrankungen, so auch der Hepatitis C Virus (HCV)- und der Humanes Immundefizienzvirus (HIV)-Infektion. Ihre antiviralen Eigenschaften üben sie durch die Sekretion von Zytokinen, die die Virusreplikation hemmen, sowie durch das Abtöten virusinfizierter Zellen aus. Des Weiteren können sie bei der HCV-Infektion aktivierte hepatische Sternzellen abtöten und so die Fibrogenese hemmen.

Alle Studien, die bisher über NK-Zellen bei der HCV- oder der HIV-Infektion veröffentlicht wurden, wurden bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen durchgeführt. Im Körper herrschen jedoch niedrigere Sauerstoffkonzentrationen vor. So geht man z.B. in Milz und Lymphknoten von 2 bis 5% O<sub>2</sub> und in der Leber von durchschnittlich 5% O<sub>2</sub> aus. Bei einer Entzündung kann die Konzentration weiter verringert sein. Da der primäre Wirkungsort der NK-Zellen bei der HCV-Infektion die Leber bzw. bei der HIV-Infektion die sekundären lymphatischen Organe ist, sind Untersuchungsbedingungen von 20% O<sub>2</sub> vermutlich als hyperoxisch und damit unphysiologisch zu bewerten.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, inwieweit physiologische Sauerstoffbedingungen einen Einfluss auf die NK-Zellaktivität bei der HCV- (erster Teil der Arbeit) und bei der HIV-Infektion (zweiter Teil) besitzen.

Im ersten Teil der Arbeit zeigte sich, dass die antivirale Aktivität von NK-Zellen von HCV-Patienten im Gegensatz zu der von Gesunden bereits bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen (5% O<sub>2</sub>) gehemmt wurde. Bei simulierten Entzündungsbedingungen (1% O<sub>2</sub>) sank die antivirale Aktivität weiter. Dies war begleitet von einer verminderten IFN $\gamma$ -Sekretion und einer verringerten Expression der NK-Zellrezeptoren Nkp46 und NKG2D. Intrahepatische NK-Zellen von HCV-Patienten zeigten ähnliche Eigenschaften. Nach Inkubation in Hypoxie zeigten HCV-NK-Zellen eine nur schwache Hochregulation von Glykolysegenen im Vergleich zu gesunden NK-Zellen. Diese nicht ausreichende metabolische Anpassung an sauerstoffarme Bedingungen könnte eine Ursache für die stärkere Empfindlichkeit der antiviralen Aktivität von HCV-NK-Zellen gegenüber Hypoxie sein. Somit könnte das Mikromilieu

der Leber, das im Laufe der Infektion entzündungsbedingt immer sauerstoffärmer wird, und die dadurch verursachte NK-Zellhemmung für die hohe Chronifizierungsrate in der HCV-Erkrankung mitverantwortlich sein.

Interessanterweise war – im Gegensatz zur antiviralen Aktivität – die antifibrotische NK-Zellaktivität weder bei Gesunden noch bei HCV-Patienten durch Hypoxie verändert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HIV-Infektion untersucht. Die HIV-NK-Zellen wiesen im Vergleich zu gesunden Zellen nach Inkubation in Hypoxie eine verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKp46 und NKG2D auf. Die IFN $\gamma$ -Produktion hingegen war sowohl bei Gesunden wie auch bei HIV-Patienten verringert. Ausschließlich bei HIV-Patienten ohne Therapie zeigte sich eine verminderte Fähigkeit zur metabolischen Anpassung während der Inkubation in Hypoxie. Da die hypoxiebedingten funktionellen Einschränkungen jedoch nicht nur diese Patientengruppe betrafen, ist die nicht ausreichende Hochregulation der Glykolyse vermutlich nicht die alleinige Ursache für diese. Um ein tieferes Verständnis über den Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen in der HIV-Infektion zu gewinnen, sind also noch weitere Untersuchungen nötig.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen über den Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HCV- und der HIV-Infektion zeigen, dass die Sauerstoffkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf zahlreiche NK-Zell-Funktionen ausübt. In zukünftigen Arbeiten sollte diese stärker als bisher bei der Planung von Versuchsaufbauten berücksichtigt werden, um die Fehlinterpretation von Ergebnissen durch eine unphysiologische Umgebung zu verhindern.



---

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Die Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein RNA-Virus, welches Hepatozyten infiziert und eine Leberentzündung hervorrufen kann. Es wurde 1989 erstmals im Plasma eines Patienten identifiziert<sup>1</sup>. Zuvor war die unbekannte Form der Hepatitis als „virale Non-A-non-B-Hepatitis“ bezeichnet worden, da für diese beiden Viren bereits diagnostische Tests zur Verfügung standen. Weltweit sind ca. 130 bis 150 Millionen Menschen mit HCV infiziert<sup>2</sup>.

#### 2.1.1 Krankheitsverlauf und Therapie

Die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus erfolgt hauptsächlich über direkten Blutkontakt. So sind oder waren viele Patienten Nutzer von intravenösen Drogen. Die Transfusion kontaminierter Blutkonserven spielt heute in den Industrieländern eine untergeordnete Rolle, da routinemäßig auf HCV getestet wird. Selten kommt auch die Übertragung durch ungeschützten Geschlechtsverkehr vor.

Die Infektion verläuft zunächst meist asymptomatisch; nach zwei bis drei Monaten erfolgt in den meisten Fällen eine leichte Leberentzündung. Bei ca. 15 bis 45% der akut infizierten Personen heilt die Infektion spontan aus, die restlichen 55 bis 85% entwickeln eine chronische Infektion.

Die chronische HCV-Infektion ist von einer Leberfibrose begleitet, die nach 10 Jahren bei 20% der Patienten zu einer Zirrhose führt. 1 - 5% der Patienten mit einer Zirrhose entwickeln ein hepatozelluläres Karzinom<sup>3</sup>. Die chronische Hepatitis C stellt die häufigste Ursache für eine Lebertransplantation dar.

Die Therapie der chronischen HCV-Infektion unterliegt zurzeit wichtigen Veränderungen. Bis vor wenigen Jahren bestand die Standardtherapie aus Interferon  $\alpha$  in Kombination mit Ribavirin, einem Nukleosid-Analogen. Abhängig vom Genotyp des Virus führt diese Therapie jedoch nur bei etwa der Hälfte der Patienten (Genotyp 1 und 4) bzw. bei 60-70% (Genotyp 2 und 3) zu einer Ausheilung. Die neuen Therapien mit *direct antiviral agents* (DAA), die direkt bestimmte Virusproteine hemmen, zeichnen sich durch ein sehr gutes virologisches Ansprechen und geringe Nebenwirkungen aus<sup>2</sup>. Jedoch sind diese Medikamente

---

noch sehr teuer und kommen daher – vor allem in Entwicklungs- und Schwellenländern – nicht allen Patienten zugute.

### **2.1.2 Virusaufbau und Replikation**

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in Plusstrangorientierung und wird in die Familie der Flaviviridae eingeordnet. Es stellt die eigenständige Gattung Hepacivirus dar<sup>4</sup>. Aufgrund ihrer hohen genetischen Variabilität werden die Hepatitis-C-Viren in sechs Genotypen mit wiederum über 30 Subtypen eingeteilt<sup>5</sup>.

Die Viruspartikel sind behüllt und haben einen Durchmesser von 40 – 50 nm. Das Genom ist ca. 9,4 kb groß und kodiert für ein ca. 3000 Aminosäuren großes Polyprotein.

Bei der endozytotischen Aufnahme des infektiösen Viruspartikels in den Hepatozyten spielen u.a. Scavenger-Rezeptoren, CD81, Claudin-1 und LDL-Rezeptoren eine Rolle<sup>6-9</sup>. Nach Ansäuerung des Endosoms verschmilzt die Virusmembran mit der Endosomenmembran und das Kapsid wird ins Zytosol entlassen<sup>10</sup>.

Das Virusgenom kann auf Grund seiner Plusstrangorientierung sofort als mRNA dienen und nutzt dafür die Translationsmaschinerie der Zelle<sup>11</sup>. Das entstandene Polyprotein wird in diverse Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten, u.a. die RNA-Polymerase NS5B, welche das virale Genom repliziert. Die gebildeten Negativstränge dienen wiederum als Matrizen für die Synthese von Positivsträngen, welche für die weitere Translation sowie als genomische RNA für die Verpackung neuer Viruspartikel benötigt werden.

Die Morphogenese neuer Virionen geschieht durch die Anlagerung genomischer RNA an die viralen Strukturproteine in der ER-Membran, worauf sich ein Viruspartikel in das ER hinein abschnürt. Dieser wird während seines Transports durch den Golgi-Apparat noch modifiziert und durch Exozytose freigesetzt<sup>11</sup>.

## **2.2 Die Humanes Immundefizienzvirus (HIV)-Infektion**

Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) ist ein RNA-Virus, welches Makrophagen, dendritische Zellen und im weiteren Verlauf CD4<sup>+</sup> T-Zellen infiziert und so eine Immunschwäche hervorruft. Es wurde 1983 erstmals aus Lymphozyten von AIDS-Patienten isoliert und wird seit 1986 als HIV bezeichnet<sup>12</sup>. Weltweit sind ca. 37

---

Millionen Menschen mit HIV infiziert, davon ca. 26 Millionen im subsaharischen Afrika<sup>13</sup>.

### 2.2.1 Krankheitsverlauf und Therapie

Die Infektion mit HIV erfolgt über den Kontakt mit infiziertem Blut sowie über Samen- und Vaginalflüssigkeit. Außerdem kann eine vertikale Übertragung von der Mutter aufs Kind bei der Geburt oder über die Muttermilch erfolgen. In Europa gehören vorrangig homosexuelle Männer, Personen mit häufig wechselnden Geschlechtspartnern und Nutzer von intravenösen Drogen zu den Patienten<sup>13</sup>.

Die Primärinfektion verläuft häufig inapparent oder wird von grippeähnlichen Symptomen begleitet. Diese Phase ist durch eine hohe Viruslast und niedrige CD4-T-Zellzahlen gekennzeichnet. Nach ca. sechs Monaten geht die Infektion in eine oft viele Jahre dauernde Latenzphase (chronische Infektion) über. Die Anzahl der CD4<sup>+</sup> Zellen wird durch die Neubildung aus dem Knochenmark lange relativ konstant gehalten und sinkt nur langsam ab. Die Immunantwort führt dazu, dass virusinfizierte Zellen eliminiert werden und so bleibt die Viruslast in einem niedrigen Bereich. Während dieser Zeit sind die Patienten symptomfrei<sup>14,15</sup>.

In der dritten Phase der Infektion nimmt die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen rapide ab und die Viruslast steigt. Die Patienten bekommen häufig Lymphadenopathien, bei weiterem Fortschreiten kommen auch Fieber und Gewichtsverlust hinzu. Das Endstadium der HIV-Erkrankung, AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), ist durch zahlreiche opportunistische Infektionen und das Auftreten von Tumoren gekennzeichnet, die aufgrund der verminderten Anzahl von immunkompetenten Zellen nicht mehr bekämpft werden können. Dazu zählen z.B. Herpes zoster, das Kaposi-Sarkom, ein malignes Lymphom, Tuberkulose oder Pneumonien<sup>11</sup>.

Heute gibt es gut verträgliche und hochwirksame Therapien gegen HIV, die als Ziel zwar nicht die Heilung, aber die Kontrolle der Virusreplikation haben und mit denen die Patienten relativ beschwerdefrei leben können. Die cART (*combined antiretroviral therapy*) stellt eine Kombination aus diversen antiviralen Medikamenten dar, die u.a. die Fusion von Viruspartikel und Zelle, die Reverse Transkriptase, die Integrase oder die Protease des Virus hemmen. So kann eine Progression zu AIDS in vielen Fällen verhindert werden<sup>16</sup>.

---

### 2.2.2 Virusaufbau und Replikation

Das HI-Virus besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom und wird in die Familie der Retroviridae, Gattung Lentivirus eingeordnet. Die HI-Viren werden aufgrund ihrer genetischen Variabilität in drei Gruppen mit diversen Subtypen unterteilt<sup>17</sup>.

Die Viruspartikel sind behüllt und haben einen Durchmesser von 100 nm. Das Genom ist ca. 9,2 kb groß und liegt in zwei Kopien im Kapsid vor.

Der Eintritt des Viruspartikels in die Zelle geschieht über die Interaktion eines viralen Proteins mit CD4 sowie CCR5 oder CXCR4 als Korezeptor<sup>18-20</sup>. So können, je nach Tropismus der Viren, Makrophagen und dendritische Zellen (über CCR5) oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen (über CXCR4) infiziert werden. Nach Verschmelzung der Membranen und Freisetzung des Kapsids beginnt die virale Reverse Transkriptase (RT), die Virus-RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Dabei geschehen zahlreiche Mutationen, da die RT keinen Mechanismus zur Überprüfung der Lesegenauigkeit besitzt. Dies wiederum führt zu der hohen genetischen Variabilität, welche eine adaptive Immunantwort sowie die Entwicklung von Impfstoffen so schwierig macht.

Lentiviren sind die einzigen Retroviren, die auch ruhende Zellen infizieren können, da sie einen Mechanismus zur Durchquerung der Kernmembran besitzen. Die entstandene dsDNA wird mitsamt einigen assoziierten Proteinen in den Zellkern transportiert und dort an einer willkürlichen Stelle in das Wirtsgenom integriert. Dort kann sie von der zellulären Transkriptionsmaschinerie abgelesen werden. Die entstandene RNA wird im Zytoplasma zu den diversen viralen Proteinen translatiert. An der Membran des ER und der Zytoplasmamembran entstehen dann durch Anlagerung der Proteine sowie Ausbildung des Kapsids neue Viruspartikel. In CD4<sup>+</sup> T-Zellen können unbehüllte Kapside auch über die Membranverschmelzung zweier Zellen weitergegeben werden<sup>11</sup>.

### 2.3 Natürliche Killerzellen

Um sich vor Pathogenen aus der Umwelt zu schützen, besitzen höhere Lebewesen ein komplexes Immunsystem, welches der Erkennung und Eliminierung von Krankheitserregern dient.

Man unterscheidet zwischen dem angeborenen (innaten) Immunsystem, welches konservierte Regionen auf Pathogenen unspezifisch erkennen und sofort wirken kann, sowie dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem, das sich im Rahmen einer

Immunantwort an spezifische pathogene Strukturen anpassen kann und hocheffektive Abwehrmechanismen auslöst.

Ein wichtiger Bestandteil des innaten Immunsystems sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die zu den Lymphozyten gehören. Sie entstehen über lymphoidale Vorläuferzellen aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark und sind mit einem Anteil von 5 – 15% in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) enthalten. In anderen Organen wie der Leber sind NK-Zellen mit einem größeren Anteil vertreten und stellen bis zu 50% der Lymphozyten dar<sup>21</sup>. Definiert werden NK-Zellen durch das Fehlen des T-Zellrezeptors CD3 und die gleichzeitige Expression des Adhäsionsmoleküls CD56 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). Am Durchflusszytometer lassen sich die NK-Zellen in zwei Subpopulationen einteilen, die CD56<sup>dim</sup>- und CD56<sup>high</sup>-exprimierenden NK-Zellen. Diese beiden Populationen unterscheiden sich bezüglich ihrer Funktion und ihres Reifegrads.

NK-Zellen sind in der Lage, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Dafür besitzen sie zytotoxische Granula, die Perforin und Granzym B enthalten. Nach Ausschüttung dieser Granula kann die Zellmembran einer Zielzelle mittels Perforin perforiert werden und Granzym B, eine Apoptose auslösende Serinprotease, kann in das Zytoplasma gelangen<sup>22</sup>. Um gesunde, umliegende Zellen nicht zu gefährden, wird dabei zwischen NK-Zelle und Zielzelle eine immunologische Synapse gebildet, in die hinein die Granula sezerniert werden<sup>23</sup>.

Eine weitere Möglichkeit, Apoptose in infizierten oder entarteten Zellen zu induzieren und somit zytotoxisch zu wirken, ist die Verwendung der sogenannten Todesliganden TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) und FasL (*Fas ligand*)<sup>24</sup>. Wenn diese an die entsprechenden Rezeptoren auf einer Zielzelle binden, geht die Zelle in Apoptose.

Zusätzlich zu ihren zytotoxischen Eigenschaften ist eine weitere wichtige Rolle der NK-Zellen die Produktion von Zytokinen wie z.B. Interferon (IFN)  $\gamma$  oder TNF (*tumour necrosis factor*)  $\alpha$ , welche zur Regulation des Immunsystems wichtig sind und antiviral wirken können<sup>25–28</sup>.

### 2.3.1 Die Regulationsmechanismen der NK-Zellen

Die Aktivität von NK-Zellen wird durch diverse aktivierende und inhibierende Rezeptoren präzise reguliert. So entsteht kein unnötiger Schaden an gesunden

Zellen, gleichzeitig jedoch können infizierte oder maligne Zellen erkannt und beseitigt werden.

Aktivierende Rezeptoren erkennen stressinduzierte Liganden wie z. B. MIC-A/B (*MHC class I-related chains A and B*) oder die ULBPs (*UL16 binding proteins*) auf Zellen, die entartet oder virusinfiziert sind<sup>29,30</sup>. Zu den aktivierenden Rezeptoren gehören unter anderem NKG2C und D sowie die natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors, NCR*) NKp30, NKp44, NKp46 und NKp80<sup>31–33</sup>. Bisher sind noch nicht für alle dieser aktivierenden Rezeptoren die jeweiligen Zielstrukturen identifiziert worden. Es wurde aber gezeigt, dass neben endogenen Liganden auch virale und bakterielle Strukturen an aktivierende NK-Zellrezeptoren binden können<sup>34–37</sup>. Des Weiteren exprimieren NK-Zellen den Fc-Rezeptor CD16, mit dem sie an Antikörper auf opsonisierten Zellen binden können und diese Zellen abtöten können (*antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC*)<sup>38</sup>.

Inhibierende NK-Zellrezeptoren binden an MHC I-Moleküle und vermitteln so einen Schutz für gesunde, körpereigene Zellen. Einige Viren verhindern die Expression von MHC I, um der Antigenpräsentation an T-Zellen zu entgehen (Immunevasion). Erkennen die NK-Zellen, dass bei diesen Zellen das inhibierende Signal „MHC“ fehlt, überwiegen die aktivierenden Signale und die infizierte Zelle kann getötet werden. Zu den inhibierenden NK-Zellrezeptoren zählen NKG2A sowie diverse KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptors*)<sup>31,39,40</sup>.

Zusätzlich kann die NK-Zellaktivität auch durch Zytokine wie Interferon (IFN)  $\alpha$  oder verschiedene Interleukine (IL-2, -12, -15, -18) beeinflusst werden, die positive Auswirkungen auf Proliferation, Zytotoxizität und Zytokinproduktion der NK-Zellen haben<sup>41–45</sup>.

### 2.3.2 NK-Zellen bei der HCV-Infektion

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass NK-Zellen bei der HCV-Infektion eine wichtige Rolle spielen.

So wurde beispielsweise gezeigt, dass Nutzer von intravenösen Drogen, also Personen mit einem hohen Ansteckungsrisiko, sich seltener mit HCV infizierten, wenn sie eine hohe NK-Zellaktivität aufwiesen<sup>46,47</sup>. Außerdem wurden Polymorphismen in den KIR-Genen mit einer HCV-Resistenz assoziiert<sup>48</sup>.

Aber auch in den Fällen, wo die NK-Zellen eine Infektion nicht verhindern können und es zu einer akuten HCV-Infektion kommt, scheinen sie wichtig für den Verlauf zu

sein. Bei einer akuten HCV-Infektion steigt die NK-Zell-Aktivität an<sup>49,50</sup>, was allgemein bei viralen Infektionen zu beobachten ist<sup>51</sup>. Die Fähigkeit der NK-Zellen, *in vitro* die HCV-Replikation zu hemmen, korreliert positiv mit einer spontanen Ausheilung der Infektion<sup>52</sup>. Ebenso korrelierte die Expression der aktivierenden NK-Zellrezeptoren NKp30, NKp46 und NKG2D mit dem Verlauf der Krankheit<sup>53</sup>.

Bei der chronischen Infektion wird beobachtet, dass die Anzahl der NK-Zellen sowohl im Blut als auch in der Leber im Vergleich zu Gesunden reduziert ist<sup>54-56</sup>. Die Expression der aktivierenden NK-Zellrezeptoren NKG2D und NKp46 ist bei HCV-Patienten verändert, auch wenn es teilweise widersprüchliche Daten gibt, ob sie herauf- oder herunterreguliert sind<sup>57-60</sup>. Dennoch scheinen sie bei der Hemmung der Virusreplikation eine wichtige Rolle zu spielen<sup>52,61,62</sup>. Die Erhöhung der Expression des inhibierenden Rezeptors NKG2A wurde in mehreren Studien übereinstimmend gezeigt und könnte eine Ursache der unzureichenden Immunantwort gegenüber virusinfizierten Zellen sein<sup>56,57,59</sup>.

Funktionell sind NK-Zellen bei der chronischen HCV-Infektion ebenfalls verändert. Unterschiedliche Gruppen berichten über eine leicht verminderte, gleich bleibende oder gesteigerte Zytotoxizität<sup>55,63-65</sup>, wohingegen die Zytokinproduktion übereinstimmend als vermindert angesehen wird<sup>65-67</sup>. Diese Daten befürworten das Modell einer Polarisierung der NK-Funktion von der IFN $\gamma$ -Produktion hin zu einem eher zytotoxischen Charakter. Da IFN $\gamma$  von zentraler Bedeutung für die Hemmung der Virusreplikation ist, kann dies auch zu der unzureichenden antiviralen Immunantwort bei der HCV-Infektion beitragen. Der Kontakt von NK-Zellen mit HCV-infizierten Hepatozyten *in vitro* führte ebenfalls sowohl zu einer funktionellen Hemmung (Zytotoxizität und Zytokinproduktion) als auch zu einer Herabregulierung von den aktivierenden Rezeptoren NKG2D und NKp30, was einen Mechanismus zur Immunevasion darstellen kann<sup>68</sup>.

Neben der Erkennung infizierter Zellen, der Hemmung der Virusreplikation sowie der Elimination dieser Zellen besteht eine weitere wichtige Aufgabe von NK-Zellen in der HCV-Infektion, antifibrotisch zu wirken.

Der fibrotische Umbau der Leber während der chronischen HCV-Infektion wird durch hepatische Sternzellen (HSC) gesteuert, welche durch die Entzündung aktiviert werden und sodann große Mengen an Kollagen und Matrixmetalloproteasen sezernieren können<sup>69</sup>. Dadurch kommt es zu einem Umbau der Gewebestruktur und zu einer Anreicherung von Bindegewebe, die Leber wird mit der Zeit fibrotisch. NK-

Zellen sind in der Lage, aktivierte HSC mittels Apoptoseinduktion über TRAIL und FasL abzutöten und so der Fibroseentstehung vorzubeugen<sup>70-73</sup>. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass der Fibrosegrad bei HCV-Patienten invers mit der antifibrotischen NK-Zellaktivität korreliert<sup>73</sup>.

### 2.3.3 NK-Zellen bei der HIV-Infektion

Auch bei der HIV-Infektion zählen NK-Zellen zu den wichtigen Effektorzellen des Immunsystems. Studien an HIV-Patienten, die über lange Jahre eine sehr niedrige Viruslast sowie stabile CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahlen vorweisen (LTNP, *long term non progressors*), zeigten, dass diese Patienten höhere Spiegel an ADCC-relevanten Antikörpern besaßen als Patienten, deren Krankheit einen normalen Verlauf nahm<sup>74,75</sup>. Die Expression bestimmter Varianten inhibitorischer NK-Zellrezeptoren ist assoziiert mit einer langsameren Progression zu AIDS<sup>76</sup> sowie mit einem verringerten Risiko, sich mit HIV zu infizieren<sup>77</sup>. In der Tat können NK-Zellen mit diesen Rezeptoren auch *in vitro* die HIV-Replikation effektiv hemmen<sup>78</sup>. NK-Zellen scheinen also unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage zu sein, die HIV-Infektion zu eliminieren oder in Schach zu halten.

Nichtsdestotrotz gelingt es dem HI-Virus bei der Mehrzahl der Infektionen, den NK-Zellen durch Mechanismen der Immunevasion zu entgehen. Hier ist zunächst die besonders hohe Mutationsrate der viralen Reversen Transkriptase zu nennen, die zu einer schnellen Veränderung der viralen Proteine führt und so eine Opsonisierung durch Antikörper erschwert. Dies jedoch ist die Voraussetzung für eine effektive ADCC der NK-Zellen. Außerdem induziert HIV auf infizierten Zellen eine Abspaltung von löslichem CD16, was zu einer kompetitiven Bindung an die opsonisierenden Antikörper führt und so ebenfalls die ADCC verhindert<sup>79</sup>. Das virale Protein Nef hingegen kann eine Herabregulierung der NKG2D-Liganden MIC und ULBP verursachen, so dass die Erkennung über diesen aktivierenden Rezeptor gestört wird<sup>80</sup>. Außerdem ist Nef in der Lage, selektiv bestimmte MHC-Moleküle herauf- und andere herunterzuregulieren<sup>81</sup>. So entkommen virusinfizierte Zellen der Eliminierung durch zytotoxische T-Lymphozyten und aktivieren dennoch nicht NK-Zellen über die fehlende Bindung an inhibitorische Rezeptoren.

Bei der chronischen Infektion sind außerdem Phänotyp und Funktion der NK-Zellen verändert. Bei virämischen HIV-Patienten findet sich häufig eine verringerte Anzahl CD56<sup>+</sup> NK-Zellen sowie eine dysfunktionale CD56<sup>-</sup> NK-Zellpopulation<sup>82,83</sup>. Diese



Zellen zeigen eine verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46, sind weniger zytotoxisch und produzieren weniger IFN $\gamma$  als CD56<sup>+</sup> Zellen<sup>83–86</sup>. Die Expression von NKG2D wird nicht verändert<sup>85</sup>.

Zuletzt kommt den NK-Zellen eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese zu. HIV induziert die Expression von NKp44L (NKp44-Ligand) auf infizierten und vor allem auch auf nicht-infizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>37</sup>. Dies geschieht durch die Interaktion des viralen Oberflächenproteins gp41 mit einem Komplementrezeptor, woraufhin NKp44L auf die Zelloberfläche gebracht wird<sup>87</sup>. Die NK-Zellen können so mit dem aktivierenden NKp44-Rezeptor an die T-Zelle binden und diese lysieren. Dies trägt wesentlich zu der bei HIV auftretenden CD4-T-Zell-Depletion bei.

## 2.4 Hypoxie als physiologischer Zustand

Sauerstoff ist eine wichtige Energiequelle für die meisten Lebewesen. Aus ihm kann in der Zelle im Zusammenspiel mit anderen Metaboliten wie Pyruvat Adenosintriphosphat (ATP) hergestellt werden, welches als universeller Energieträger im Zellstoffwechsel fungiert. Da Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) jedoch auch toxisch für Zellen sind, muss die Konzentration im Gewebe genau reguliert werden.

Während die Atemluft noch 21% O<sub>2</sub> enthält, befindet sich in den Alveolen der Lunge nur noch 15%. Im arteriellen Blut, welches den Sauerstoff an Hämoglobin gebunden ins Gewebe transportiert, liegt die O<sub>2</sub>-Konzentration bei 13%. Nach dem Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen in den Kapillaren enthält das venöse Blut nur noch rund 5% O<sub>2</sub><sup>88</sup>.

Auch in den diversen Organen und Geweben liegen unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen vor. Im Gegensatz zur Blutanalyse ist die Konzentration im Gewebe jedoch nicht leicht zu quantifizieren. Die meisten Daten beruhen auf Messungen mit polarographischen Elektroden. Dabei wird an eine Elektrode aus Edelmetall eine negative Spannung angelegt, woraufhin im Gewebe vorhandener Sauerstoff oxidiert wird. Anhand der gemessenen Spannungsdifferenz kann die Sauerstoffkonzentration ermittelt werden<sup>89,90</sup>. Da die Elektrode Sauerstoff verbraucht, kann allerdings keine Messung über eine längere Zeitspanne durchgeführt werden. Eine alternative Methode, die dieses Problem umgeht, ist eine Messung mit einer Sonde, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rutheniumchlorid beschichtet ist<sup>91,92</sup>. In der

Anwesenheit von Sauerstoff wird die Fluoreszenz gehemmt (*quenching*) und das Fluoreszenzsignal wird mittels Glasfaser zu einem Analysegerät übertragen.

Eine nicht-invasive Methode stellt die Zwei-Photonen-Anregung von Pd-Porphyrin dar, bei der die Phosphoreszenz des angeregten Porphyrins durch Sauerstoff gequencht wird<sup>93</sup>. Allerdings ist hier die Analysetiefe auf ca. 2,2 mm begrenzt. Außerdem muss vor der Messung Pd-Porphyrin in den Organismus eingebracht werden, was die Anwendung auf Tierversuche beschränkt.

Trotz der genannten Einschränkungen der verschiedenen Methoden gibt es zahlreiche Arbeiten, die die Sauerstoffkonzentration in diversen Organen beim Menschen oder in Versuchstieren untersucht haben. In sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten, der Milz oder den Peyer-Plaques im Darm findet man beispielsweise O<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 2 und 5%<sup>94–97</sup>. In der Leber wird von einer durchschnittlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 5% ausgegangen, wobei die Konzentration in der Nähe der Zentralvene als niedriger (ca. 1,3%) und in der Nähe der Pfortader als höher eingeschätzt wird (ca. 8%)<sup>98–101</sup>.

Bei bestimmten pathologischen Konditionen wie einer Entzündung oder einem fibrotischen Umbau der Leber sinkt die Sauerstoffkonzentration ab und es kommt zu einer hypoxischen Umgebung für die Zellen<sup>102–105</sup>.

#### **2.4.1 Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen**

Trotz der nachgewiesenen geringen physiologischen Sauerstoffkonzentrationen im Körper werden die meisten experimentellen Studien in der Biologie aus praktischen Gründen bei (fast) atmosphärischen Sauerstoffbedingungen durchgeführt. Ein normaler Inkubator enthält ein Gemisch aus 95% Raumluft (mit 21% O<sub>2</sub>) sowie 5% CO<sub>2</sub>, daraus ergibt sich eine Konzentration von 20% O<sub>2</sub>, der die Zellen im Normalfall ausgesetzt sind.

Es existieren bisher nur wenige Studien, die sich mit dem direkten Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen beschäftigt haben. Dies ist überraschend, da NK-Zellen vor allem in Zusammenhang mit der Erkennung von Tumorzellen untersucht werden und eine bekannte Eigenschaft von Tumoren die hypoxische Umgebung ist<sup>106</sup>.

In den existierenden Studien wird gezeigt, dass verschiedene Funktionen der NK-Zellen bei Kultivierung in Hypoxie eingeschränkt sind. So berichten drei Gruppen von einer verringerten Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Leberzelllinien<sup>107</sup>, Myelomzellen<sup>108</sup> und Melanomzellen<sup>109</sup>. Andere Gruppen beobachteten hingegen

---

keine Veränderung der Zytotoxizität<sup>110</sup> bzw. sogar eine Steigerung<sup>111</sup>, wobei hier wiederum andere Zielzellen verwendet wurden. Zudem wurde gezeigt, dass Hypoxie bei NK-Zellen zu einer Herunterregulation von NKG2D und einigen NCR führt<sup>108,109</sup>.

Sämtliche Studien beschäftigten sich ausschließlich mit der anti-Tumoraktivität der NK-Zellen, während die antivirale Aktivität bei Hypoxie bislang noch nicht untersucht wurde.

#### **2.4.2 Metabolische Veränderungen bei Hypoxie**

Zellen müssen sich auf ihre Umgebung und die zur Verfügung stehenden Nährstoffe differenziert einstellen können, um ihren Energiebedarf optimal decken zu können.

Unter aeroben Bedingungen wird aus Glukose Pyruvat gebildet (Glykolyse), welches anschließend zu Acetyl-Coenzym A umgewandelt wird. Dieses wird in den Citratzyklus eingespeist und kann über diverse Reaktionsschritte in der Atmungskette der Mitochondrien zu CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und ATP umgewandelt werden, dem Energieträger des Stoffwechsels. Diese Form der Energiegewinnung ist hocheffizient, es entstehen pro mol Glukose 30 mol ATP.

Unter anaeroben Bedingungen wird nach wie vor Pyruvat aus Glukose gebildet, weil dafür kein Sauerstoff nötig ist. Die anschließenden Schritte können allerdings ohne Sauerstoff nicht durchgeführt werden. Ein alternativer, anaerober Weg der Energiegewinnung ist der weitere Umbau von Pyruvat zu Lactat und ATP (Milchsäuregärung). Dieser Weg ist jedoch weitaus ineffizienter als die Atmungskette, es entstehen pro mol Glukose nur 2 mol ATP.

Unter aeroben Bedingungen wird deshalb immer der Weg über die Atmungskette bevorzugt.

Steht nun kein Sauerstoff zur Verfügung, muss die Zelle die Glykolyse stark hochregulieren, um ihren ATP-Bedarf weiterhin decken zu können. Dies wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) vermittelt<sup>112</sup>. HIF-1 $\alpha$  wird konstitutiv exprimiert, bei Anwesenheit von Sauerstoff jedoch sofort ubiquityliert und degradiert<sup>113,114</sup>. Unter hypoxischen Bedingungen kann HIF-1 $\alpha$  an HIF-1 $\beta$  binden, in den Zellkern wandern und dort unter anderem Gene für die Glykolyse anschalten. Dabei sind neben vielen anderen vor allem TPI-1 (Triosephosphatisomerase 1), PDK-1 (Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1) und PFKFB3 (Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase) zu nennen<sup>115-117</sup>.

TPI-1 isomerisiert Glycerinaldehydphosphat und Dihydroxyacetonphosphat und ist damit ein wichtiger Regulator in der Glykolyse. PDK-1 inaktiviert das Enzym, welches den aeroben Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert, so dass weiterhin genug Pyruvat für den anaeroben Weg zur Verfügung steht. PFKFB3 stellt einen wichtigen Regulator der Phosphofruktokinase dar, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse katalysiert.

Durch die Hochregulation dieser für die Glykolyse wichtigen Gene sind die Zellen in der Lage, sich an den Umwelteinfluss Hypoxie anzupassen, ohne ihre Funktionalität einschränken zu müssen.

## 2.5 Zielsetzung

Natürliche Killerzellen sind wichtige Effektoren des innaten Immunsystems. Dabei spielen sie unter anderem in der Viruserkennung und -eliminierung eine bedeutende Rolle. Es wurde gezeigt, dass sie sowohl bei der HCV- als auch bei der HIV-Infektion einen wesentlichen Einfluss auf die Abwehr der Infektion, den Verlauf der Krankheit sowie die Kontrolle der Virusreplikation besitzen. Darüber hinaus sind sie wesentlich an der Kontrolle einer Leberfibrose beteiligt.

Der Ort, an dem die NK-Zellen ihre antiviralen Aufgaben erfüllen, ist bei der HCV-Infektion die Leber und bei der HIV-Infektion die sekundären lymphatischen Organe. Dabei beeinflusst das Mikromilieu in diesen Organen die NK-Zellen. Neben löslichen Faktoren und Signalen von umliegenden Zellen spielt auch die Sauerstoffkonzentration eine wesentliche Rolle. Diese liegt in der Leber bei 5% und in den sekundären lymphatischen Organen bei 2 - 5% und ist somit beträchtlich niedriger als die Sauerstoffkonzentration in der Luft.

Trotz dieser Tatsache wurden sämtliche bisherigen Studien über die Rolle der NK-Zellen in der HCV- und der HIV-Infektion bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen durchgeführt.

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und inwiefern niedrige Sauerstoffkonzentrationen einen Einfluss auf die Funktion von NK-Zellen haben.

Um die Rolle der Hypoxie bei der HCV-Infektion zu beleuchten, sollte in Koinkubationsexperimenten mit einer Leberzelllinie die IFN $\gamma$ -Produktion der NK-Zellen, deren Zytotoxizität sowie die Hemmung der Virusreplikation untersucht

---

werden. Des Weiteren sollte in Kokulturen mit hepatischen Sternzellen das antifibrotische Potenzial der NK-Zellen untersucht werden.

Außerdem sollte der Einfluss von Hypoxie auf die NK-Zellaktivität bei der HIV-Infektion analysiert werden. Dazu sollten Koinkubationsversuche mit der hämatopoietischen Zelllinie K562 durchgeführt werden, bei denen die Zytokinsekretion, die Zytotoxizität sowie die phänotypischen Veränderungen der NK-Zellen bestimmt werden sollten.

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug	Renggli AG, Rotkreuz, Schweiz
CO <sub>2</sub> -Inkubator Forma	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Durchfluss-Sensor	Billups-Rothenberg, Inc., Del Mar, CA, USA
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierbox Mr. Frosty	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Envision 2104 Multilabel reader	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA
Handzähler Clickmaster 3000	Behr Labortechnik, Düsseldorf
Hypoxie-Kammer „Modular Incubator Chamber“	Billups-Rothenberg, Inc., Del Mar, CA, USA
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Lichtmikroskop DM IL	Leitz, Wetzlar
Lightcycler®	Roche, Basel, Schweiz
Magnet Easy Sep	Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich
Mikroplatten-Schüttler	VWR, Darmstadt
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik Ltd., Lancing, United Kingdom
pH-Meter Portamess 911	Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin
Pipetten (1000, 200, 100, 10 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sicherheitswerkbank Gelaire	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Trans-Blot® SD semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Waage Navigator™	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Zellsorter FACSAria™ III	BD Biosciences, Heidelberg

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Auslaufpipetten Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einfrierröhrchen CryoPure	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Filtereinheiten Nalgene®	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
FACS-Röhrchen 5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Kapillaren Lightcycler	Roche, Basel, Schweiz
Luminunc™ 96-Well-Platte	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Nitril-Handschuhe	Bioworld Medical AG, Meggen, Schweiz
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen Ultratip (1000, 200, 10 µL)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen Cellstar® (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten Cellstar® (6, 12, 24, 48, 96 Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen Cellstar® (50, 15 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 3.3 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Accutase®	Biologend, San Diego, CA, USA
AceGlow™ Chemilumineszenzsubstrat	Peqlab, Erlangen
Acrylamid/Bis 29:1, 40%	Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Benzonase / HS-Nuclease	MoBiTec, Göttingen
Blasticidin	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Brefeldin A (BFA)	Enzo Life Sciences, Lörrach
Cobaltchlorid (CoCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM Zellkulturmedium	Gibco Life Technologies, Darmstadt

Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötiales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin
G418-BC	Biochrom GmbH, Berlin
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
GolgiStop™	BD Biosciences, Heidelberg
Interferon (IFN)- $\alpha$ 1b rekombinant	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Interferon (IFN)- $\gamma$ rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Interleukin (IL)-2 rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagenase, Typ 2	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Maxima SYBR® Green ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumfluorid (NaF)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumvanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom GmbH, Berlin
Nitrocellulose-Blottingmembran	Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA
Nonidet® P-40	AppliChem GmbH, Darmstadt
PageRuler Prestained Protein Ladder	Life Technologies
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
PBS Tabletten	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphataseinhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteaseinhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI-1640 Zellkulturmedium Hyclone™	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Sample Buffer Laemmli 2x	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Steady-Glo® Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI, USA



Stellate Cell Medium mit Zusätzen	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trennlösung Easycoll (wie Percoll)	Biochrom GmbH, Berlin
Trennlösung Pancoll (wie Ficoll)	Pancoll Biotech, Aidenbach
Tris	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-Base	Avantor, Center Valley, PA, USA
Tris-HCl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt

### 3.4 Antikörper

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller
Active Caspase-3	Kaninchen IgG	PE	C92-605.1	BD Biosciences, Heidelberg
CD107a	Maus IgG1	PE	H4A3	BD Biosciences, Heidelberg
CD122	Maus IgG1	PE	TU27	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD25	Maus IgG1	FITC	2A3	BD Biosciences, Heidelberg
CD3	Maus IgG1	PerCP	UCHT1	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD56	Maus IgG1	APC	HCD56	Biolegend, San Diego, CA, USA
DNAM-1	Maus IgG1	PE	11A8	Biolegend, San Diego, CA, USA
FasL	Maus IgG1	PE	NOK-1	Biolegend, San Diego, CA, USA
HDAC-1	Kaninchen IgG	unkonjugiert	polyklonal	Biolegend, San Diego, CA, USA
HIF-1 $\alpha$	Kaninchen IgG	unkonjugiert	polyklonal	Novus Biologicals, Abingdon, UK
HIF-1 $\alpha$	Maus IgG2b	PE	546-16	Biolegend, San Diego, CA, USA

HLA-ABC	Maus IgG1	FITC	G46-2.6	BD Biosciences, Heidelberg
HLA-E	Maus IgG1	PE	3D12	Biolegend, San Diego, CA, USA
IFN $\gamma$	Maus IgG2b	PE	25723	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
MIC-A/B	Maus IgG2a	PE	159207	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
NKG2D	Maus IgG1	PE	149810	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
NKp46	Maus IgG2b	FITC	195314	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
pSTAT1	Maus IgG1	PE	4a	BD Biosciences, Heidelberg
pSTAT4	Maus IgG2b	AlexaFluor488	38/p-Stat4	BD Biosciences, Heidelberg
STAT1	Maus IgG1	PE	1/Stat1	BD Biosciences, Heidelberg
STAT4	Maus IgG1	unkonjugiert	Ab57822	Abcam, Cambridge, UK
TRAIL	Maus IgG1	PE	RIK-2	Biolegend, San Diego, CA, USA
ULBP-1	Maus IgG2a	APC	170818	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
ULBP-2/5/6	Maus IgG2a	PE	165903	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
ULBP-3	Maus IgG2a	APC	166510	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

### 3.5 Primer

Sämtliche Primer wurden über Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien, bezogen.

Name	Sequenz
$\beta$ -Actin forward	5'-TGGCATCGTGATGGACTCC-3'
$\beta$ -Actin reverse	5'-AATGTCACGCACGATTTCCC-3'

HIF-1 $\alpha$ forward	5'-TTCACCTGAGCCTAATAGTCC-3'
HIF-1 $\alpha$ reverse	5'-CAAGTCTAAATCTGTGTCCTG-3'
TPI-1 forward	5'-GGCGAAGTCGATATAGGCAG-3'
TPI-1 reverse	5'-AGTTCTTCGTTGGGGGAAAC-3'
PDK-1 forward	5'-GGAGGTCTCAACACGAGGTC-3'
PDK-1 reverse	5'-GTTTCATGTCACGCTGGGTAA-3'
PFKFB-3 forward	5'-CAGTTGTGGCCTCCAATATC-3'
PFKFB-3 reverse	5'-GGCTTCATAGCAACTGATCC-3'

### 3.6 Kits

Kit	Hersteller
DC <sup>TM</sup> Protein Assay	Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA
EasySep <sup>TM</sup> Human NK Cell Enrichment Kit	Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich
Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Biosciences, Heidelberg
GeneJet RNA Purification Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Hypoxyprobe <sup>TM</sup> -1 Kit	Hypoxyprobe Inc., Burlington, MA, USA
QuantiTect <sup>®</sup> Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Zombie Aqua <sup>TM</sup> Fixable Viability Kit	Biologend, San Diego, CA, USA

### 3.7 Zelllinien und primäre Zellen

HuH7-A2-Replicon-Zellen      Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie, die mit HLA-A2 und Luciferase-HCV-Replicon transfiziert ist. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Volker Lohmann und Ralf Bartenschlager, Heidelberg.

hHSC      Primäre humane hepatische Sternzellen. Bezogen über ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA.

---

K562	Immortalisierte hämatopoietische Zelllinie, die aus einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie isoliert wurde und die keine MHC-Moleküle exprimiert. Bezogen über ATCC, Manassas, VA, USA.
------	--

### 3.8 Puffer und Medien

#### Medium für die Kultur von NK-Zellen oder anderen Lymphozyten und von K562:

RPMI 1640

+ 10% FCS

+ 100 U/mL Penicillin

+ 100 µg/mL Streptomycin

#### Medium für die Kultur von HuH7-A2-Replicon-Zellen:

DMEM

+ 10% FCS

+ 100 U/mL Penicillin

+ 100 µg/mL Streptomycin

+ 1% nicht-essentielle Aminosäuren

+ 1 mg/mL G418

+ 3 µg/mL Blasticidin

#### Medium für die Kultur von primären humanen hepatischen Sternzellen:

Stellate Cell Medium

+ 2% FCS

+ 1% Stellate Cell Growth Supplement

+ 100 U/mL Penicillin

+ 100 µg/mL Streptomycin

#### 10x Laufpuffer (Western Blot):

250 mM Tris-Base

1,9 M Glycin

1% SDS

---

Puffer A für Isolation des Kernextrakts (Western Blot):

10 mM Tris, pH 7,9

10 mM KCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

10% [v/v] Glycerol

10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

10 mM NaF

Vor Gebrauch hinzufügen:

0,5 mM DTT

0,5 mM PMSF

4% Proteaseinhibitor

1% Phosphataseinhibitor

Puffer B für Isolation des Kernextrakts (Western Blot):

20 mM Tris, pH 7,9

420 mM NaCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,2 mM EDTA

10% [v/v] Glycerol

10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

10 mM NaF

Vor Gebrauch hinzufügen:

0,5 mM DTT

0,5 mM PMSF

4% Proteaseinhibitor

1% Phosphataseinhibitor

Sammelgel 5% (Western Blot)

5% Acrylamid/Bis 29:1

125 mM Tris (pH 6,8)

0,1% SDS

0,01% TEMED

Trenngel 8% (Western Blot)

8% Acrylamid/Bis 29:1

375 mM Tris (pH 8,8)

0,1% SDS

0,1% APS

0,01% TEMED

Blotting-Puffer für Gel (Western Blot):

25 mM Tris-Base

190 mM Glycin

0,1% SDS

Blotting-Puffer für Nitrocellulose-Membran (Western Blot):

25 mM Tris-Base

190 mM Glycin

20% Methanol

Waschpuffer (Western Blot):

1x PBS

0,1% Tween

### 3.9 Untersuchungsmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurde Blut von Patienten mit Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion, mit Humanes Immundefizienzvirus (HIV)-Infektion sowie von gesunden Spendern untersucht. Das Blut wurde in der gastroenterologischen und der immunologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik I (Universitätsklinikum Bonn) abgenommen.

Des Weiteren wurden Leberexplantate untersucht, die im Rahmen von Lebertransplantationen an der Chirurgischen Klinik (Universitätsklinikum Bonn) entnommen wurden.

Sowohl aus dem Blut als auch aus den Leberexplantaten wurden Lymphozyten und – je nach Fragestellung – natürliche Killerzellen isoliert, mit denen die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Von allen Spendern wurde eine Einwilligung nach erfolgter Aufklärung (*informed consent*) eingeholt. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt.

Die detaillierte Aufstellung der Patienten findet sich in Tabelle 1 (HCV-Projekt) und Tabelle 2 (HIV-Projekt).

**Tabelle 1: Patientencharakteristik HCV-Projekt**

	HCV (+) Patienten (peripheres Blut)	HCV (+) Patienten (Leberresektat)	gesunde Kontrollen
Anzahl	33	6	20
weibliches Geschlecht <sup>a)</sup>	12 (36%)	1 (17%)	12 (60%)
Alter (in Jahren) <sup>b)</sup>	50,2 (21 - 77)	51,3 (37 - 65)	38,7 (27 - 75)
<b>Klinische Daten</b>			
ALT in U/L <sup>b)</sup>	70,3 (24 - 212)	42,3 (9 - 110)	n.b.
AST in U/L <sup>b)</sup>	52,4 (17 - 121)	62,8 (32 - 143)	n.b.
$\gamma$ -GT in U/L <sup>b)</sup>	120,4 (24 - 566)	120,3 (31 - 343)	n.b.
<b>HCV-Status</b>			
HCV-Viruslast (x 10 <sup>5</sup> IU/mL) <sup>b)</sup>	11,7 (0 - 42)	16,6 (0 - 33)	-
<b>HCV-Genotypen</b>			
Genotyp 1 <sup>a)</sup>	25 (76%)	4 (67%)	-
Genotyp 2 <sup>a)</sup>	-	-	-
Genotyp 3 <sup>a)</sup>	5 (15%)	1 (17%)	-
Genotyp 4 <sup>a)</sup>	2 (6%)	-	-
unbestimmter Genotyp <sup>a)</sup>	1 (3%)	1 (17%)	-

a) Anzahl (Anteil von gesamt in %); b) Mittelwert (Spanne).  
 Von einem Patienten standen sowohl peripheres Blut als auch Lebergewebe zur Verfügung.

<b>Tabelle 2: Patientencharakteristik HIV-Projekt</b>
---

	<b>HIV(+) Patienten mit cART</b>	<b>HIV (+) Patienten ohne cART</b>	<b>gesunde Kontrollen</b>
Anzahl	11	10	10
weibliches Geschlecht <sup>a)</sup>	1 (9%)	2 (20%)	4 (40%)
Alter (in Jahren) <sup>b)</sup>	47,6 (26 - 60)	45,7 (28 - 67)	40,4 (25 - 75)
<b>Klinische Daten</b>			
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen / $\mu\text{L}$ <sup>b)</sup>	698 (256 - 1035)	716 (437 - 1273)	n.b.
<b>HIV-Status</b>			
HIV-Viruslast (in Kopien/mL) <sup>b)</sup>	<40	14.452 (<40 - 46.376)	-

a) Anzahl (Anteil von gesamt in %); b) Mittelwert (Spanne)



---

## 4 METHODEN

### 4.1 Zellisolation

#### 4.1.1 Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Die Separation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte aus frischem, heparinisierem Blut nach der Methode von Böyum<sup>118</sup>. Dabei werden die Blutbestandteile mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation nach ihrer Größe und Dichte aufgetrennt.

Als Gradientenbildner wird Ficoll, ein synthetisches, stark verzweigtes Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin verwendet. Überschichtet man verdünntes, heparinisierem Vollblut auf Ficoll, erfolgt eine Aggregatbildung von Erythrozyten und Granulozyten. Diese pelletieren bei der anschließenden Zentrifugation unterhalb der Ficollschicht. Monozyten und Lymphozyten können auf Grund ihrer geringeren Dichte nicht pelletieren und sammeln sich als milchige Interphase direkt oberhalb der Ficollschicht. Im Überstand befinden sich Plasma und Thrombozyten.

Die PBMC können mit einer Pasteurpipette aus der Interphase abgenommen werden.

#### Durchführung:

- Überschichten von 35 mL verdünntem Blut auf 15 mL PBS in einem 50 mL-Falcon
- Zentrifugation bei 1000 g, 20 min, ohne Bremse
- Abnehmen der Interphase mit einer Pasteurpipette
- Waschen der PBMC mit PBS und Zentrifugation bei 500 g, 10 min
- Erneutes Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 350 g, 10 min
- Die erhaltenen PBMC wurden direkt weiterverwendet oder eingefroren.

#### 4.1.2 Isolation von natürlichen Killerzellen aus PBMC

Für die Negativselektion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) aus frischen oder eingefrorenen PBMC wurde das EasySep<sup>TM</sup> Human NK Cell Enrichment Kit von der Firma Stem Cell Technologies verwendet.

Hierbei werden alle Nicht-NK-Zellen mit bispezifischen Tetramer-Antikörper-Komplexen und Dextran-beschichteten Magnetpartikeln markiert. Nach der

---

Einbringung in ein Magnetfeld können die NK-Zellen überführt werden, während die restlichen Zellen zurückgehalten werden.

Durchführung:

- Inkubation der PBMC mit den Tetramer-Antikörper-Komplexen, 10 min bei Raumtemperatur
- Zugabe der Dextran-beschichteten Magnetpartikel und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
- Inkubation im Magneten für 2,5 min
- Überführen der isolierten NK-Zellen in ein neues Röhrchen
- Die erhaltenen NK-Zellen wurden direkt für Experimente verwendet oder eingefroren.

#### **4.1.3 Isolation von Lymphozyten aus Leberresektaten**

Die Isolation von leberständigen Lymphozyten (*liver-infiltrating lymphocytes*, LIL) aus humanen Lebern bzw. Leberresektaten erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll. Dabei handelt es sich um einen Gradientenbildner, der aus mit Polyvinylpyrrolidon beschichtetem kolloidalem Siliziumdioxid besteht.

Das im Rahmen einer Lebertransplantation entnommene Explantat wurde zunächst in kleine Stücke geschnitten, mit Kollagenase und einer Endonuclease (Benzonase) inkubiert und anschließend durch ein Metallsieb gedrückt, um die Zellen zu vereinzeln. Aus der so gewonnenen Zellsuspension wurden die LIL mittels der o.g. Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Durchführung:

- Zerschneiden des Explantats in kleine Stücke (ca. 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup>), Waschen mit PBS + 100 U/mL Heparin
- Inkubation der Stücke in RPMI mit 1 mg/mL Kollagenase 2 und 25 U/mL Benzonase für 30 min bei 37°C
- Vereinzelung der Zellen durch Hindurchdrücken durch ein 100 µm Metallsieb mit Hilfe eines sterilen Stempels
- Zentrifugation der Zellsuspension bei 450 g, 10 min
- Waschen mit PBS und erneute Zentrifugation bei 450 g, 10 min

- 
- Aufnehmen des Zellpellets in 40,5% Percoll und Überschichten auf 15 mL 58,5% Percoll in einem 50 mL-Falcon
  - Zentrifugation bei 1000 g, 20 min, ohne Bremse
  - Abnehmen der LIL, die über der 58,5% Percoll-Schicht liegen, mit einer Pasteurpipette
  - Waschen der LIL mit PBS und Zentrifugation bei 500 g, 10 min
  - Erneutes Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 350 g, 10 min
  - Die erhaltenen LIL wurden eingefroren.

## 4.2 Zellkultur

### 4.2.1 Kulturbedingungen bei Normoxie und Hypoxie

Die bei Normoxie durchgeführten Experimente wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator mit 95% Raumluft und 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C durchgeführt. Daraus ergibt sich eine Sauerstoffkonzentration von 19,9%, die im Inkubator vorherrscht.

Für die Experimente in Hypoxie wurde eine luftdicht verschließbare Kammer (*modular incubator chamber*, Billups-Rothenberg Inc.) verwendet (siehe Abbildung 1). In dieser Kammer können mehrere Zellkulturplatten platziert werden, außerdem eine Petrischale mit Wasser, so dass für eine ausreichende Wasserdampfsättigung gesorgt ist. Die Kammer wird luftdicht verschlossen und über zwei Schläuche mit einem Gasgemisch durchspült. Nach Durchströmen von 80 L dieses Gasgemischs gilt die Kammer als vollständig befüllt und wird sodann endgültig verschlossen und bei 37°C kultiviert.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei unterschiedliche Gasgemische verwendet: eines mit 5% O<sub>2</sub> (+5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) und eines mit 1% O<sub>2</sub> (+5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>).

Bei sämtlichen durchgeführten Experimenten wurde sowohl die Präinkubation der NK-Zellen bzw. LIL als auch die Koinkubation mit den Zielzellen bei den genannten O<sub>2</sub>-Konzentrationen durchgeführt.



Abbildung 1: *modular incubator chamber*. Quelle: [brincubator.com](http://brincubator.com).

#### 4.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können bei  $-150^{\circ}\text{C}$  über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Um eine Zerstörung der Zellmembran durch entstehende Eiskristalle zu verhindern, wird dem Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben, welches die Bildung von Kristallen stört. Da DMSO bei Temperaturen über  $0^{\circ}\text{C}$  toxisch für die Zellen ist, muss das Auftauen und Einfrieren rasch durchgeführt werden.

Das Einfrieren der Zellen geschieht in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox, um eine konstante Kühlrate von  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  zu gewährleisten.

Beim Auftauen der Zellen wird dem Medium eine Endonuclease (Benzonase) zugesetzt, um eine Aggregation der Zellen zu verhindern.

##### Durchführung Einfrieren:

- Pelletieren der gewünschten Anzahl von Zellen
- Resuspendieren der Zellen in RPMI + 10% FCS + 10% DMSO
- rasches Einfrieren der Zellen in einem Kryoröhrchen; zunächst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer Einfrierbox, nach 24 h bei  $-150^{\circ}\text{C}$

##### Durchführung Auftauen:

- zügiges Auftauen der Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  und anschließendes Waschen mit warmem RPMI + 25 U/mL Benzonase (Zentrifugation bei 350 g)
- Überstand abnehmen, Zellen in frischem Medium resuspendieren und aussäen

### 4.2.3 Passagieren von Zellen

Die K562-Zellen sind Suspensionszellen, somit wurde zum Passagieren ein Teil der Zellsuspension durch frisches Medium ersetzt.

Die HuH7-A2-Replicon-Zellen sowie die HSC wachsen adhärent und müssen zum Passagieren mit Accutase, einem Proteasengemisch, abgelöst werden. Die Enzymreaktion wird mit FCS-haltigem Medium abgestoppt, anschließend werden die Zellen gewaschen und in frischem Medium ausgesät.

### 4.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird lichtmikroskopisch mit einem Hämozytometer (auch: Neubauer-Zählkammer) bestimmt.

In den Boden der Zählkammer sind vier Großquadrate eingraviert, die jeweils eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> haben. Die Kammer ist 0,1 mm tief, so dass das Kammervolumen 0,1 µL beträgt. Die Zellzahl pro mL Volumen ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellkonzentration [1/mL]} = \text{Anzahl Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Zusätzlich wird die Vitalität der Zellen durch eine Färbung mit Trypanblau bestimmt. Dieser anionische Farbstoff kann die intakte Zellmembran einer lebenden Zelle nicht durchdringen und färbt deshalb nur das Zytoplasma von toten Zellen an. Jene erscheinen im Lichtmikroskop blau angefärbt.

### 4.2.5 Stimulation mit Zytokinen

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden die NK-Zellen bzw. LIL meist über Nacht präinkubiert. Dabei wurden sie entweder unstimuliert gelassen oder mit Zytokinen aktiviert. Für die Stimulation wurde entweder 25 U/mL Interleukin (IL)-2 oder 50 ng/mL Interferon (IFN)- $\alpha$  verwendet.

## 4.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine fluoreszenzbasierte Methode, mit der die Größe und die Granularität von Zellen sowie die Expression mehrerer Proteine auf Einzelzellbasis gemessen werden kann.

---

Hierfür werden Proteine in Zellen spezifisch mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert. Die Zellsuspension wird anschließend durch eine 50 µm breite Kapillare in das Durchflusszytometer eingesaugt, so dass die Zellen vereinzelt werden und nacheinander den zur Analyse verwendeten Laserstrahl passieren. Durch die Streuung des Strahls können die Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC) und die Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) der Zellen bestimmt werden. Die Expression der markierten Proteine wird anhand der Emissionsspektren des jeweiligen Fluorochroms gemessen.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Durchflusszytometer FACSCanto II (BD Biosciences) besitzt drei Laser zur Exzitation (405, 488 und 633 nm). Somit können bis zu sieben verschiedene Fluorochrome parallel analysiert werden.

#### **4.3.1 Oberflächenfärbungen**

Um Membranproteine mit Antikörpern anzufärben, müssen die Zellen nicht vorbehandelt werden, sondern können intakt und lebend gefärbt werden.

##### Durchführung:

- Vorbehandlung der Zellen (wie im jeweiligen Experiment beschrieben), z.B. Inkubation bei Hypoxie
- Überführen der Zellen in ein FACS-Röhrchen und Waschen mit 5 mL PBS durch Zentrifugation bei 350 g
- Aufnehmen des Pellets in 100 µL PBS
- Zugabe der gewünschten Antikörper (Volumen abhängig von Konzentration und jeweiligem Antikörper)
- 20 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
- Waschen mit 5 mL PBS durch Zentrifugation bei 350 g
- Zugabe vom Vitalitätsfarbstoff DAPI kurz vor dem Messen

#### **4.3.2 Intrazellulärfärbungen**

Um intrazelluläre Proteine anfärben zu können, müssen die Zellen zuvor fixiert und permeabilisiert werden, damit die Antikörper in die Zelle eindringen können. Dafür wurde ein Kit der Firma BD Biosciences verwendet (Fixation/Permeabilization Solution Kit).

In permeabilisierten Zellen kann DAPI nicht zur Vitalitätsbestimmung verwendet werden, da es in alle Zellen eindringt. Deshalb wurde ein fixierbarer Vitalitätsfarbstoff (Zombie aqua™) verwendet.

Bei der Färbung von Zytokinen wie z.B. Interferon (IFN)- $\gamma$  wurde während der Inkubation Brefeldin A zugesetzt, um eine Akkumulation des Zytokins im endoplasmatischen Retikulum zu induzieren.

#### Durchführung:

- Vorbehandlung der Zellen (wie im jeweiligen Experiment beschrieben), z.B. Inkubation bei Hypoxie
- Überführen der Zellen in ein FACS-Röhrchen und Waschen mit 5 mL PBS durch Zentrifugation bei 350 g
- Aufnehmen des Pellets in 100  $\mu$ L PBS
- Zugabe von Zombie aqua™ in einer Konzentration von 1:500, 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
- Zugabe der gewünschten Oberflächen-Antikörper (Volumen abhängig von Konzentration und jeweiligem Antikörper), 15 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
- Waschen mit 5 mL PBS + 1% BSA durch Zentrifugation bei 350 g
- Zugabe von 250  $\mu$ L Cytofix/Cytoperm Solution, 20 min Inkubation bei 4°C
- 2x Waschen mit 1 mL Perm/Wash Buffer durch Zentrifugation bei 500 g
- Zugabe der intrazellulären Antikörper (Volumen abhängig von Konzentration und jeweiligem Antikörper), 30 min Inkubation bei 4°C
- 2x Waschen mit 1 mL Perm/Wash Buffer durch Zentrifugation bei 500 g

#### **4.3.3 Degranulationsassay (CD107a)**

Als Maß für die Zytotoxizität von NK-Zellen wird deren Freisetzung zytotoxischer Granula gemessen. In der Membran der Granula befindet sich das Membranprotein CD107a, welches bei der Degranulation an die Oberfläche der Zelle gebracht wird. Im Assay wird die Internalisierung von CD107a durch die Zugabe eines Golgi-Inhibitors verhindert, so dass das Protein im Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann.

---

Durchführung:

- Aussaat der gewünschten Zielzellen (15.000 pro Well) am Vortag auf 96-Well-Platte
- Vorbehandlung der NK-Zellen (wie im jeweiligen Experiment beschrieben), z.B. Inkubation bei Hypoxie über Nacht
- Am nächsten Tag Aussaat von 20.000 NK-Zellen zu den Zielzellen in frischem Medium (*effector:target ratio* 1:1)
- Zugabe von 5 µL anti-CD107a PE und 0,4 µL GolgiStop™
- Inkubation in Hypoxie oder Normoxie für 5 h im Brutschrank
- Überführen der Zellen in ein FACS-Röhrchen und Waschen mit 5 mL PBS durch Zentrifugation bei 350 g
- Zugabe der gewünschten Oberflächen-Antikörper (Volumen abhängig von Konzentration und jeweiligem Antikörper), 15 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
- Waschen mit 5 mL PBS durch Zentrifugation bei 350 g
- Zugabe des Vitalitätsfarbstoffs DAPI kurz vor dem Messen

#### 4.3.4 Apoptoseassay

Um die direkte Zytotoxizität der NK-Zellen zu messen, wurde nach einer Koinkubation mit Zielzellen bestimmt, wie viele der Zielzellen apoptotisch geworden sind. Dafür wurde die aktive Caspase-3, ein Bestandteil des Apoptosesignalwegs, intrazellulär angefärbt.

Um die Zielzellen am Durchflusszytometer von den NK-Zellen unterscheiden zu können, wurden deren Zytoplasma vor der Koinkubation angefärbt.

Durchführung:

- Anfärbung der Zielzellen (z.B. HSC) mit eFluor® 670 (von eBioscience) und Aussaat
- Aussaat der (ggfs. vorbehandelten) NK-Zellen zu den Zielzellen im *effector:target* Verhältnis 10:1
- Inkubation in Hypoxie oder Normoxie für 6 h im Brutschrank
- Intrazellulärfärbung der Zielzellen mit anti-Caspase-3 Antikörper laut Protokoll für Intrazellulärfärbung (siehe Abschnitt 4.3.2)



### 4.3.5 Hypoxienachweis in der Zelle durch Pimonidazol

Im hypoxischen Zellmilieu ist der Hypoxiemarker Pimonidazol in der Lage, Proteinaddukte zu bilden. Diese Addukte können anschließend mit einem Antikörper gegen Pimonidazol im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. In normoxischen Zellen funktioniert dies nicht. Die verwendeten Reagenzien entstammen dem Hypoxyprobe™-1 Kit.

#### Durchführung:

- Kultivierung von PBMC in Hypoxie für 16 h
- Zugabe von 200 µM Pimonidazol und weitere 2 h Inkubation in Hypoxie
- Waschen der Zellen mit PBS und Intrazellulärfärbung mit anti-Pimonidazol-Antikörper (Protokoll siehe 4.3.2)

### 4.4 Assay zur Bestimmung der Virusreplikation

Für die Bestimmung des Einflusses von NK-Zellen auf die Virusreplikation wurden HuH7-A2-Replicon-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie, die mit HLA-A2- und Luciferase-HCV-Replicon-Plasmiden transfiziert ist<sup>19</sup>. Wenn das HCV-enthaltende Plasmid repliziert wird, wird das Reporter-gen Luciferase exprimiert, welches nach einer Lysierung der Zellen nachgewiesen werden kann. Dafür wird das Steady-Glo® Luciferase Assay System verwendet.

Die durch die NK-Zellen verursachte Hemmung der Replikation wird in Kokulturrexperimenten getestet. Die Hemmung der Replikation wird dabei folgendermaßen berechnet:

$$\text{Replikationshemmung (in \%)} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Lumineszenz-Units mit NK-Zellen}) \cdot 100}{\text{Lumineszenz-Units ohne NK-Zellen}} \right\}$$

#### Durchführung:

- Am Vortag Aussaat von 30.000 HuH7-A2-Replicon-Zellen pro Well auf 48-Well-Platte (inkl. 4 – 6 Kontrollwells pro Platte)
- Vorsichtige Abnahme des Mediums und Aussaat der (ggfs. vorbehandelten) NK-Zellen in frischem Medium ohne Antibiotika in gewünschter Anzahl zu den HuH7-A2-Replicon-Zellen

- 
- Inkubation in Hypoxie oder Normoxie für 24 h
  - Zentrifugation der Platten bei 300 g für 5 min
  - Vorsichtiges Abnehmen des Überstandes, ggfs. Einfrieren zur späteren Verwendung
  - Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Steady-Glo<sup>®</sup> zu den Zellen und Inkubation für 10 min im Dunkeln auf dem Schüttler
  - Überführen des entstandenen Zelllysats in eine weiße 96-Well-Platte
  - Messen der Biolumineszenz an einem Plate reader

## 4.5 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, mit dem Proteine in Zelllysaten spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden können.

Dabei werden zunächst Proteinextrakte aus lysierten Zellen gewonnen. Diese werden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine des Gels auf eine Membran übertragen und dort mittels enzymgekoppelter Antikörper über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Mit einer densitometrischen Software kann die Proteinmenge quantifiziert werden.

### 4.5.1 Proteinextraktion aus Zellkernen

Für den Nachweis von nukleären Proteinen wie z. B. HIF-1 $\alpha$  werden die Proteine aus Kernextrakten gewonnen, um eine höhere Konzentration zu gewährleisten.

#### Durchführung:

- Aussaat von 10 Mio PBMC auf 6-Well-Platte am Vortag und Inkubation über Nacht bei Hypoxie oder Normoxie
- Überführen der Zellen in 1,5 mL Reaktionsgefäße auf Eis
- 2x Waschen der Zellen mit PBS
- Aufnahme des Pellets in 100  $\mu\text{L}$  Puffer A (siehe 3.8), Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  Nonidet P-40
- Inkubation 5 min auf Eis zur Dissemblierung der Zellmembran
- Zentrifugation für 10 min bei 1000 g (bei 4°C)
- Überstand verwerfen (Zytoplasmaextrakt)

- 
- Resuspendieren des Pellets in 15 µL Puffer B (siehe 3.8)
  - Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g (bei 4°C)
  - Überstand (Zellkernextrakt) vorsichtig abnehmen und für die Proteinbestimmung weiterverwenden

#### 4.5.2 Proteinbestimmung mittels Spektrophotometer

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der Absorption mit dem Nanodrop-Spektrophotometer. Bedingt durch die aromatischen Aminosäuren besitzen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm.

#### 4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht, d.h. nach der Größe, aufgetrennt werden. Die Proteine werden durch das SDS denaturiert, linearisiert und mit einer negativen Ladung versehen. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Proteine Richtung Anode durch das Polyacrylamid-Gel. Dabei werden die größeren Proteine durch das Polyacrylamid stärker zurückgehalten und wandern so langsamer als die kleineren.

##### Durchführung:

- Verdünnen der Proben in 2x Laemmli-Puffer und Denaturieren für 5 min bei 95°C
- Trenngel ansetzen (Rezept siehe 3.8), TEMED als letztes zugeben und luftblasenfrei in die Gelkammer eingießen
- Mit Isopropanol überschichten
- Nach ca. 20 min Isopropanol abschütten, mit H<sub>2</sub>O waschen und Reste mit einem Filterpapier aufsaugen
- Sammelgel ansetzen (Rezept siehe 3.8), TEMED als letztes zugeben und luftblasenfrei in die Gelkammer auf das Trenngel schichten
- Gelkamm einsetzen und das Gel auspolymerisieren lassen
- Gel in den Western Blot-Tank einspannen und Tank mit Laufpuffer (Rezept siehe 3.8) befüllen
- vorbereitete Proben sowie Protein Ladder in die Geltaschen füllen
- Tankdeckel aufsetzen und Elektrophorese bei 180 V ca. 90 min laufen lassen

#### 4.5.4 Semi-Dry-Blot

Beim Semi-Dry-Blot werden die aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

##### Durchführung:

- Gel in Gelpuffer (siehe 3.8) 10 min äquilibrieren lassen
- Nitrocellulosemembran in Membranpuffer (siehe 3.8) 10 min äquilibrieren lassen
- Jeweils zwei Filterpapiere in Gelpuffer bzw. Membranpuffer legen
- Auf die Metallfläche des Blotters zwei Filterpapiere (in Membranpuffer) legen; darauf die Nitrocellulosemembran; darauf das Gel; darauf zwei Filterpapiere (in Gelpuffer)
- Luftblasen ausstreichen
- Blotterdeckel schließen und bei 25 V ca. 3 h blotten

#### 4.5.5 Proteindetektion

Das zu testende Protein sowie ein Referenzprotein, dessen Expression nicht verändert wird, werden mittels enzymgekoppelter Antikörper über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Als Referenzprotein wurde HDAC-1 verwendet, da der Western Blot mit Kernextrakten durchgeführt wurde.

##### Durchführung:

- Blockierung der Membran in PBS + 5% Magermilchpulver + 0,1% Tween über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur
- Waschen mit H<sub>2</sub>O
- Zerschneiden der Membran für getrennte Detektion von HIF-1 $\alpha$  (ca. 115 kD) und HDAC-1 (ca. 65 kD)
- HIF-1 $\alpha$  Antikörper 1:750 (bzw. HDAC-1 Antikörper 1:1000) in PBS + 5% Magermilchpulver + 0,1% Tween verdünnen und Membran über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur darin inkubieren
- 4 x 5 min mit 0,1% PBS + 0,1% Tween waschen
- HRP-gekoppelten Sekundärantikörper 1:5000 in PBS + 5% Magermilchpulver + 0,1% Tween verdünnen und Membran 45 min bei Raumtemperatur darin inkubieren
- 4 x 5 min mit 0,1% PBS + 0,1% Tween waschen

- 
- Chemilumineszenzsubstrat AceGlow™ anmischen und auf Membran geben, Entwicklung nach 5 min im Chemilumineszenz-Reader Chemismart

## 4.6 Molekularbiologische Methoden

### 4.6.1 RNA-Isolation aus Zellen

Für die Gewinnung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde das GeneJet RNA Purification Kit verwendet. Die RNA wird hierbei mittels SiO<sub>2</sub>-basierter Membrantechnologie über Säulen aufgereinigt.

Die Durchführung erfolgte nach dem dem Kit beiliegenden Protokoll.

Im Anschluss an die Isolation wurde die RNA-Konzentration am Nanodrop-Spektrophotometer durch Messen der Absorption bei 260 nm bestimmt.

### 4.6.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der RNA-Proben in cDNA wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit verwendet. Hierbei wird zunächst die genomische DNA eliminiert. Anschließend wird sämtliche mRNA unter Verwendung von Poly-dT-Primern revers transkribiert. Dabei wird das mRNA-Templat abgebaut, so dass nur die entstandene cDNA übrig bleibt. Diese wird dann als Templat für die quantitative PCR weiterverwendet.

Die Durchführung erfolgte nach dem dem Kit beiliegenden Protokoll.

### 4.6.3 Quantitative PCR

Um die Expression bestimmter Gene nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde eine quantitative PCR am Lightcycler® durchgeführt.

Dabei wird cDNA von in Hypoxie kultivierten und unterschiedlich stimulierten NK-Zellen als Templat verwendet. Um die Menge der entstandenen Amplifikationsprodukte nachzuweisen, wurde SYBR®Green verwendet, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und dort einen fluoreszierenden Komplex bildet. Nach jedem Amplifikationszyklus wird die SYBR®Green-Fluoreszenz detektiert, so dass ein Echtzeit-Nachweis der Amplifikationsprodukte ermöglicht wird. Der dabei bestimmte CT-Wert kennzeichnet den Amplifikationszyklus, in dem die Fluoreszenz erstmals aus dem Hintergrund aufsteigt.

---

Als Referenzgen wird ein wenig reguliertes Gen (hier:  $\beta$ -Actin) verwendet, so dass die erhaltenen CT-Werte in Relation zur cDNA-Menge bewertet werden können.

Die Berechnung der Expressionswerte erfolgte wie folgt:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT (zu testendes Gen)} - \text{CT (Referenzgen)}$$

Da ein niedriger  $\Delta\text{CT}$ -Wert somit einer hohen Expression des zu untersuchenden Gens entspricht, wurde zur besseren Visualisierung die Darstellung als  $\frac{1}{\Delta\text{CT}}$  gewählt.

## 4.7 Statistische Methoden

Für die Berechnung der Statistik wurde die Software GraphPad Prism 5.0 verwendet. Dabei wurden unterschiedliche statistische Tests verwendet:

- der ungepaarte t-Test für normalverteilte Daten, in denen unterschiedliche Spender oder Konditionen verglichen werden;
- der gepaarte t-Test für normalverteilte Daten, in denen Daten zu einem Spender verglichen werden;
- der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischen Test für nicht-normalverteilte Daten.

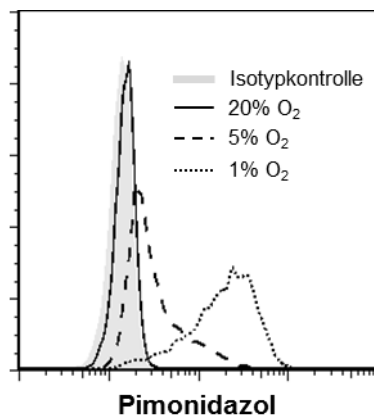
Ein p-Wert niedriger als 0,05 wurde als signifikant angesehen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Die Daten wurden als Balkendiagramme (Mittelwert + SEM) oder als Box Plots dargestellt.

## 5 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in zwei Kapitel unterteilt. In Kapitel 5.1 wird der Einfluss von Hypoxie auf die antivirale und antifibrotische Aktivität von NK-Zellen bei der Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion untersucht. In Kapitel 5.2 wird analog dazu der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen in der HIV-Infektion untersucht.

Vor Beginn der Experimente, die bei Hypoxie durchgeführt werden sollten, wurde überprüft, ob unter den verwendeten Versuchsbedingungen tatsächlich ein hypoxisches Zellmilieu nachweisbar ist. Dafür wurde den NK-Zellen Pimonidazol zugegeben, welches unter sauerstoffarmen Bedingungen im Zytoplasma Proteinaddukte bildet<sup>120</sup>. Diese Addukte wurden durchflusszytometrisch nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass in den Zellen, die bei 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert wurden, eine Zunahme der Pimonidazoladdukte nachweisbar war (siehe Abbildung 2). Somit kann davon ausgegangen werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die Zellen tatsächlich einer hypoxischen Umgebung ausgesetzt sind.



**Abbildung 2: Der Nachweis des hypoxischen Zellmilieus durch Pimonidazolfärbung.**

NK-Zellen wurden 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde Pimonidazol als Hypoxiemarker hinzugegeben und die Zellen wurden weitere 2 h kultiviert. Danach wurden die Zellen mit anti-Pimonidazol Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Grau hinterlegt, Isotypkontrolle; durchgezogene Linie, 20% O<sub>2</sub>; gestrichelte Linie, 5% O<sub>2</sub>; gepunktete Linie, 1% O<sub>2</sub>.

---

## 5.1 Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HCV-Infektion

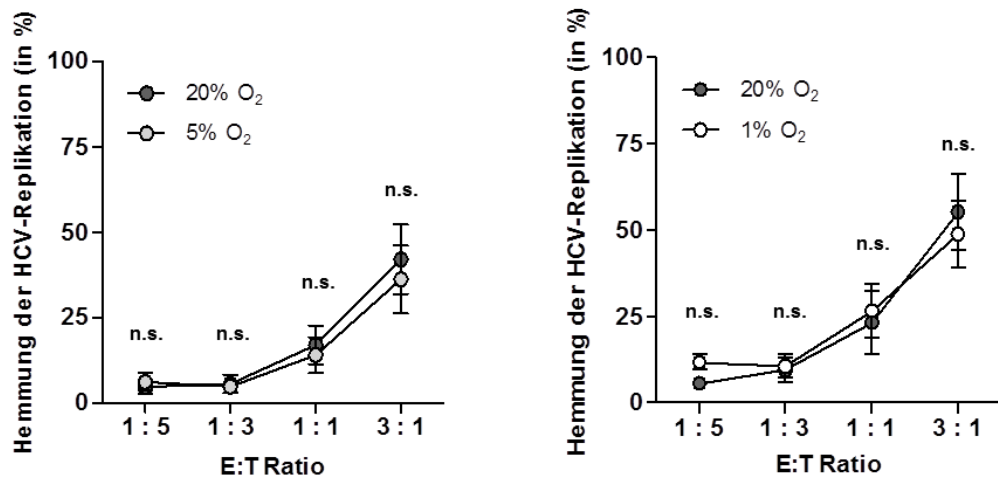
NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der HCV-Infektion, sowohl was die Hemmung der viralen Replikation angeht als auch die Regulation der Leberfibrose. Ihr primärer Wirkungsort dabei ist die Leber, in welcher niedrige Sauerstoffkonzentrationen vorherrschen. Die meisten bisherigen Untersuchungen wurden jedoch bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen durchgeführt. Deshalb soll in dieser Arbeit auf den Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HCV-Infektion eingegangen werden.

### 5.1.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die antivirale Aktivität von gesunden NK-Zellen

Zunächst sollte aufgeklärt werden, ob ein Einfluss von Hypoxie auf die antivirale NK-Zell-Aktivität nachweisbar ist. Dafür wurden ruhende NK-Zellen von gesunden Spendern 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert und anschließend für 24 h mit HuH7-A2-Replicon-Zellen koinkubiert. Diese Zellen besitzen ein HCV-Replicon, welches zusätzlich für Luciferase kodiert. Im Anschluss an die Koinkubation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt und so die antivirale Aktivität der NK-Zellen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass weder die Kultivierung bei 5% noch bei 1% O<sub>2</sub> einen signifikanten Einfluss auf die antivirale Aktivität der NK-Zellen hat (siehe Abbildung 3).

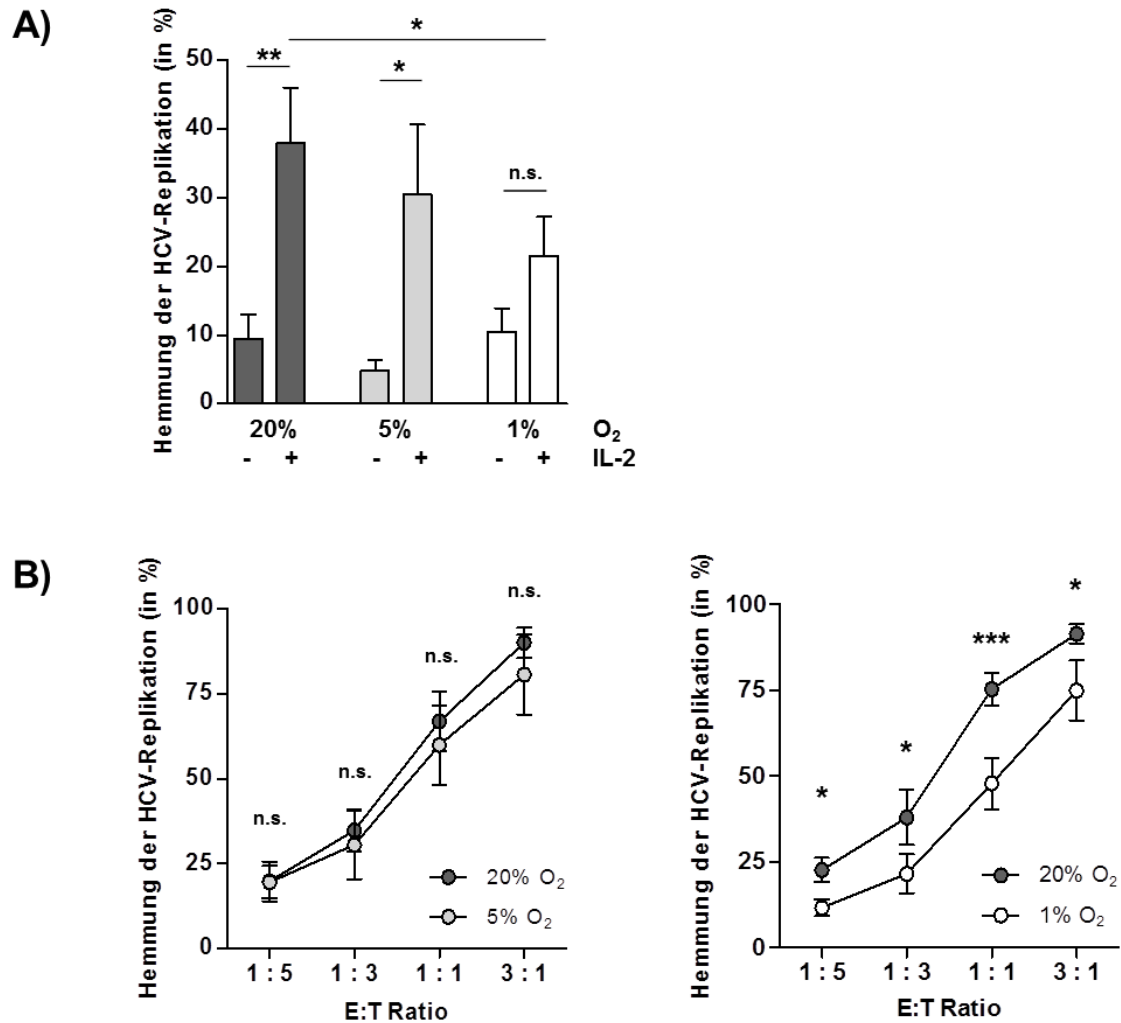
Als nächstes wurde untersucht, ob bei der NK-Replicon-Koinkubation die Stimulierbarkeit der NK-Zellen mit Interleukin (IL)-2 durch die Hypoxie verändert wird. Dafür wurde während der Präinkubation der NK-Zellen IL-2 zugegeben. Bei der Inkubation bei 20% O<sub>2</sub> wurde, wie erwartet, durch die Zugabe von IL-2 ein signifikanter Anstieg der antiviralen Aktivität beobachtet (siehe Abbildung 4A, dunkelgraue Balken). Bei 5% O<sub>2</sub> wurde ein ähnlich starker Anstieg beobachtet. Bei Inkubation bei 1% O<sub>2</sub> hingegen war nur ein leichter IL-2-vermittelter Anstieg der antiviralen Aktivität zu beobachten, der statistisch nicht signifikant war (siehe Abbildung 4A, weiße Balken). In Abbildung 4B ist die HCV-Replikationshemmung IL-2-aktivierter NK-Zellen bei verschiedenen E:T Ratios dargestellt. Hier bestätigt sich, dass die antivirale Aktivität stimulierter NK-Zellen durch Inkubation bei 1% O<sub>2</sub>, nicht aber bei 5% O<sub>2</sub>, signifikant beeinträchtigt wird.





**Abbildung 3: Hypoxie hat keinen Einfluss auf die anti-HCV-Aktivität ruhender NK-Zellen von gesunden Spendern.**

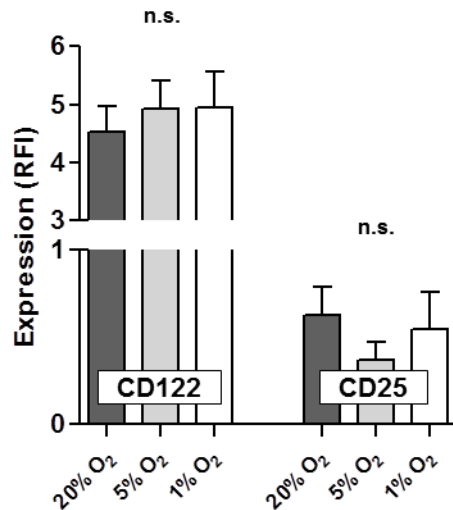
NK-Zellen von gesunden Spendern ( $n = 6$ ) wurden für 16 h bei 20% oder 5% O<sub>2</sub> (linkes Bild) bzw. 20% oder 1% (rechtes Bild) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit HuH7-A2-Replicon-Zellen koinkubiert, ebenfalls bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub>. Als Maß für die HCV-Replikation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. E:T Ratio, Effektor:Target Ratio; n.s., nicht signifikant.



**Abbildung 4: Die antivirale Aktivität gesunder, IL-2-aktivierter NK-Zellen wird durch Hypoxie beeinträchtigt.**

NK-Zellen von gesunden Spendern wurden mit IL-2 aktiviert und für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit HuH7-A2-Replicon-Zellen koinkubiert, ebenfalls bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub>. Als Maß für die HCV-Replikation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. (A) Vergleich zwischen ruhenden und IL-2-aktivierten NK-Zellen (n = 6) bei einer E:T Ratio von 1:3. (B) Die Replikationshemmung IL-2-aktivierter NK-Zellen (n = 6) bei verschiedenen E:T Ratios; links, 20% vs. 5% O<sub>2</sub>; rechts, 20% vs. 1% O<sub>2</sub>. E:T Ratio, Effektor:Target Ratio; n.s., nicht signifikant. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

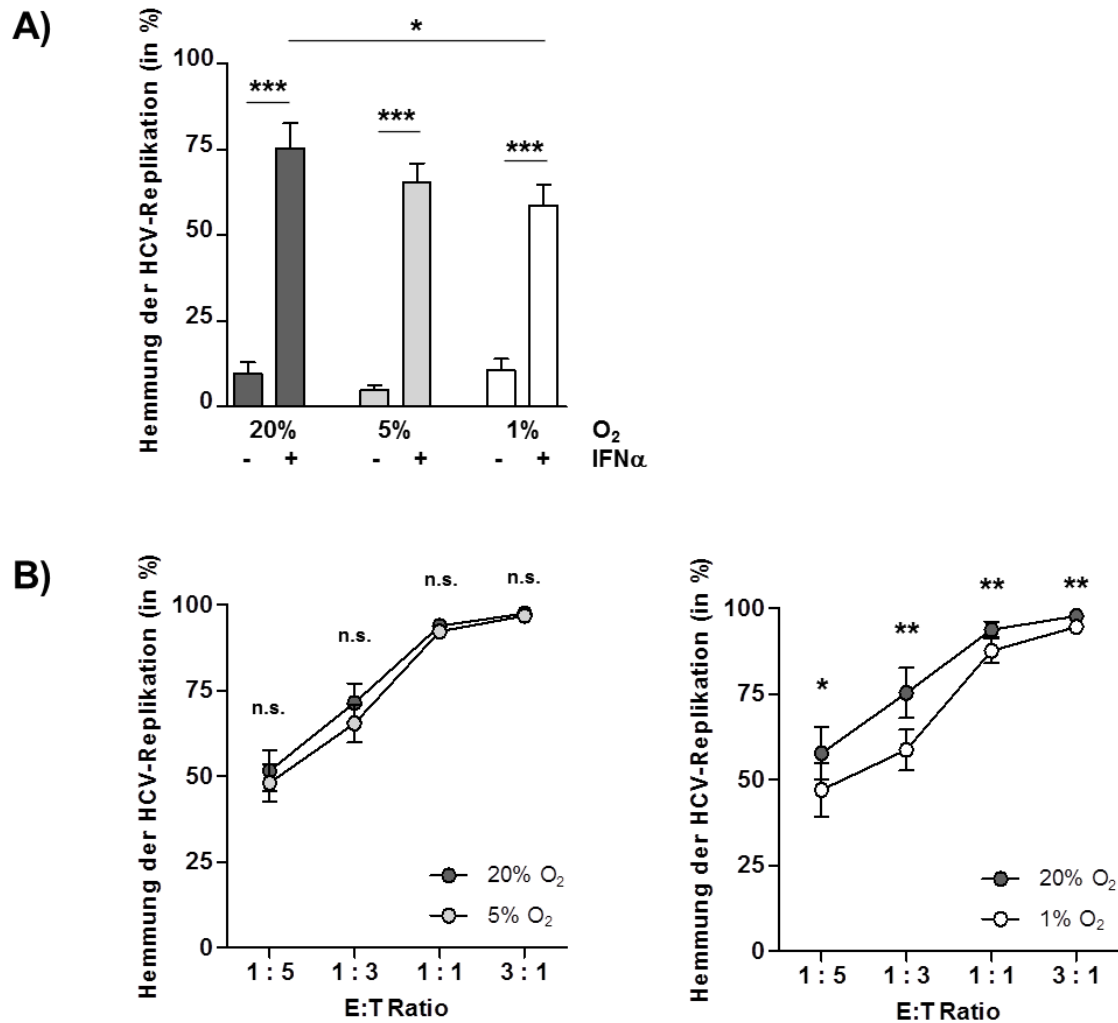
Als nächstes wurde überprüft, ob die durch die Hypoxie veränderte IL-2-Antwort der NK-Zellen durch eine veränderte Expression der IL-2-Rezeptoren CD122 und CD25 vermittelt ist. Dafür wurden die NK-Zellen 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend wurde die Expression der beiden Rezeptoren durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Hypoxie keinen Einfluss auf die CD122- oder CD25-Expression hat (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Der Einfluss von Hypoxie auf die CD25- und CD122-Expression von gesunden NK-Zellen.**

NK-Zellen von gesunden Spendern ( $n = 7$ ) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde die Expression von CD25 und CD122 im Durchflusszytometer bestimmt. RFI, relative fluorescence intensity. n.s., nicht signifikant.

Diese Ergebnisse deuten auf einen Mechanismus hin, der unabhängig von IL-2 wirkt. Deshalb wurden die NK-Zellen als nächstes durch ein anderes Zytokin, Interferon (IFN)  $\alpha$ , aktiviert. Auch hier zeigte sich, dass die bei 1% O<sub>2</sub> kultivierten NK-Zellen sich weniger gut aktivieren lassen als die bei 20% oder 5% O<sub>2</sub> kultivierten Zellen (siehe Abbildung 6A). In Abbildung 6B ist die HCV-Replikationshemmung IFN $\alpha$ -aktivierter NK-Zellen bei verschiedenen E:T Ratios dargestellt. Analog zu den Versuchen mit IL-2-Stimulation zeigte sich hier, dass die antivirale Aktivität stimulierter NK-Zellen durch Inkubation bei 1% O<sub>2</sub>, nicht aber bei 5% O<sub>2</sub>, signifikant beeinträchtigt wird. Dies scheint also ein allgemeiner Mechanismus in aktivierten NK-Zellen zu sein.

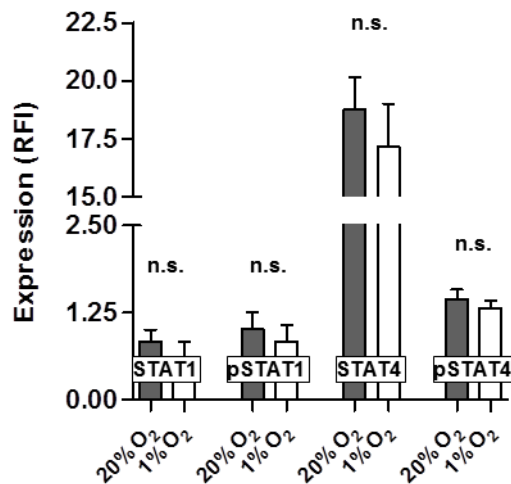


**Abbildung 6:** Die antivirale Aktivität gesunder, IFN $\alpha$ -aktivierter NK-Zellen wird durch Hypoxie beeinträchtigt.

NK-Zellen von gesunden Spendern wurden mit IFN $\alpha$  aktiviert und für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit HuH7-A2-Replicon-Zellen koinkubiert, ebenfalls bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub>. Als Maß für die HCV-Replikation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. (A) Vergleich zwischen ruhenden und IFN $\alpha$ -aktivierten NK-Zellen (n = 6) bei einer E:T Ratio von 1:3. (B) Die Replikationshemmung IFN $\alpha$ -aktivierter NK-Zellen (n = 6) bei verschiedenen E:T Ratios; links, 20% vs. 5% O<sub>2</sub>; rechts, 20% vs. 1% O<sub>2</sub>. E:T Ratio, Effektor:Target Ratio; n.s., nicht signifikant. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4 (*signal transducer and activator of transcription*) sind bekannte Mediatoren zytokininduzierter Signalwege bei NK-Zellen<sup>121,122</sup>. Bei einer Phosphorylierung der beiden Proteine wandern diese in den Zellkern und können sodann als Transkriptionsfaktoren wirken. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob die durch die Hypoxie verursachte veränderte Zytokinantwort der NK-Zellen auf eine Veränderung der Expression oder Phosphorylierung von STAT1 und STAT4 zurückzuführen ist. Nach einer Kultivierung

der NK-Zellen bei 20% oder 1% O<sub>2</sub> zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression von phosphoryliertem oder nicht-phosphoryliertem STAT1 oder STAT4 (siehe Abbildung 7).

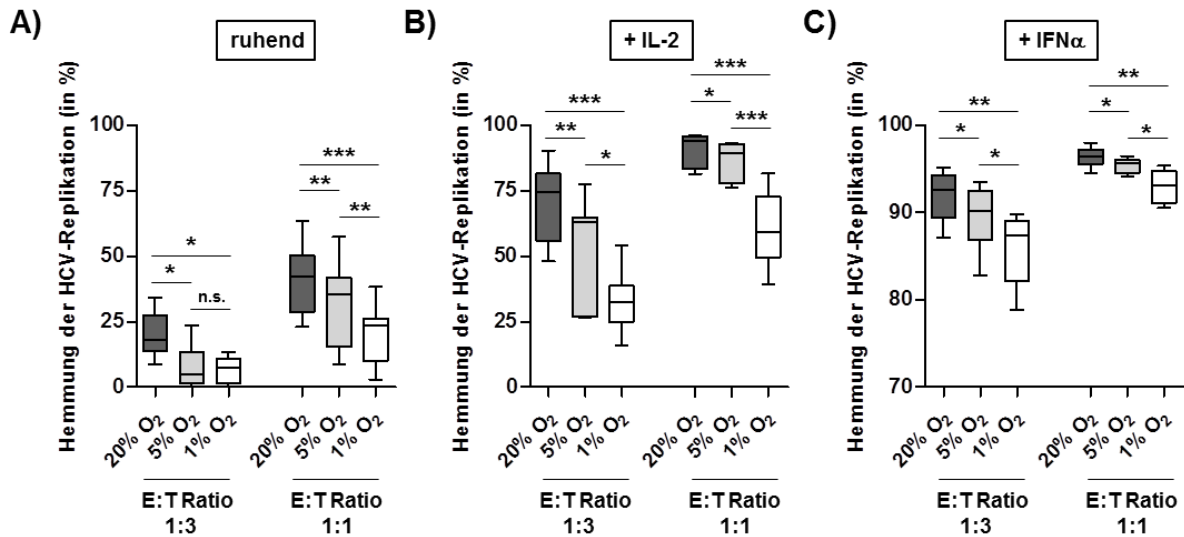


**Abbildung 7: Hypoxie besitzt keinen Einfluss auf die STAT-Expression in gesunden NK-Zellen.**

NK-Zellen gesunder Spender (n = 6) wurden für 16 h bei 20% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und intrazellulär für STAT1, pSTAT1, STAT4 und pSTAT4 gefärbt. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. RFI, relative fluorescence intensity. n.s., nicht signifikant. STAT, *signal transducer and activator of transcription*. pSTAT, phosphoryliertes STAT.

### 5.1.2 Der Einfluss von Hypoxie auf die antivirale Aktivität von NK-Zellen von HCV-Patienten

Als nächstes wurde untersucht, wie die Auswirkungen von Hypoxie auf NK-Zellen von Hepatitis C Virus (HCV)-infizierten Patienten sind. Dafür wurde, analog zu den Versuchen mit gesunden NK-Zellen, der Assay zur Bestimmung der HCV-Replikation bei 20%, 5% und 1% O<sub>2</sub> durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass ruhende HCV-NK-Zellen – im Gegensatz zu NK-Zellen von gesunden Spendern – eine signifikante Verminderung ihrer antiviralen Aktivität durch Hypoxie aufweisen (siehe Abbildung 8A). Diese Verminderung trat sowohl bei 5% als auch bei 1% O<sub>2</sub> auf. Wurden die NK-Zellen während der Inkubation in Hypoxie mit IL-2 oder IFN $\alpha$  aktiviert, wurde die antivirale Aktivität bereits bei 5% O<sub>2</sub> gehemmt (siehe Abbildung 8B+C), während dies bei den Gesunden erst bei 1% O<sub>2</sub> der Fall war (siehe Abbildung 4 und Abbildung 6). Die NK-Zellen von HCV-Patienten scheinen somit anfälliger für eine funktionelle Beeinträchtigung durch Hypoxie zu sein als die NK-Zellen von Gesunden.



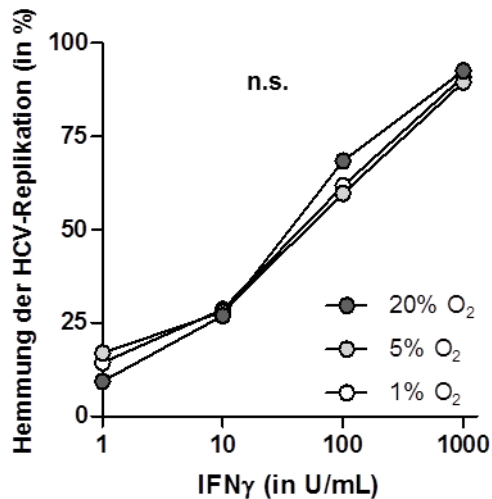
**Abbildung 8: NK-Zellen von HCV-Patienten sind sensibler gegenüber einer hypoxievermittelten Beeinträchtigung ihrer antiviralen Aktivität als gesunde NK-Zellen.**

NK-Zellen von HCV-Patienten ( $n = 7$ ) wurden ruhen gelassen (A) bzw. mit IL-2 (B) oder IFN $\alpha$  (C) aktiviert und für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O $_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit HuH7-A2-Replicon-Zellen koinkubiert, ebenfalls in 20%, 5% oder 1% O $_2$ . Als Maß für die HCV-Replikation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. E:T Ratio, Effektor:Target Ratio; n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.1.3 Die IFN $\gamma$ -Produktion gesunder und HCV-NK-Zellen unter Hypoxie

Es gibt Hinweise darauf, dass die Hemmung der HCV-Replikation im HuH7-A2-Replicon-System hauptsächlich durch IFN $\gamma$  vermittelt wird<sup>52,61</sup>.

Zunächst wurde deshalb untersucht, ob die IFN $\gamma$ -Sensitivität der HuH7-A2-Replicon-Zellen sich durch Hypoxie verändert. Dafür wurden die Replicon-Zellen mit rekombinantem IFN $\gamma$  bei 20%, 5% oder 1% O $_2$  inkubiert, anschließend wurde die Virusreplikation gemessen. Hier zeigte sich, dass die Virusreplikation unabhängig von der Sauerstoffkonzentration dosisabhängig gehemmt wurde (siehe Abbildung 9).

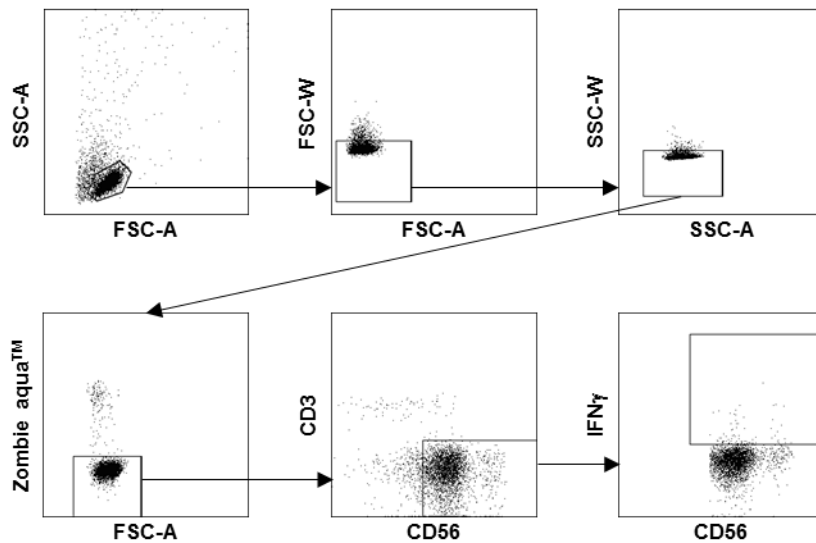


**Abbildung 9: Hemmung der HCV-Replikation durch rekombinantes IFN $\gamma$  bei Hypoxie.**

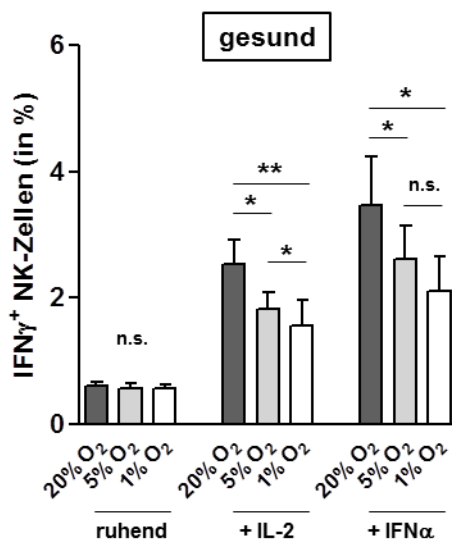
HuH7-A2-Replicon-Zellen ( $n = 3$ ) wurden mit unterschiedlichen Dosen rekombinantes IFN $\gamma$  für 24 h bei 20%, 5% oder 1% O $_2$  inkubiert. Als Maß für die HCV-Replikation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. n.s., nicht signifikant.

Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob Hypoxie einen Einfluss auf die IFN $\gamma$ -Produktion der NK-Zellen besitzt. Dafür wurden NK-Zellen von gesunden Spendern und HCV-Patienten bei 20%, 5% oder 1% O $_2$  für 16 h präinkubiert und anschließend 6 h lang mit Replicon-Zellen koinkubiert. Danach wurde die intrazelluläre Anreicherung von IFN $\gamma$  in den NK-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. In Abbildung 10A ist die Gating-Strategie gezeigt. Sowohl bei gesunden Spendern (Abbildung 10B) als auch bei HCV-Patienten (Abbildung 10C) sank bei zytokinaktivierten Zellen der Anteil der IFN $\gamma$ -positiven NK-Zellen durch die Inkubation in Hypoxie. Bei ruhenden NK-Zellen von gesunden Spendern ließ sich kein Hypoxie-Einfluss feststellen.

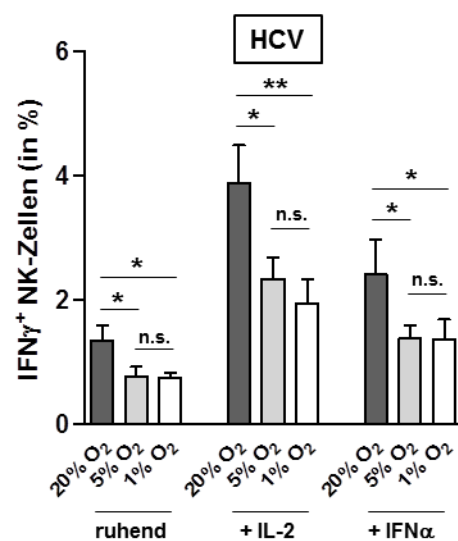
A)



B)



C)

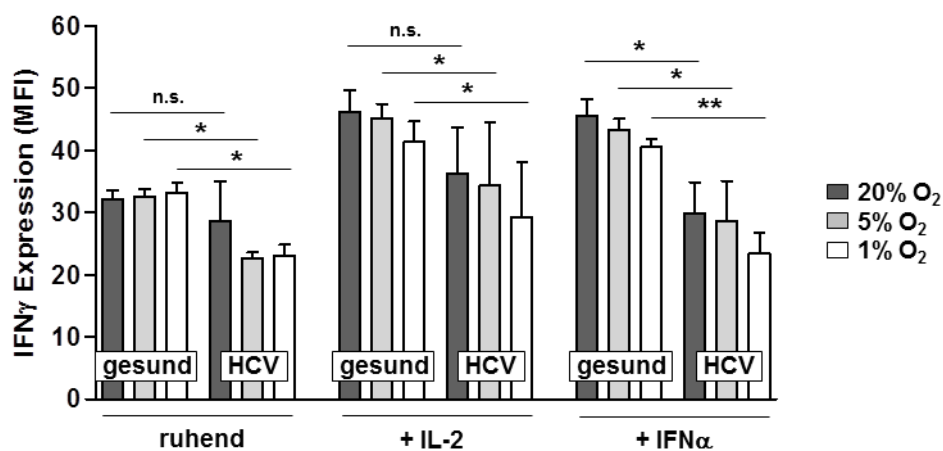


**Abbildung 10: Hypoxie verringert den Anteil IFN $\gamma$ -positiver NK-Zellen nach Koinkubation mit HuH7-A2-Replikon-Zellen.**

(A) Gating-Strategie: Setzen des Lymphozytengates nach Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A), anschließend Herausgaten der Dupletten (FSC-A gg. FSC-W und SSC-A gg. SSC-W). Bestimmung der lebenden Zellen mittels Zombie aqua-Färbung, Definition der NK-Zellen als CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, und zuletzt Gating der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> NK-Zellen. NK-Zellen von gesunden Spendern (B, n = 8) und HCV-Patienten (C, n = 7) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und währenddessen durch Zytokine aktiviert oder ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit Huh7-A2-Replikon-Zellen unter Zugabe von Brefeldin A koinkubiert, um eine Akkumulation der Zytokine im endoplasmatischen Retikulum zu induzieren. Danach wurden die NK-Zellen intrazellulär für IFN $\gamma$  gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. n.s., nicht signifikant. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. Die Experimente wurden von Herrn Dr. rer. nat. Andreas Glässner durchgeführt.



Diese Daten geben jedoch lediglich eine Auskunft über den Anteil  $\text{IFN}\gamma^+$  NK-Zellen, nicht aber über das Ausmaß der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch diese NK-Zellen. Deshalb wurde zusätzlich die MFI (*median fluorescence intensity*) der  $\text{IFN}\gamma^+$  NK-Zellen ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass bereits bei Kultivierung in Normoxie die  $\text{IFN}\gamma^+$  NK-Zellen von HCV-Patienten eine niedrigere MFI aufwiesen als die von gesunden Spendern (siehe Abbildung 11). Zudem wiesen die NK-Zellen der HCV-Patienten eine größere Anfälligkeit gegenüber niedrigen Sauerstoffkonzentrationen auf als die Zellen von Gesunden.



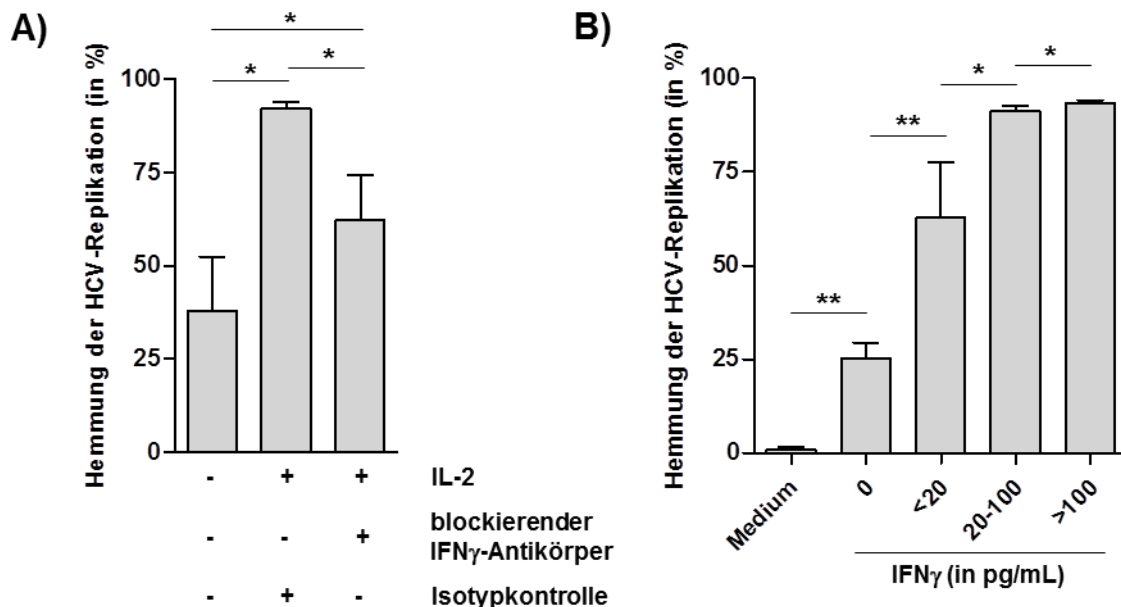
**Abbildung 11: Das Ausmaß der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von HCV-NK-Zellen wird durch Hypoxie stärker beeinflusst als das gesunder NK-Zellen.**

NK-Zellen von gesunden Spendern ( $n = 8$ ) und HCV-Patienten ( $n = 7$ ) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1%  $\text{O}_2$  inkubiert und währenddessen durch Zytokine aktiviert oder ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit Huh7-A2-Replicon-Zellen unter Zugabe von Brefeldin A koinkubiert, um eine Akkumulation der Zytokine im endoplasmatischen Retikulum zu induzieren. Danach wurden die NK-Zellen intrazellulär für  $\text{IFN}\gamma$  gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die MFI (*median fluorescence intensity*) der  $\text{IFN}\gamma^+$  NK-Zellen wird hier dargestellt. n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion von NK-Zellen scheint jedoch nicht allein für die Hemmung der Virusreplikation in den HuH7-A2-Replicon-Zellen verantwortlich zu sein. Gibt man zum Koinkubationsansatz einen inhibierenden  $\text{IFN}\gamma$ -Antikörper hinzu, wird die Hemmung der HCV-Replikation nur teilweise aufgehoben (siehe Abbildung 12A). Zusätzlich wurden Überstände aus NK-Replicon-Koinkubationen mittels ELISA auf ihre  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration getestet. Diese Überstände wurden erneut auf HuH7-A2-Replicon-Zellen gegeben und es wurde untersucht, ob auch diese zellfreien Überstände in der Lage sind, die Virusreplikation zu hemmen. Dabei zeigte sich,

dass selbst Überstände, in denen im ELISA kein  $\text{IFN}\gamma$  nachweisbar war, die Virusreplikation in den Replicon-Zellen hemmen konnten (siehe Abbildung 12B).

Es scheinen also noch weitere lösliche, bisher nicht bekannte Faktoren bei der Hemmung der Virusreplikation durch NK-Zellen eine Rolle zu spielen.



**Abbildung 12:  $\text{IFN}\gamma$  ist nicht alleine für die NK-Zell-vermittelte Hemmung der Virusreplikation unter Hypoxie verantwortlich.**

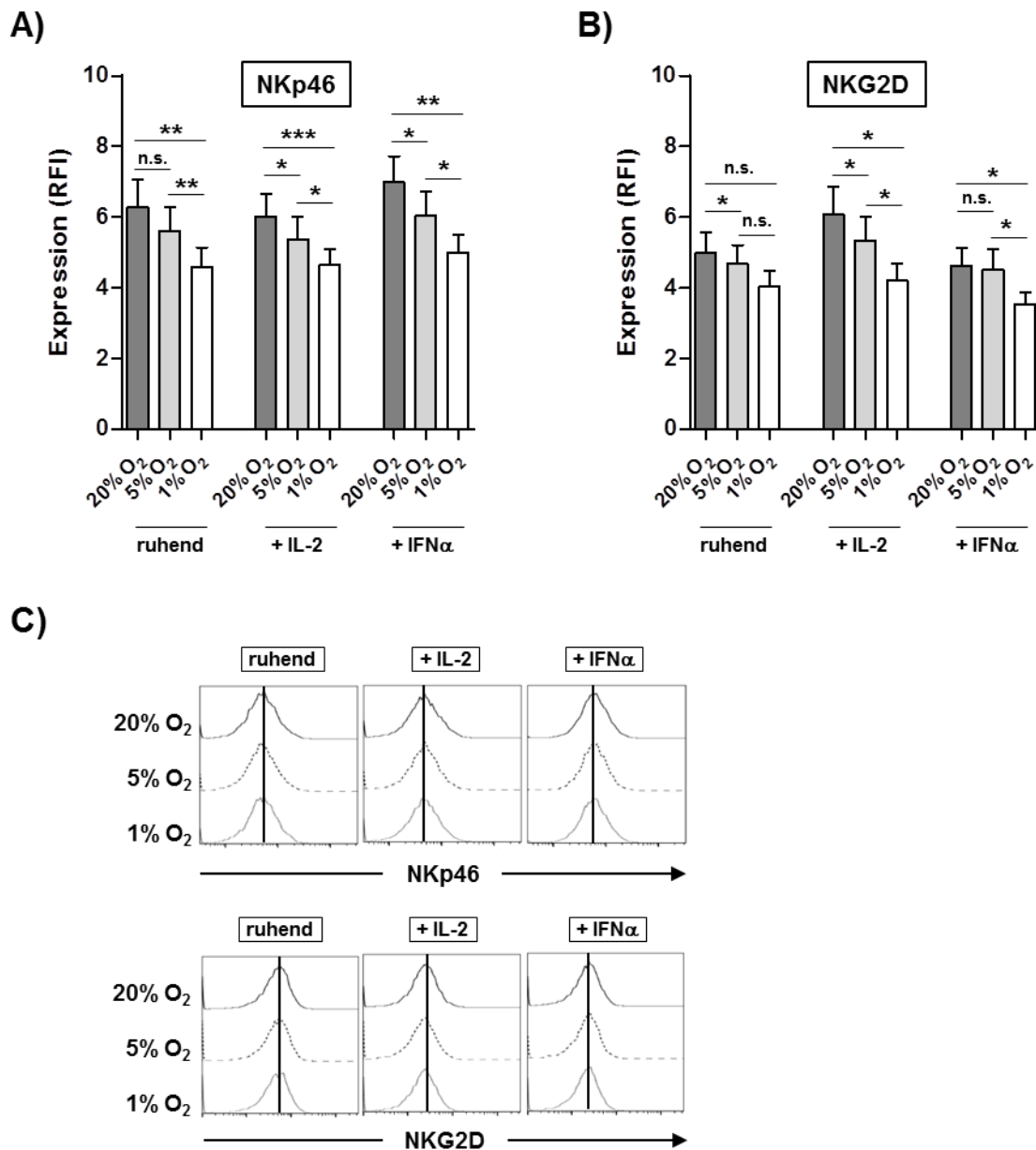
(A) NK-Zellen von HCV-Patienten ( $n = 3$ ) wurden für 16 h in 1%  $\text{O}_2$  inkubiert und währenddessen durch Zytokine aktiviert oder ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 24 h mit HuH7-A2-Replicon-Zellen unter Zugabe eines blockierenden  $\text{IFN}\gamma$ -Antikörpers bzw. einer Isotypkontrolle koinkubiert. Als Maß für die HCV-Replikation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. (B) Die  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration von Überständen aus einem NK-Replicon-Koinkubationsansatz wurde mittels ELISA bestimmt. Anschließend wurden diese Überstände erneut für 24 h auf Replicon-Zellen gegeben. Als Maß für die HCV-Replikation wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 5.1.4 Die Expression aktivierender NK-Zellrezeptoren unter Hypoxie

Die aktivierenden NK-Zellrezeptoren NKp46 und NKG2D nehmen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Hemmung der HCV-Replikation ein<sup>52,61,62</sup>.

Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob die Expression der beiden Rezeptoren auf gesunden und HCV-NK-Zellen durch Inkubation in Hypoxie verändert wird. Hierfür wurden NK-Zellen für 16 h bei 20%, 5% oder 1%  $\text{O}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die beiden Rezeptoren mittels einer Oberflächenfärbung angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Inkubation bei 5% und bei 1%  $\text{O}_2$  führte zu einer

signifikanten Herunterregulation von NKp46 (Abbildung 13A) und NKG2D (Abbildung 13B) auf NK-Zellen von HCV-Patienten. Dies war sowohl bei ruhenden als auch bei zytokinaktivierten Zellen der Fall. Die Rezeptorexpression auf NK-Zellen von gesunden Spendern wurde hingegen weder durch 5% noch durch 1% O<sub>2</sub> verändert (siehe Abbildung 13C).

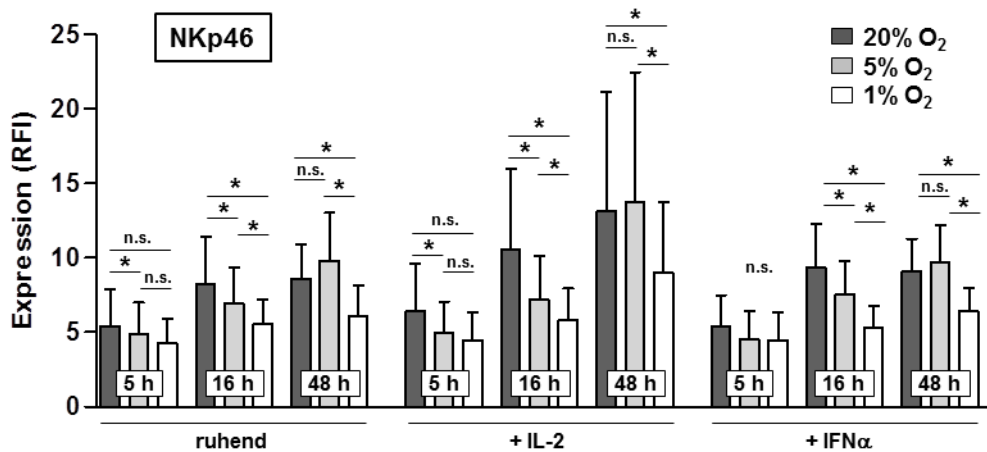


**Abbildung 13: Die Expression von NKp46 und NKG2D nach Kultivierung in Hypoxie.**

NK-Zellen wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und währenddessen durch Zytokine aktiviert oder ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Oberflächenfärbung für NKp46 und NKG2D gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (A, B) NK-Zellen von HCV-Patienten (n = 8). (C) NKp46- und NKG2D-Histogramme, repräsentativ für 7 gesunde Spender. RFI, *relative fluorescence intensity*. n.s., nicht signifikant. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Um den Zeitverlauf der hypoxievermittelten Rezeptorregulation zu analysieren, wurden die NK-Zellen nun unterschiedlich lange bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde wieder die Expression von NKp46 und NKG2D am Durchflusszytometer untersucht. Hier zeigte sich, dass die Herabregulation von NKp46 (Abbildung 14A) bereits nach 5 h Kultivierung in Hypoxie beginnt, die Herabregulation von NKG2D (Abbildung 14B) erst nach 16 h. Auch nach 48 h Kultivierung in Hypoxie waren die Unterschiede in der Rezeptorexpression noch signifikant, sowohl bei NKp46 als auch bei NKG2D.

A)



B)

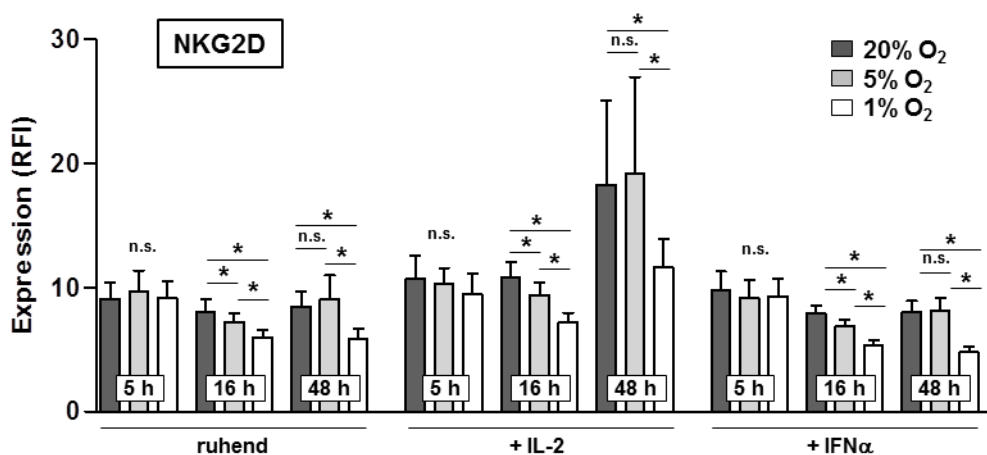
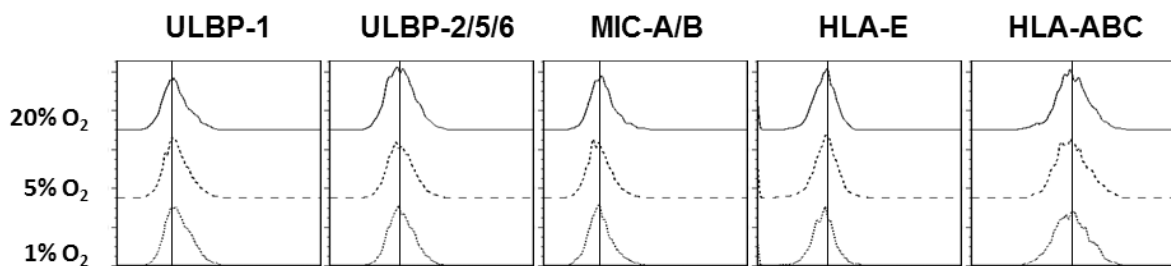


Abbildung 14: Der Zeitverlauf der NK-Zellrezeptor-Expression bei NK-Zellen von HCV-Patienten nach Kultivierung in Hypoxie.

NK-Zellen von HCV-Patienten (n = 4) wurden für 5 h, 16 h oder 48 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und währenddessen durch Zytokine aktiviert oder ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Oberflächenfärbung für NKp46 (A) und NKG2D (B) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. RFI, *relative fluorescence intensity*. n.s., nicht signifikant. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Die Zielzellen in den hier durchgeführten Experimenten, die HuH7-A2-Replicon-Zellen, sind in der Lage, Oberflächenrezeptoren zu exprimieren, die auf NK-Zellen aktivierend oder inhibierend wirken können. Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression der bei Stress hochregulierten NKG2D-Liganden MIC-A/B und ULBP (aktivierend) sowie auf die MHC-Moleküle HLA-E und HLA-ABC (inhibierend) sollte als nächstes untersucht werden. Die im Durchflusszytometer bestimmte Expression war jedoch nach Inkubation der Zellen in 5% oder 1% O<sub>2</sub> nicht verändert (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: Hypoxie verändert nicht die Expression von NK-Zell-Rezeptorliganden auf HuH7-A2-Replicon-Zellen.**

HuH7-A2-Replicon-Zellen wurden für 24 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde im Durchflusszytometer die Expression von ULBP-1, ULBP-2/5/6, MIC-A/B, HLA-E und HLA-ABC bestimmt. Die Histogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

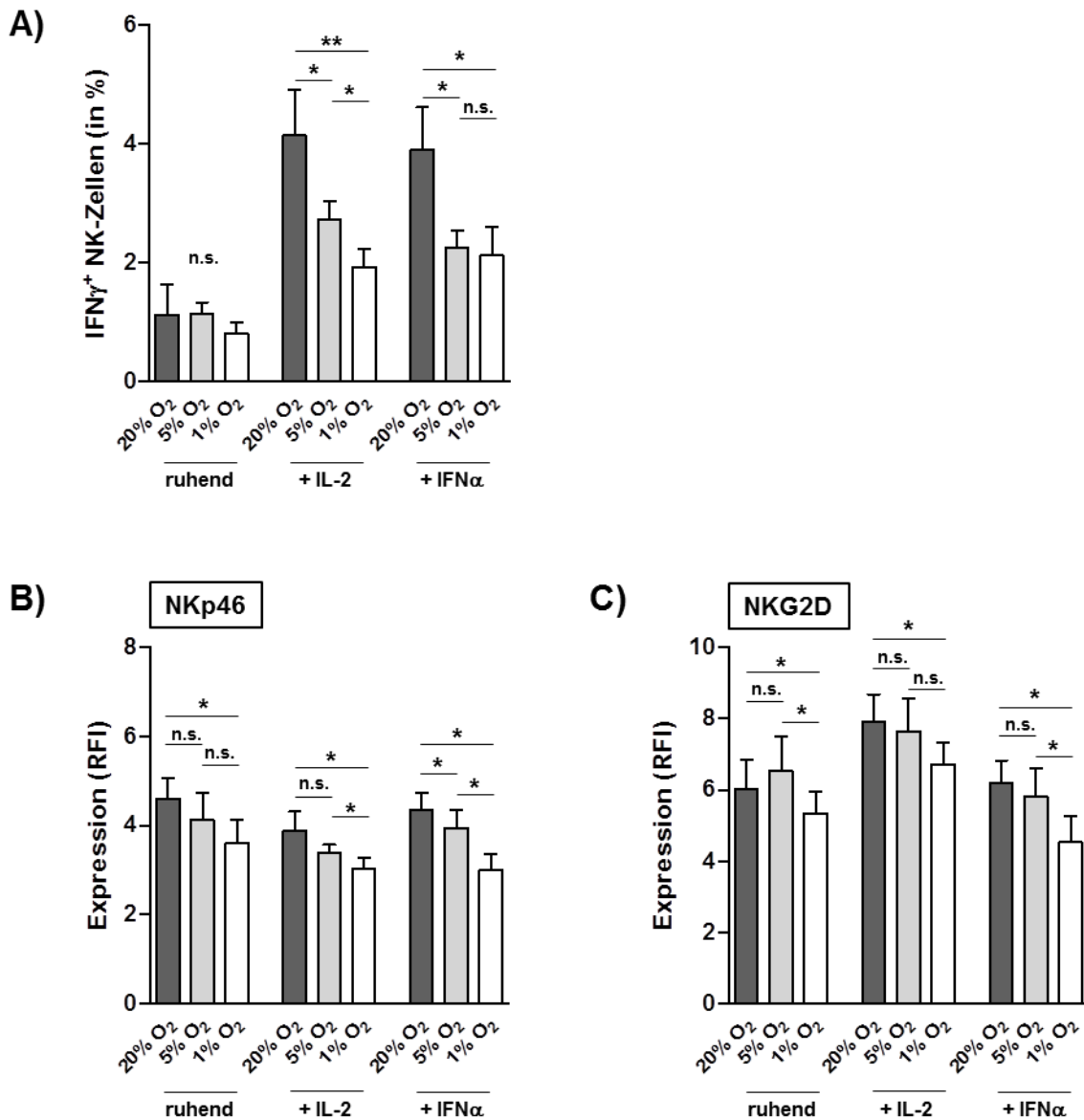
### 5.1.5 Die Auswirkung von niedrigen Sauerstoffkonzentrationen auf intrahepatische NK-Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit bisher vorgestellten Ergebnisse wurden alle mit NK-Zellen durchgeführt, die aus peripherem Blut isoliert wurden. Zur Überprüfung der physiologischen Relevanz der Untersuchungsergebnisse wurden nun die Zellen untersucht, die den niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in der Leber *in vivo* ausgesetzt sind: die intrahepatischen NK-Zellen.

Dafür wurden LIL (*liver-infiltrating lymphocytes*) aus Explantaten von HCV-Patienten isoliert, welche ca. 40 - 60% NK-Zellen enthalten. In den Auswertungen wurde immer auf die CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen gegatet.

Zunächst wurden Koinkubationsexperimente mit HuH7-A2-Replicon-Zellen durchgeführt, um die IFN $\gamma$ -Produktion der intrahepatischen NK-Zellen zu analysieren (vergleiche Kapitel 5.1.3). Hierbei zeigte sich, dass die intrahepatischen NK-Zellen – ähnlich wie die peripheren NK-Zellen von HCV-Patienten – nach Inkubation bei 5%

oder 1% O<sub>2</sub> signifikant weniger IFN $\gamma$  produzierten als die bei Normoxie kultivierten (siehe Abbildung 16A). Auch die Expression der beiden aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 (Abbildung 16B) und NKG2D (Abbildung 16C) wurde durch Inkubation in Hypoxie herunterreguliert. Damit erwiesen sich die intrahepatischen NK-Zellen von HCV-Patienten als ähnlich sensibel gegenüber niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wie die peripheren NK-Zellen derselben Patientengruppe.



**Abbildung 16: Der Einfluss von Hypoxie auf intrahepatische NK-Zellen.**

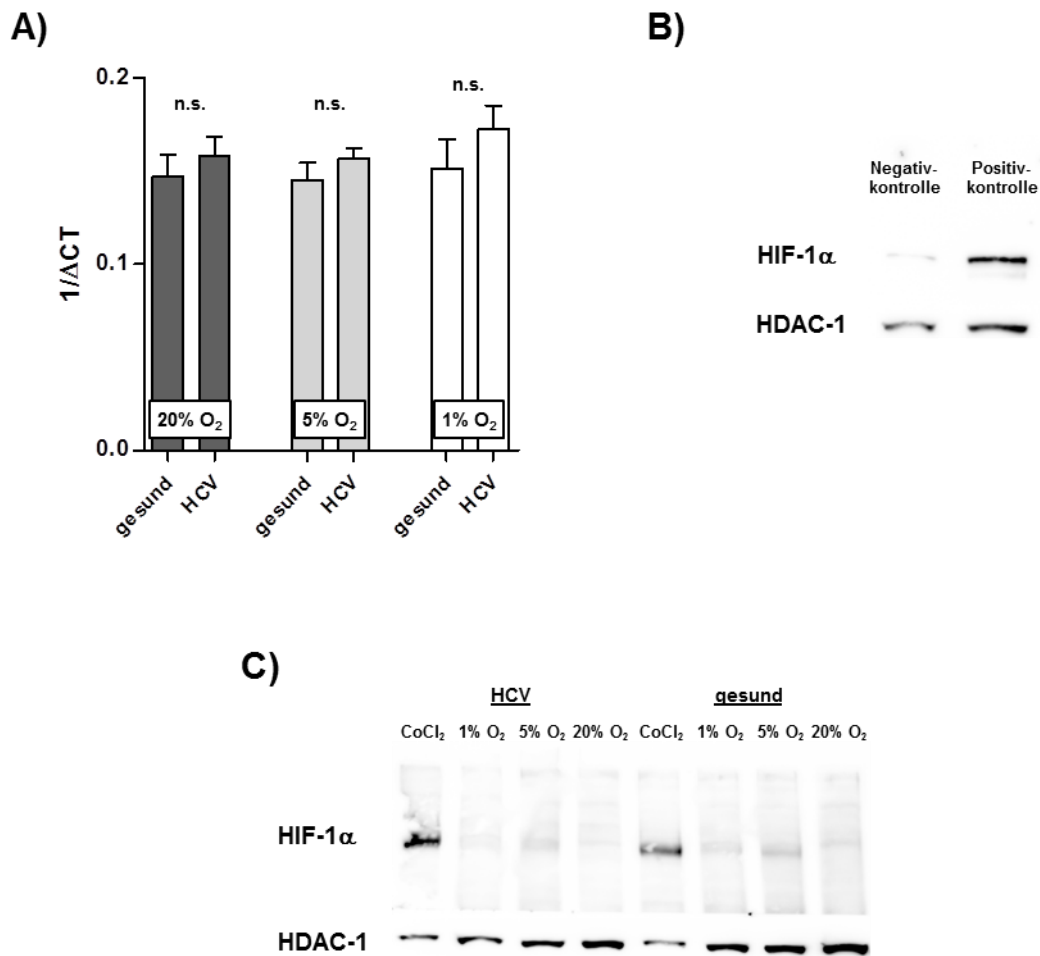
LIL (*liver-infiltrating lymphocytes*) (n = 6) wurden 16 h lang bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert und währenddessen mit IL-2 oder IFN $\alpha$  aktiviert bzw. ruhen gelassen. Anschließend wurden sie (A) mit HuH7-A2-Replicon-Zellen koinkubiert und es wurde die Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Zellen bestimmt; bzw. (B) für NKp46 und NKG2D gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. RFI, *relative fluorescence intensity*. n.s., nicht signifikant. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

---

### 5.1.6 Die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$ in NK-Zellen von Gesunden und HCV-Patienten

HIF-1 $\alpha$  wird als zentraler Transkriptionsfaktor bei Hypoxie-vermittelten Prozessen beschrieben. Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, inwieweit die funktionellen Unterschiede zwischen NK-Zellen von Gesunden und HCV-Patienten durch eine differentielle Regulation von HIF-1 $\alpha$  bedingt sind.

Dafür wurde zunächst die mRNA-Expression von *HIF-1 $\alpha$*  mittels einer qPCR untersucht. Die NK-Zellen von HCV-Patienten zeigten eine minimal erhöhte Grundexpression von *HIF-1 $\alpha$*  im Vergleich zu Gesunden, dies war jedoch statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 17A). Wie zu erwarten war, änderte sich die mRNA-Menge durch die Inkubation in Hypoxie nicht, da HIF-1 $\alpha$  posttranslational reguliert wird<sup>113,114</sup>. Deshalb wurde als nächstes die Expression des HIF-1 $\alpha$ -Proteins mittels Western Blot untersucht. Dies gestaltete sich als schwierig, da HIF-1 $\alpha$  in Normoxie innerhalb weniger Minuten degradiert wird. In einer Zelllinie, die HIF-1 $\alpha$  konstitutiv exprimiert, konnte HIF-1 $\alpha$  im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 17B). In NK-Zellen, die bei 5% O<sub>2</sub> kultiviert worden waren, konnte nur eine sehr geringe, nicht quantifizierbare HIF1 $\alpha$ -Expression nachgewiesen werden (Abbildung 17C). In Zellen, die mit dem chemischen HIF-1 $\alpha$ -Induzierer CoCl<sub>2</sub> behandelt wurden, war hingegen ein Nachweis möglich (Abbildung 17C).



**Abbildung 17: Die Expression von HIF-1 $\alpha$  in NK-Zellen.**

(A) NK-Zellen von Gesunden ( $n = 7$ ) und von HCV-Patienten ( $n = 7$ ) wurden 16 h lang bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde eine RNA-Isolation und qPCR mit *HIF-1 $\alpha$* -Primern durchgeführt. Als Housekeeping-Gen wurde  *$\beta$ -Actin* verwendet. (B) SDS-PAGE und Western Blot für HIF-1 $\alpha$  mit Kernextrakten aus EGI-1 Zellen (Positivkontrolle) und TFK-1 Zellen (Negativkontrolle). Als Kontrollprotein wurde HDAC-1 verwendet. (C) PBMC von Gesunden und von HCV-Patienten wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> bzw. mit 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> kultiviert. Mit den Kernextrakten wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot für HIF-1 $\alpha$  durchgeführt. Als Kontrollprotein wurde HDAC-1 verwendet. n.s., nicht signifikant. Die Western Blot-Experimente (B und C) wurden von Herrn Dr. rer. nat. Andreas Glässner durchgeführt.

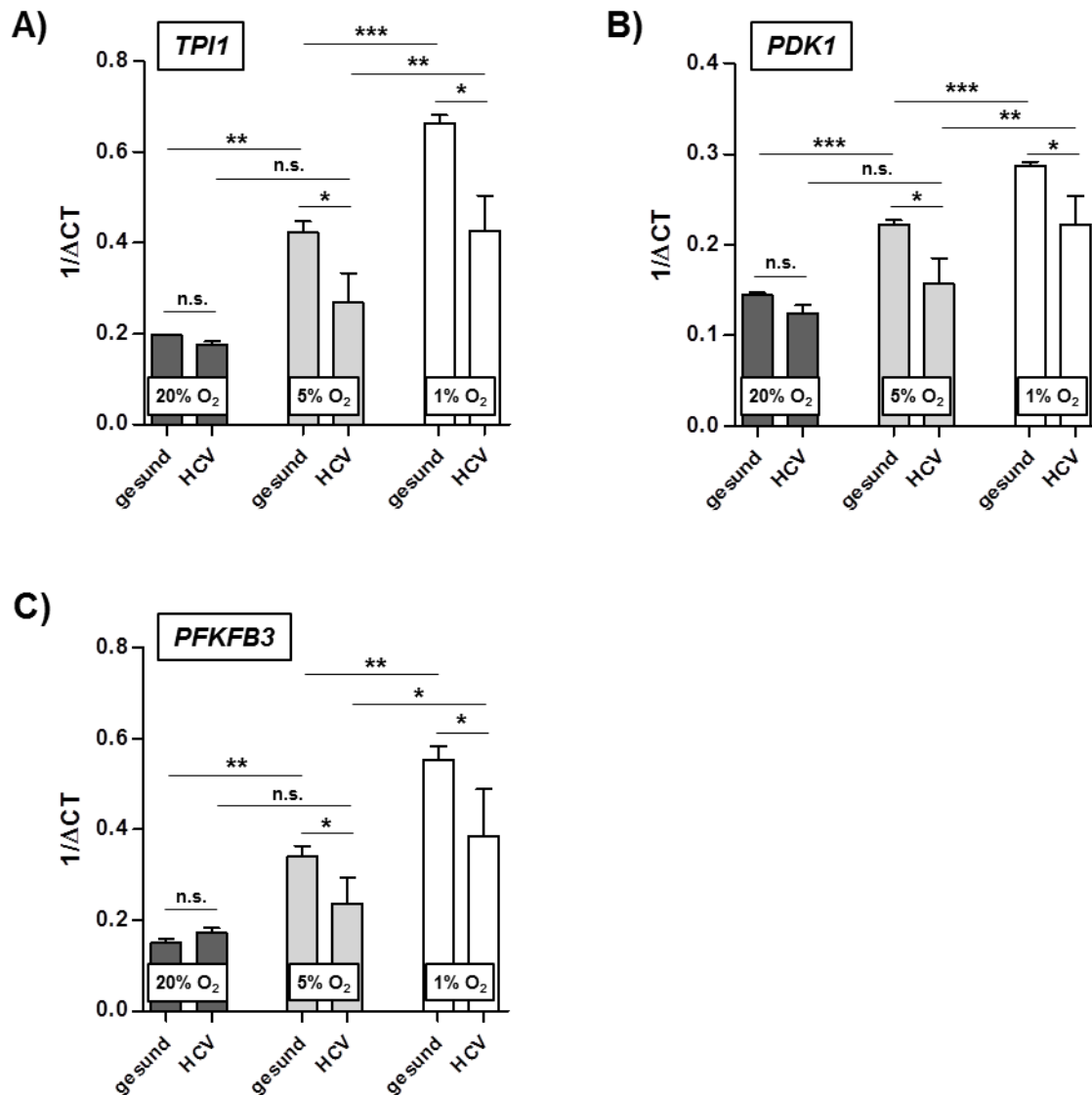


---

### 5.1.7 Die Expression von Glykolyse-Genen in NK-Zellen bei Hypoxie

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  reguliert diverse Signalwege, die es der Zelle ermöglichen, sich an niedrige Sauerstoffkonzentrationen anzupassen. Unter anderem wird der Stoffwechsel von aerober Zellatmung (oxidative Phosphorylierung) auf Glykolyse (anaerob) umgestellt.

Deshalb untersuchten wir als nächstes, wie die für den Glykolyse-Stoffwechselweg wichtigen Gene Triosephosphat-Isomerase 1 (*TPI1*), Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (*PDK1*) und 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase (*PFKFB3*) durch Hypoxie reguliert werden. Dafür wurden NK-Zellen von Gesunden und HCV-Patienten nach Inkubation in Hypoxie oder Normoxie mittels qPCR untersucht. Bei gesunden NK-Zellen konnte ein Anstieg der Expression dieser Gene nach Inkubation bei 5% sowie ein weiterer Anstieg bei 1% O<sub>2</sub> beobachtet werden. Dies war für alle untersuchten Gene der Fall (siehe Abbildung 18). Auch bei HCV-Patienten wurde ein Anstieg nach Inkubation in Hypoxie beobachtet. Dieser war jedoch signifikant niedriger als bei gesunden NK-Zellen. Dies deutet auf eine schlechtere Adaption der HCV-NK-Zellen an die veränderten Sauerstoffkonzentrationen hin.



**Abbildung 18: NK-Zellen von HCV-Patienten können ihren Stoffwechsel schlechter an niedrige Sauerstoffkonzentrationen anpassen.**

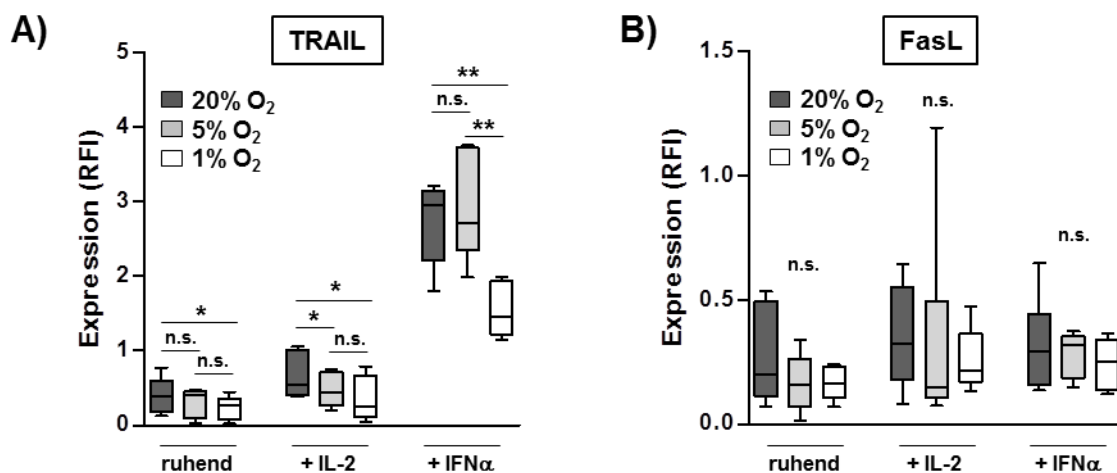
NK-Zellen von Gesunden ( $n = 4$ ) und HCV-Patienten ( $n = 4$ ) wurden 16 h lang bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde eine RNA-Isolation und qPCR mit Primern für *TPI1* (A), *PDK1* (B) und *PFKFB3* (C) durchgeführt. Als Housekeeping-Gen wurde  $\beta$ -Actin verwendet. n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.1.8 Der Einfluss von Hypoxie auf die antifibrotische Aktivität von NK-Zellen

In der HCV-Infektion spielt neben der antiviralen Aktivität die antifibrotische Aktivität von NK-Zellen eine wichtige Rolle. Diese führen sie durch das Abtöten von aktivierten hepatischen Sternzellen (HSC) aus, die für die Entstehung einer Fibrose verantwortlich sind. Als wichtige Mediatoren der NK-Zell-vermittelten HSC-Abtötung

gelten TRAIL und Fas-Ligand (FasL), welche über entsprechende Rezeptoren auf den HSC eine Apoptose induzieren können<sup>70–73</sup>.

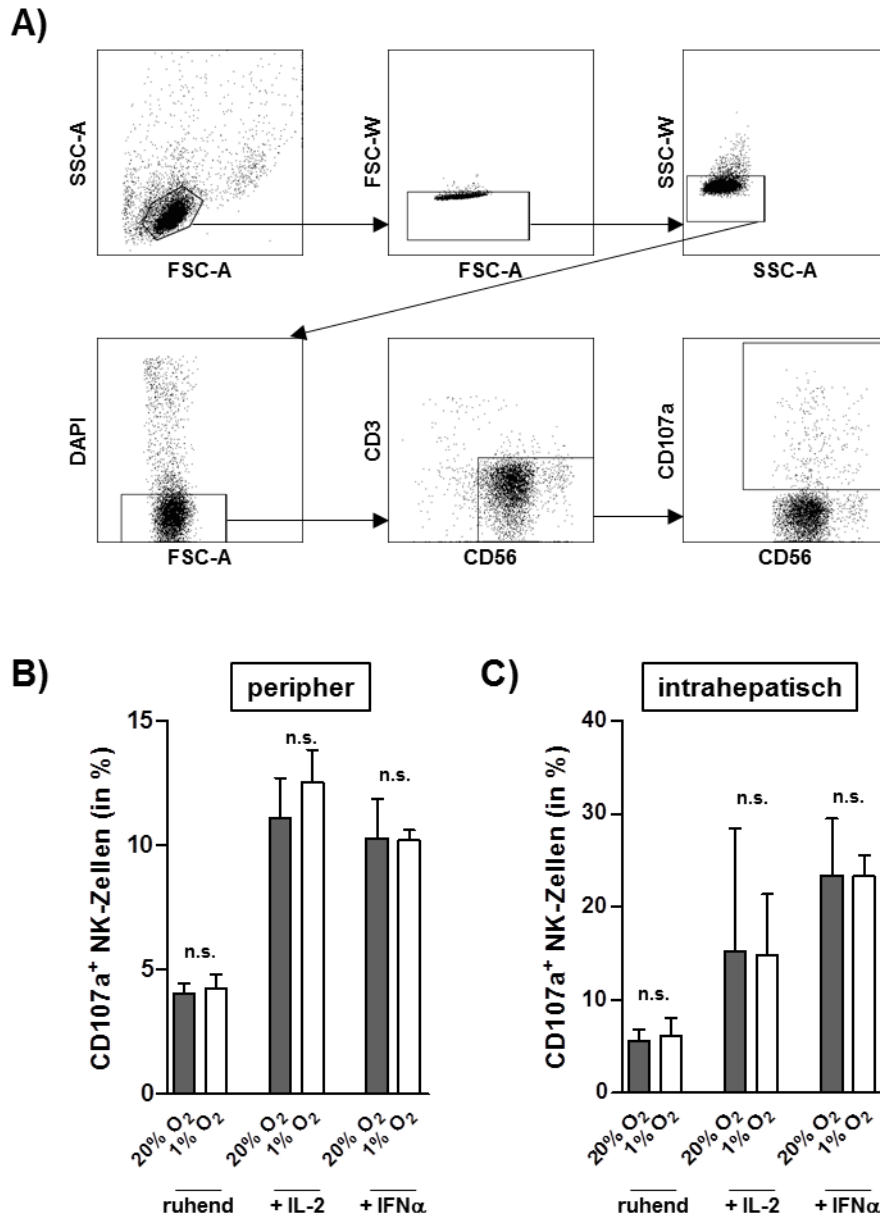
Die Expression dieser beiden Rezeptoren wurde auf HCV-NK-Zellen, die zuvor in Hypoxie oder Normoxie inkubiert worden waren, analysiert. Die Untersuchungen ergaben eine signifikante Herabregulierung von TRAIL nach Inkubation bei 5% oder 1% O<sub>2</sub> (siehe Abbildung 19A). Die Expression von FasL wurde hingegen nicht verändert (Abbildung 19B).



**Abbildung 19: Die Expression von TRAIL und FasL auf NK-Zellen.**

NK-Zellen von HCV-Patienten ( $n = 6$ ) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und währenddessen mit IL-2 oder IFN $\alpha$  aktiviert bzw. ruhen gelassen. Anschließend wurde eine Oberflächenfärbung mit TRAIL und FasL Antikörpern durchgeführt und die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. RFI, *relative fluorescence intensity*. n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Das Abtöten der HSC durch die NK-Zellen erfolgt unter anderem durch die Ausschüttung zytotoxischer Granula. Dabei werden CD107a-Moleküle auf die Zelloberfläche gebracht, die dann im Durchflusszytometer nachgewiesen werden können. Um die zytotoxische Aktivität der bei Hypoxie inkubierten NK-Zellen nachzuweisen, wurden diese mit HSC koinkubiert und anschließend wurde der Anteil CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen bestimmt. In Abbildung 20A ist die Gating-Strategie dargestellt. Weder bei peripheren (Abbildung 20B) noch bei intrahepatischen (Abbildung 20C) NK-Zellen von HCV-Patienten konnte ein Einfluss von Hypoxie auf die zytotoxische Aktivität gegenüber HSC nachgewiesen werden.

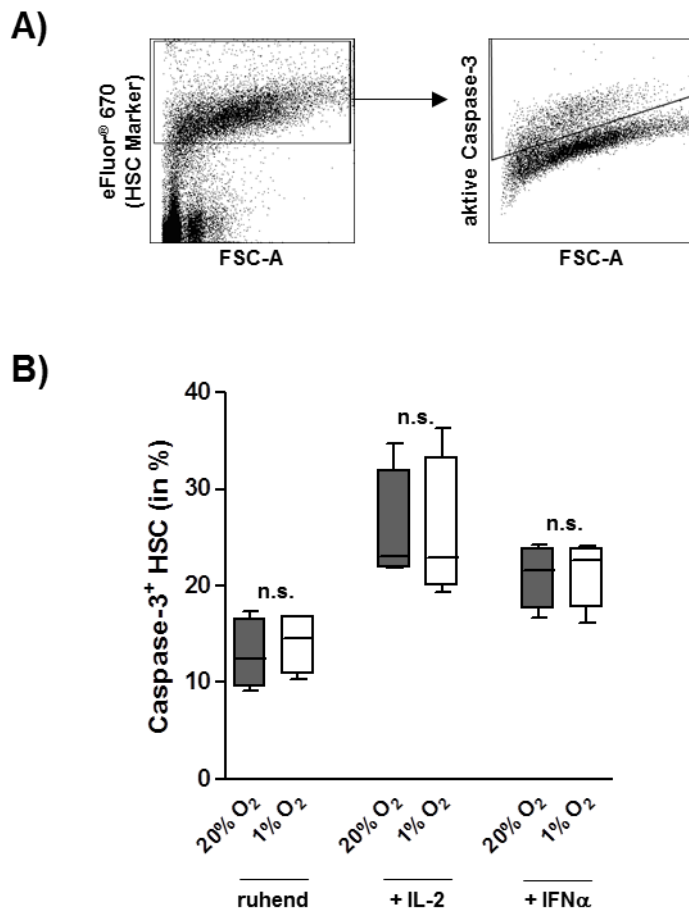


**Abbildung 20: Der Einfluss von Hypoxie auf den Anteil CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen bei Hypoxie.**

(A) Gating-Strategie: Setzen des Lymphozytengates nach Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A), anschließend Herausgaten der Dupletten (FSC-A gg. FSC-W und SSC-A gg. SSC-W). Bestimmung der lebenden Zellen mittels DAPI-Färbung, Definition der NK-Zellen als CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, und zuletzt Gating der CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen. Periphere (B, n = 4) und intrahepatische (C, n = 6) NK-Zellen von HCV-Patienten wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für 6 h unter Zugabe eines Golgihemmers mit HSC koinkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. n.s., nicht signifikant. Die Experimente mit peripheren NK-Zellen (B) wurden von Herrn Dr. rer. nat. Andreas Glässner durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit, die Zytotoxizität von NK-Zellen zu bestimmen, ist der direkte Nachweis von Apoptose in den Zielzellen. Zu diesem Zweck wurden NK-Zellen mit HSC bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> koinkubiert. Im Anschluss wurde in den HSC intrazellulär die aktive Caspase-3 als Bestandteil des Apoptosesignalwegs

angefärbt und der Anteil der Caspase-3<sup>+</sup> Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. In Abbildung 21A wird die Gating-Strategie dargestellt. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen der CD107a-Färbung (Abbildung 20) ergaben auch diese Experimente, dass der Anteil der apoptotischen HSC nach Koinkubation mit HCV-NK-Zellen nicht durch Hypoxie verändert wird (Abbildung 21B).



**Abbildung 21: Die NK-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion bei HSC nach Inkubation in Hypoxie.**

(A) Gating-Strategie: Gaten der mit eFluor 670 angefärbten HSC, dann Gating der Caspase-3<sup>+</sup> HSC. NK-Zellen von HCV-Patienten (n = 4) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für 6 h mit den HSC koinkubiert. Anschließend wurden die Zellen intrazellulär für Caspase-3 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. n.s., nicht signifikant. Die Experimente wurden von Herrn Dr. rer. nat. Andreas Glässner durchgeführt.

---

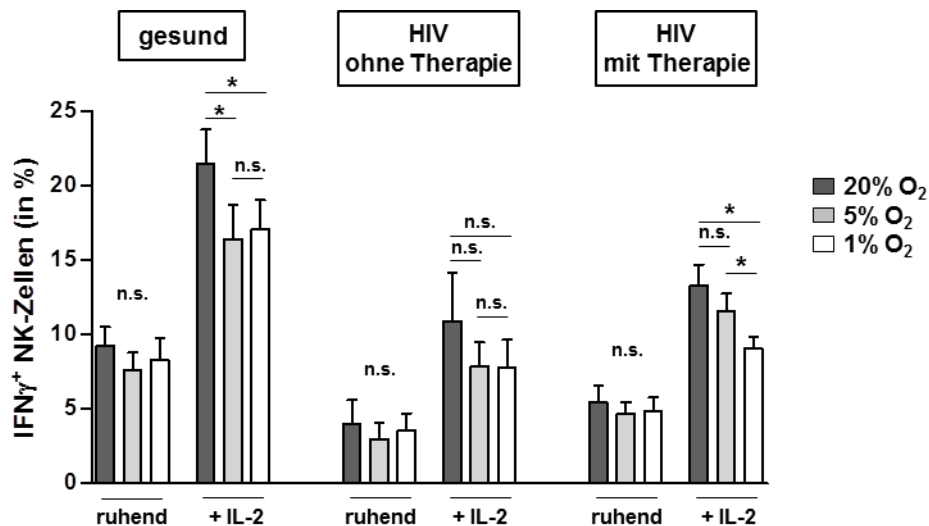
## 5.2 Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HIV-Infektion

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HIV-Infektion beleuchtet werden. Auch bei der HIV-Infektion herrschen am Wirkungsort der NK-Zellen, dem Blut, niedrigere Sauerstoffkonzentrationen als in der Raumluft, und wie bei den Studien zu NK-Zellen bei der HCV-Infektion arbeiteten alle bisher durchgeführten Untersuchungen mit atmosphärischen Zellkulturbedingungen.

### 5.2.1 Die IFN $\gamma$ -Produktion bei NK-Zellen von HIV-Patienten bei Hypoxie

Für die im Folgenden dargestellten Koinkubationsversuche wurde die K562-Zelllinie verwendet. Diese aus einem hämatopoietischen Tumor gewonnene Zelllinie exprimiert keine MHC-Moleküle und eignet sich deshalb sehr gut als Zielzelle für NK-Zellen.

Zunächst wurden NK-Zellen von Gesunden und von HIV-Patienten mit und ohne Therapie für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Im Anschluss daran wurden sie mit K562-Zellen koinkubiert und intrazellulär für IFN $\gamma$  gefärbt. Dabei stellte sich heraus, dass Hypoxie weder bei Gesunden noch bei HIV-Patienten einen Einfluss auf die IFN $\gamma$ -Produktion von ruhenden, nicht aktivierten NK-Zellen hatte (Abbildung 22). Wurden die Zellen hingegen während der Präinkubation mit IL-2 aktiviert, sank der Anteil der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> NK-Zellen durch den Einfluss von Hypoxie. Dies war bei allen drei Gruppen der Fall, bei den HIV-Patienten ohne Therapie war der Effekt jedoch nicht signifikant. Dies lag möglicherweise an den initial niedrigeren Ausgangswerten bei dieser Patientengruppe.



**Abbildung 22: Der Einfluss von Hypoxie auf die IFN $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen von Gesunden und HIV-Patienten.**

NK-Zellen von gesunden Spendern und HIV-Patienten mit und ohne Therapie (jeweils  $n = 7$ ) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und währenddessen durch IL-2 aktiviert oder ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit K562-Zellen unter Zugabe von Brefeldin A koinkubiert, um eine Akkumulation der Zytokine im endoplasmatischen Retikulum zu induzieren. Danach wurden die NK-Zellen intrazellulär für IFN $\gamma$  gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.2.2 Die zytotoxische Aktivität von HIV-NK-Zellen bei Hypoxie

Anschließend sollte überprüft werden, ob die durch Hypoxie verursachte Hemmung der IFN $\gamma$ -Produktion mit einer verringerten Zytotoxizität einhergeht. Dafür wurden erneut NK-Zellen von Gesunden und von HIV-Patienten mit und ohne Therapie für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Im Anschluss daran wurden sie ebenfalls mit K562-Zellen koinkubiert und es wurde der Anteil CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen als Maß für die Zytotoxizität bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Inkubation bei Hypoxie keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen hatte (Abbildung 23). Dies war sowohl bei ruhenden als auch bei IL-2-aktivierten Zellen der Fall, und zwar bei jeder der drei Patientengruppen.

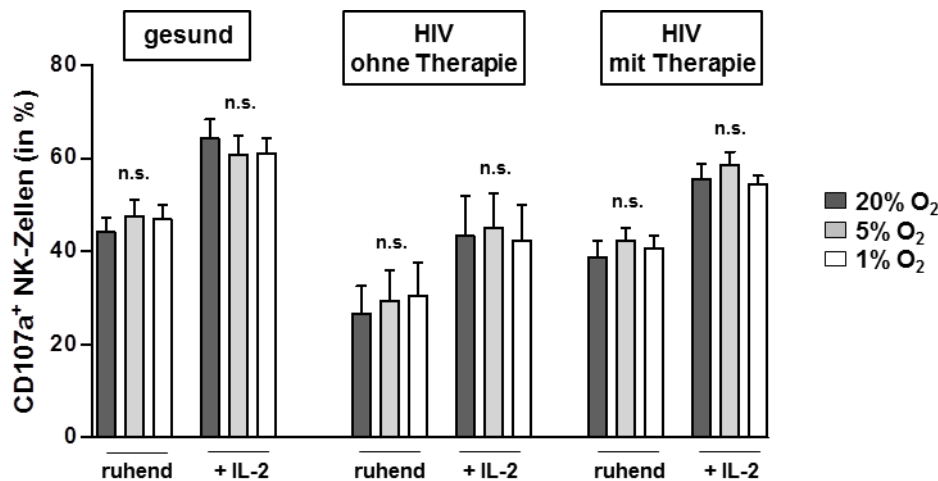


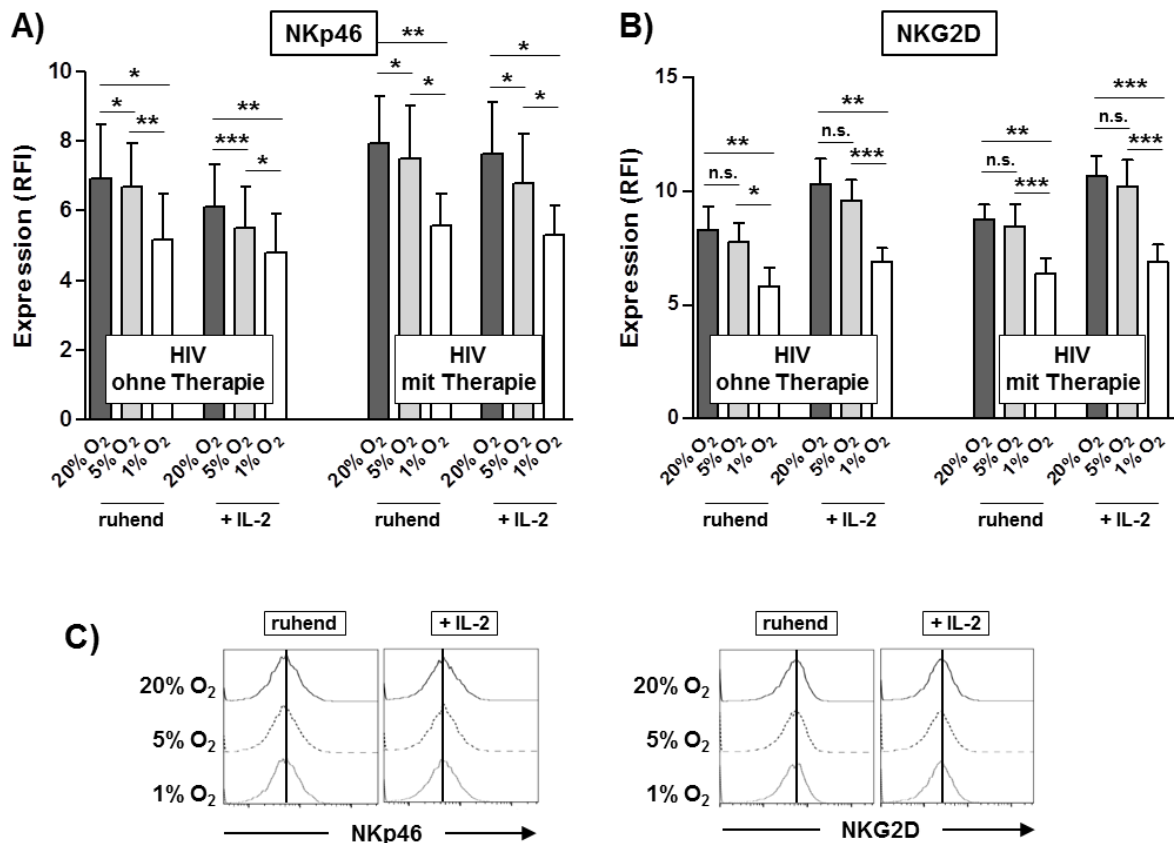
Abbildung 23: Hypoxie besitzt keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von HIV-NK-Zellen.

NK-Zellen von gesunden Spendern und HIV-Patienten mit und ohne Therapie (jeweils  $n = 7$ ) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und währenddessen durch IL-2 aktiviert oder ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit K562-Zellen unter Zugabe eines Golgihemmers kokubiert. Danach wurden die Zellen für CD107a gefärbt und der Anteil der positiven Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.2.3 Die NK-Zellrezeptorexpression auf HIV-NK-Zellen bei Hypoxie

NK-Zellen regulieren ihre Aktivität mit Hilfe verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren. Die aktivierenden Rezeptoren NKp46 und NKG2D spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der HIV-Infektion und ihrer Progression<sup>84,123–125</sup>. Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, ob Hypoxie einen Einfluss auf die Expression der beiden Rezeptoren auf NK-Zellen von HIV-Patienten hat. Wie auf Abbildung 24A+B dargestellt, werden sowohl NKp46 als auch NKG2D durch Inkubation bei 5% oder 1% O<sub>2</sub> herunterreguliert. Dies war bei ruhenden und IL-2-aktivierten Zellen der Fall, unabhängig davon ob die Patienten eine Therapie erhalten oder nicht. Bei gesunden Spendern hingegen veränderte sich die Expression der beiden Rezeptoren durch die Hypoxie nicht (Abbildung 24C).

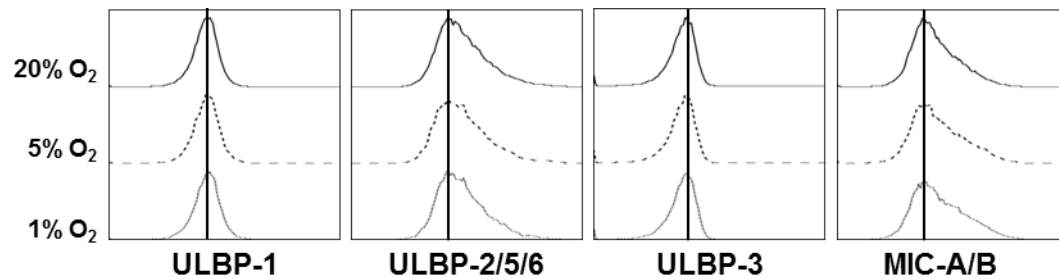




**Abbildung 24: Die NK-Zell-Rezeptorexpression bei HIV-Patienten wird durch Hypoxie vermindert.**

NK-Zellen von gesunden Spendern und HIV-Patienten mit und ohne Therapie (jeweils  $n = 7$ ) wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert und währenddessen durch IL-2 aktiviert oder ruhen gelassen. Danach wurden die Zellen für NKp46 (A) und NKG2D (B) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (C) Histogramme eines gesunden Spenders, repräsentativ für  $n = 7$ . n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die NKG2D-Liganden MIC-A/B und ULBP1-6 werden in diversen Zellen als Reaktion auf Stress hochreguliert und können so NK-Zellen aktivieren. Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression dieser Liganden auf K562-Zellen sollte als nächstes aufgeklärt werden. Es konnte jedoch kein Hinweis auf eine durch Hypoxie veränderte Ligandenexpression auf K562-Zellen gefunden werden (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Hypoxie verändert nicht die Expression von NK-Zell-Rezeptorliganden auf K562-Zellen.**

K562-Zellen wurden für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde im Durchflusszytometer die Expression von ULBP-1, ULBP-2/5/6, ULBP-3 und MIC-A/B bestimmt. Die Histogramme sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

#### 5.2.4 Die Expression von Glykolyse-Genen in HIV-NK-Zellen bei Hypoxie

Analog zu den Versuchen aus dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 5.1.7) sollte auch bei NK-Zellen von HIV-Patienten untersucht werden, inwieweit sie ihren Metabolismus an veränderte Sauerstoffbedingungen anpassen können. Dafür wurde cDNA von NK-Zellen generiert, die für 16 h bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> inkubiert worden waren und währenddessen mit IL-2 aktiviert oder ruhen gelassen wurden. Die cDNA wurde hinsichtlich der für die Glykolyse wichtigen Gene Triosephosphatisomerase 1 (*TPI1*), Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (*PDK1*) und 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase (*PFKFB3*) untersucht (Abbildung 26).

In allen untersuchten Probanden wurde eine Steigerung der Genexpression bei Kultivierung in Hypoxie nachgewiesen. Der Anstieg war jedoch in den drei Gruppen unterschiedlich deutlich ausgeprägt. Gesunde Spender sowie HIV-Patienten mit Therapie unterschieden sich in ihrer Genexpression nicht signifikant. Dies war für alle drei untersuchten Gene und sowohl für ruhende als auch für IL-2-stimulierte Zellen der Fall. Die NK-Zellen der HIV-Patienten ohne Therapie verhielten sich jedoch anders: der hypoxievermittelte Anstieg der Genexpression fiel hier weniger stark aus als in den beiden Vergleichsgruppen. Dies war nicht für alle Konditionen und bei allen drei Genen signifikant. Jedoch war in allen Konditionen eine Tendenz zu einer verringerten Hochregulation bei dieser Patientengruppe, vor allem bei der Expression von PDK-1 und PFKFB3, zu erkennen.

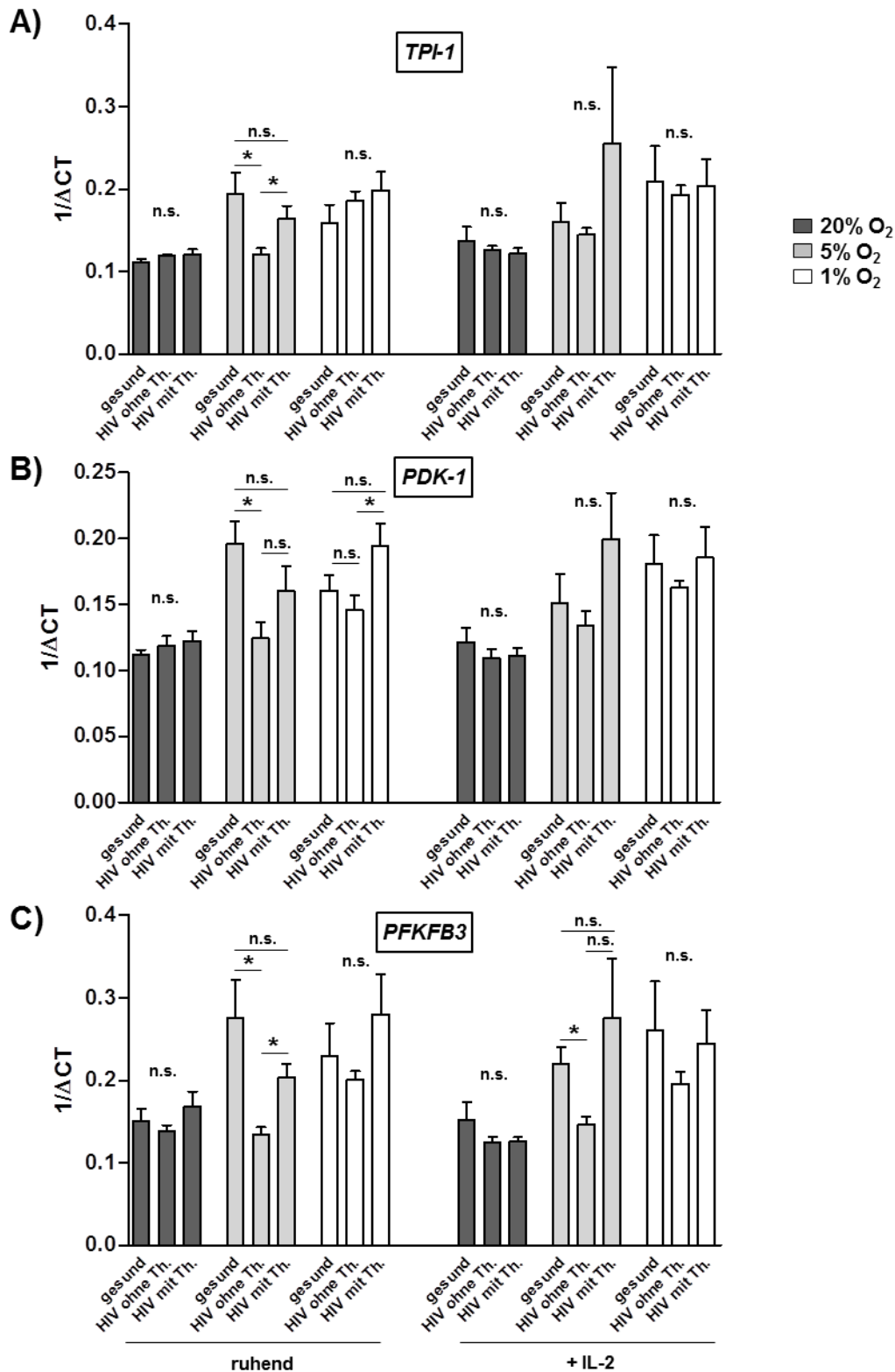


Abbildung 26: Die Expression von Glykolysegenen nach Inkubation in Hypoxie.

NK-Zellen von Gesunden ( $n = 4$ ) und HIV-Patienten mit ( $n = 4$ ) und ohne ( $n = 4$ ) Therapie wurden 16 h lang bei 20%, 5% oder 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde eine RNA-Isolation und qPCR mit Primern für *TPI1* (A), *PDK1* (B) und *PFKFB3* (C) durchgeführt. Als Housekeeping-Gen wurde  $\beta$ -Actin verwendet. n.s., nicht signifikant. \*  $p < 0,05$ . Die qPCRs wurden von Frau Sahar Fazeli durchgeführt.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HCV-Infektion

NK-Zellen sind in zahlreichen Studien als wichtige Mediatoren antiviraler und antifibrotischer Mechanismen bei der HCV-Infektion beschrieben worden. Ihr zentraler Wirkungsort dabei ist die Leber, in der eine Sauerstoffkonzentration von durchschnittlich 5% vorherrscht.

Trotzdem sind alle bisherigen Studien über NK-Zellen bei der HCV-Infektion bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen durchgeführt worden. Deshalb sollte in diesem Teil der Arbeit der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen bei der HCV-Infektion beleuchtet werden.

Zunächst wurde die antivirale Aktivität der NK-Zellen untersucht. Gesunde NK-Zellen zeigten, wenn sie bei 5% O<sub>2</sub> kultiviert wurden, keine Veränderung ihrer antiviralen Aktivität. Dies war sowohl für ruhende als auch für zytokinstimulierte Zellen der Fall. Gesunde NK-Zellen scheinen somit in der Lage zu sein, auch unter der physiologisch niedrigen Sauerstoffkonzentration in der Leber eine effektive antivirale Immunantwort auszubilden.

Ein Merkmal von Entzündungen ist die pathophysiologische weitere Verringerung der Sauerstoffkonzentration. Es gibt Hinweise darauf, dass dabei die Hypoxie-induzierte Immunsuppression einen Mechanismus des Körpers darstellt, um umliegendes gesundes Gewebe vor einer überschießenden Immunantwort zu schützen<sup>96,126,127</sup>. Andererseits kann dies aber dazu führen, dass immunkompetente Zellen in ihrer Immunantwort gebremst werden und Pathogene oder Tumorzellen nicht mehr zuverlässig eliminieren können<sup>128-130</sup>.

In Übereinstimmung zu diesen Studien zeigte sich eine verminderte anti-HCV-Aktivität gesunder NK-Zellen, wenn diese in einer simulierten inflammatorischen Umgebung (1% O<sub>2</sub>) kultiviert wurden. Dies war jedoch nur der Fall, wenn die Zellen durch Zytokine wie IL-2 präaktiviert worden waren. Eine Untersuchung der IL-2-Rezeptoren CD25 und CD122 sowie der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4, die an Signalwegen von Zytokinantworten beteiligt sind, ergab keine Hinweise auf Veränderungen durch Hypoxie. Was die Ursache für die verminderte Stimulierbarkeit der NK-Zellen bei 1% O<sub>2</sub> und die verringerte antivirale Aktivität aktivierter Zellen ist,

muss also noch in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Eine mögliche Erklärung könnte in der Tatsache liegen, dass aktivierte Zellen durch Proliferation und das Ausüben von Effektorfunktionen mehr Energie benötigen als ruhende Zellen<sup>131,132</sup>. Da der Stoffwechsel unter sauerstoffarmen Bedingungen von der hocheffizienten Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung auf die weniger effiziente Glykolyse mit Laktatgärung umgestellt wird, reicht möglicherweise bei aktivierten Zellen die verringerte Energiezufuhr nicht mehr aus, um die antivirale Funktion voll zu erfüllen. Eine weitere Möglichkeit ist die hypoxievermittelte Beeinträchtigung anderer downstream-Signalmoleküle des IL-2- oder IFN- $\alpha$ -Rezeptors.

Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die antiviralen Funktionen gesunder NK-Zellen durch verringerte Sauerstoffkonzentrationen während einer fortschreitenden Entzündung gehemmt werden, was die Entstehung einer chronischen Infektion begünstigen könnte.

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Sekretion von IFN $\gamma$  eine zentrale Rolle bei der anti-HCV-Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK-Zellen spielt<sup>28,52,61,133</sup>. So wurde gezeigt, dass zellfreie Überstände von NK-Zellen die Virusreplikation hemmen können und dass dieser Effekt durch blockierenden IFN $\gamma$ -Antikörper aufgehoben wird<sup>28</sup>. In den virusinfizierten Zellen bewirkt IFN $\gamma$  eine Aktivierung innerer antiviraler Mechanismen wie z.B. der intrazellulären Produktion von Typ I Interferonen. Dies hat die Hemmung der Virusreplikation zur Folge.

Eine mögliche Ursache für die hypoxieinduzierte verminderte antivirale Aktivität gesunder NK-Zellen könnte also eine Verringerung der IFN $\gamma$ -Sensitivität der Huh7-Replicon-Zellen sein. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Einfluss von Hypoxie auf die Hemmung der HCV-Replikation durch rekombinantes IFN $\gamma$  festgestellt werden. Die Huh7-Replicon-Zellen sowie die antivirale Aktivität des IFN $\gamma$  scheinen also nicht durch Hypoxie beeinflusst zu werden.

Im Gegensatz dazu wurde von Naldini et al. in einem VSV (*vesicular stomatitis virus*)-Modell gezeigt, dass die antivirale Aktivität von IFN $\gamma$  unter Hypoxiebedingungen signifikant gesteigert wird<sup>134</sup>. Diese Diskrepanz liegt möglicherweise an den unterschiedlichen Virusmodellen. Außerdem bestimmten Naldini et al. nicht direkt die Virusreplikation in der infizierten Zelle, sondern den durch das Virus induzierten

zytopathischen Effekt. Somit ist in jener Arbeit auch ein direkter Einfluss von Hypoxie auf die virusinfizierten Zellen oder die Virusreplikation nicht auszuschließen.

Interessanterweise gibt es auch zum Einfluss der Hypoxie auf die Virusreplikation unterschiedliche Berichte. So zeigten Vassilaki et al., dass die Virusreplikation im HCV-Replicon-System durch Hypoxie gesteigert wird<sup>135</sup>. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden, da hier Hypoxie allein (ohne NK-Zellen) keinen Effekt auf die Virusreplikation im Replicon-System hatte. Vassilaki und Kollegen beschrieben aber auch, dass deutliche Effekte erst bei Inkubationszeiten ab 24 h auftraten, während in dieser Arbeit eine Inkubationszeit von 16 h verwendet wurde. Dies könnte die unterschiedlichen Beobachtungen erklären.

Da weder die antivirale Aktivität des  $\text{IFN}\gamma$  noch die  $\text{IFN}\gamma$ -Sensibilität der Huh7-Replicon-Zellen durch Inkubation in Hypoxie verändert wurden, lag die Hypothese nahe, dass die hypoxievermittelte Hemmung der antiviralen Aktivität durch eine Störung der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion auf Seiten der NK-Zellen verursacht wird.

Wurden NK-Zellen mit Huh7-Replicon-Zellen koinkubiert, wurde der Anteil  $\text{IFN}\gamma^+$  NK-Zellen bei ruhenden NK-Zellen nicht durch Hypoxie verändert. Dies stimmt überein mit den oben diskutierten Ergebnissen der Experimente zur antiviralen Aktivität. Wurden die Zellen jedoch mit IL-2 oder  $\text{IFN}\alpha$  aktiviert, war die Anzahl der  $\text{IFN}\gamma^+$  NK-Zellen bei Inkubation in Hypoxie signifikant verringert. Interessanterweise war dies jedoch sowohl bei 5% als auch bei 1%  $\text{O}_2$  der Fall, wohingegen die antivirale Aktivität erst bei 1%  $\text{O}_2$ , also einer nachgestellten Entzündungsumgebung, verringert war. Diese Unterschiede könnten dadurch bedingt sein, dass  $\text{IFN}\gamma$  nicht der einzige Faktor ist, der bei der Hemmung der Virusreplikation eine Rolle spielt.

Diese Vermutung wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass selbst mit zellfreien Überständen von NK/Huh7-Replicon-Koinkubationsansätzen, in denen per ELISA kein  $\text{IFN}\gamma$  nachweisbar war, eine Hemmung der Virusreplikation in Huh7-Replicon-Zellen erzielt werden konnte. Wie oben beschrieben könnte dies zum einen bedeuten, dass neben  $\text{IFN}\gamma$  weitere, bisher nicht identifizierte lösliche Faktoren bei der Replikationshemmung wichtig sind.  $\text{TNF}\alpha$  beispielsweise, welches ebenfalls von NK-Zellen produziert werden kann, besitzt neben seiner zytotoxischen Aktivität die Fähigkeit, die Replikation einiger Viren zu hemmen, wie z.B. HIV, HBV (Hepatitis B-Virus) und Influenzavirus<sup>136–138</sup>. Bei HCV-infizierten Hepatozyten wurde gezeigt, dass intrinsisch gebildetes  $\text{TNF}\alpha$  die zelleigene Interferon-Produktion stimulieren und somit die Virusreplikation hemmen kann<sup>139</sup>. Möglicherweise könnte also auch

extrinsisch von NK-Zellen gebildetes  $\text{TNF}\alpha$  die Virusreplikation hemmen und somit die antivirale Aktivität von Überständen erklären, in denen kein  $\text{IFN}\gamma$  nachgewiesen werden konnte. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentrationen unterhalb der ELISA-Detektionsgrenze bereits ausreichen, um die Virusreplikation zu hemmen.

Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist die Tatsache, dass NK-Zellen von HCV-Patienten anders auf Hypoxie reagieren als Zellen von gesunden Spendern.

Zunächst konnte beobachtet werden, dass selbst ruhende HCV-NK-Zellen durch die Inkubation in Hypoxie in ihrer antiviralen Aktivität beeinträchtigt wurden. Dies war bei gesunden NK-Zellen nicht der Fall. Ein möglicher Grund dafür ist die dauerhafte Stimulation von NK-Zellen durch proinflammatorische Zytokine, die in der entzündeten Leber vor allem von dendritischen Zellen und infizierten Hepatozyten sezerniert werden<sup>65,140,141</sup>. Wie oben bereits diskutiert benötigen aktivierte Zellen mehr Energie als ruhende Zellen<sup>131,132</sup>. Angesichts der unter sauerstoffarmen Bedingungen notwendigen Umstellung der Energiegewinnung auf die wenig effiziente Glykolyse mit Lactatgärung könnte somit die gesteigerte Hypoxiesensibilität der HCV-NK-Zellen darauf beruhen, dass intrazellulär nicht genug Energie für die Ausübung ihrer antiviralen Funktion zur Verfügung steht.

Passend hierzu war die Anzahl  $\text{IFN}\gamma^+$  HCV-NK-Zellen nach Inkubation unter Hypoxie verringert. Dies war, im Gegensatz zu den Gesunden, auch bei ruhenden Zellen der Fall. Da diese Ergebnisse nur eine Aussage über die Anzahl der positiven Zellen treffen, wurde zusätzlich der Median der Fluoreszenzintensität bestimmt, d.h. das Ausmaß der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion pro Zelle. Hier offenbarten sich weitere wichtige Unterschiede zwischen HCV-Patienten und Gesunden. Die NK-Zellen der HCV-Patienten besaßen eine niedrigere Grundexpression von  $\text{IFN}\gamma$  bei Normoxie. Dies stimmt überein mit der Erkenntnis, dass NK-Zellen von HCV-Patienten eine durch chronische  $\text{IFN}\alpha$ -Stimulation vermittelte verringerte Fähigkeit zur Zytokinproduktion aufweisen<sup>65-67</sup>. Außerdem wurde die Expression stärker durch Hypoxie beeinträchtigt als bei gesunden NK-Zellen, was eine weitere Ursache für die stärkere Sensibilität der antiviralen Aktivität der HCV-NK-Zellen gegenüber Hypoxie darstellt.

Ein dritter Unterschied zwischen NK-Zellen von Gesunden und HCV-Patienten lag in dem Einfluss von Hypoxie auf die NK-Zellrezeptor-Expression. Die aktivierenden Rezeptoren NKp46 und NKG2D wurden auf HCV-NK-Zellen bei Inkubation in 5% und

1% O<sub>2</sub> schrittweise herunterreguliert, wohingegen bei den gesunden NK-Zellen keine Veränderung detektiert wurde. Beide Rezeptoren sind involviert in die NK-zellvermittelte Hemmung der HCV-Replikation<sup>52,61,62</sup>. Zusätzlich korreliert die Expression beider Rezeptoren mit der spontanen und der therapie-induzierten Ausheilung einer HCV-Infektion<sup>52,53,142</sup>. Deshalb könnte die stärkere hypoxievermittelte Inhibierung von HCV-NK-Zellen durch die Herabregulation von NKp46 und NKG2D bedingt sein.

Die Expression von NKp46 und NKG2D wird durch die beiden Transkriptionsfaktoren RUNX3 und STAT3 reguliert<sup>143,144</sup>. Für beide Faktoren wurde gezeigt, dass sie durch Hypoxie inhibiert werden<sup>145,146</sup>. Dies geschieht im Fall von STAT3 über eine Induzierung von SOCS3 und im Fall von RUNX3 über hypoxie-induziertes Silencing. Somit könnte dies einen Mechanismus der hypoxievermittelten Herabregulation der beiden aktivierenden NK-Zellrezeptoren darstellen. Interessanterweise wurde aber eine Aktivierung und höhere Expression von STAT3 in der Leber von HCV-Patienten nachgewiesen<sup>147,148</sup>. Für RUNX3 ist nichts dergleichen bekannt. Was also die Ursache dafür ist, dass die Rezeptoren nur in HCV-NK-Zellen herabreguliert werden, muss noch in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wird in zwei anderen Publikationen eine durch Hypoxie veränderte Rezeptorexpression auch für gesunde NK-Zellen beschrieben. Sarkar et al. beschreiben eine Herabregulation von NKG2D nach 16 h in 0% O<sub>2</sub>, wohingegen die NKp46-Expression unverändert bleibt<sup>108</sup>. Diese Gruppe nutzte allerdings NK-Zellen aus Buffy-Coats, während für die vorliegende Arbeit frisches Blut verwendet wurde. Außerdem wurden diese Analysen in anoxischen und nicht in hypoxischen Bedingungen durchgeführt, was ebenfalls eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellt. In einer anderen Arbeit berichten Balsamo et al. von einer verringerten Expression von sowohl NKG2D als auch NKp46 nach einer 96-stündigen Inkubation in 1% O<sub>2</sub><sup>109</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rezeptorexpression nur nach 5h, 16h und 48h untersucht, deshalb könnte die längere Inkubationsdauer in der Arbeit von Balsamo et al. für die Diskrepanz verantwortlich sein.

NK-Zellen aus dem peripheren Blut unterscheiden sich von intrahepatischen NK-Zellen bezüglich ihrer Expression von Oberflächenmarkern, ihrer Zytokinproduktion und ihres zytotoxischen Potentials<sup>61,149–152</sup>.



---

Um zu überprüfen, ob die Hypoxie-Sensibilität von peripheren und intrahepatischen NK-Zellen von HCV-Patienten vergleichbar ist, wurden nun zusätzlich intrahepatische NK-Zellen analysiert. Aufgrund von einer begrenzten Materialverfügbarkeit wurden die Versuche mit intrahepatischen Lymphozyten (*liver-infiltrating lymphocytes*, LIL) und nicht mit isolierten NK-Zellen durchgeführt. Bei der Auswertung wurde dann auf die CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen geteet, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch andere Lymphozyten auszuschließen. Nichtsdestotrotz kann eine Beeinflussung der NK-Zellen durch andere Lymphozyten nicht vollständig ausgeschlossen werden, da diese möglicherweise Zytokine sezernieren oder direkt mit den NK-Zellen oder Zielzellen interagieren. Aus diesem Grund konnte auch die antivirale Aktivität der Zellen nicht direkt bestimmt werden, und so wurde die IFN $\gamma$ -Produktion als Surrogatmarker analysiert.

Hier zeigte sich, dass die intrahepatischen NK-Zellen von HCV-Patienten, ähnlich wie die peripheren Zellen von HCV-Patienten, nach Inkubation in Hypoxie weniger IFN $\gamma$  produzierten. Zusätzlich zeigten sie eine Hypoxie-vermittelte Herabregulation der NK-Zellrezeptoren NKp46 und NKG2D, was ebenfalls ähnlich zu den Daten bei peripheren HCV-NK-Zellen ist.

Somit verhalten sich die Zellen, die der Hypoxie in der Leber *in vivo* ausgesetzt sind, bezüglich ihrer Empfänglichkeit für Hypoxie ähnlich wie die peripheren NK-Zellen dieser Patientengruppe. Dies ist ein Hinweis dafür, dass auch die mit peripheren Zellen gewonnenen Daten physiologisch relevant sind.

Intrahepatische NK-Zellen von gesunden Spendern können aus ethischen Gründen nicht gewonnen und untersucht werden und so ist ein intrahepatischer Vergleich zwischen Gesunden und HCV-Patienten nicht möglich.

HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) ist ein zentraler Transkriptionsfaktor bei der Adaptation von Zellen an Hypoxie. Um ein tiefergehendes Verständnis der hypoxiebedingten Veränderungen der NK-Zell-Aktivität zu erhalten, sollte als nächstes die HIF-1 $\alpha$ -Expression nach Inkubation in Hypoxie gemessen werden.

Die mRNA-Level unterschieden sich zwischen Gesunden und HCV-Patienten nicht. Wie zu erwarten war, konnte keine Hochregulation nach Inkubation in Hypoxie beobachtet werden, da HIF-1 $\alpha$  konstitutiv exprimiert und durch Hypoxie ausschließlich posttranslational reguliert wird.

Deshalb sollte als nächstes HIF-1 $\alpha$  auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dies gestaltete sich schwierig, da HIF-1 $\alpha$  unter atmosphärischen Bedingungen sofort degradiert wird. Der Nachweis per Western Blot gelang lediglich in einer Zelllinie, die HIF-1 $\alpha$  konstitutiv translatiert, sowie in Zellen, die mit dem chemischen HIF-1 $\alpha$ -Induzierer Cobaltchlorid behandelt wurden. In primären NK-Zellen, die in Hypoxie kultiviert wurden, war jedoch kein Nachweis möglich.

Von einer anderen Gruppe wurde gezeigt, dass die Expression von HCV-Genen zu einer Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins führt<sup>153</sup>. In jener Arbeit wurde HIF-1 $\alpha$  jedoch in einer mit HCV infizierten Leberzelllinie untersucht. Ein Rückschluss auf die HIF-1 $\alpha$ -Expression in NK-Zellen von HCV-Patienten ist somit nicht möglich, da diese nicht mit HCV infiziert werden und die viralen Proteine nicht intrazellulär vorliegen.

Zellen müssen ihren Stoffwechsel an die zur Verfügung stehenden Nährstoffe anpassen. So erfordern auch veränderte Sauerstoffbedingungen eine metabolische Adaptation. Die Glykolyse muss unter anaeroben Bedingungen massiv hochgefahren werden, da das bei der Glykolyse entstehende Pyruvat statt der hocheffizienten Energiegewinnung durch die Atmungskette in der Lactatgärung verstoffwechselt werden muss, welche 15 Mal weniger Energie produziert.

Die Hochregulation von Glykolysegenen wie TPI-1 (Triosephosphatisomerase 1), PDK-1 (Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1) und PFKFB3 (Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase) wird durch HIF-1 $\alpha$  gesteuert, so dass die Genexpression der Glykolysegene als Marker des HIF-1 $\alpha$ -Proteinlevels verwendet werden kann<sup>115-117</sup>.

Bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen unterschied sich die Expression der Glykolysegene in NK-Zellen nicht zwischen Gesunden und HCV-Patienten. Die NK-Zellen von HCV-Patienten zeigten jedoch eine signifikant verringerte Fähigkeit, die Glykolysegene bei Hypoxie hochzuregulieren.

Dies lässt den Schluss zu, dass HCV-NK-Zellen ihren Stoffwechsel nur ineffizient an anaerobe Bedingungen anpassen können. Diese schlechtere Adaptation könnte dafür verantwortlich sein, dass die NK-Zellen von HCV-Patienten in ihrer antiviralen Aktivität stärker durch Hypoxie beeinträchtigt werden als die Zellen von Gesunden. Interessanterweise wurde in einer Studie von Chang et al. gezeigt, dass in aktivierten T-Zellen eine Stoffwechselumstellung von oxidativer Phosphorylierung auf die weniger effiziente Glykolyse mit Lactatgärung die Voraussetzung für die Produktion

und Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$  ist<sup>154</sup>. Dieser Wechsel in der Form der Energiegewinnung scheint in T-Zellen einen Signalmechanismus darzustellen, der die zelluläre Zytokinproduktion steuert. Möglicherweise ist auch bei NK-Zellen die Glykolyse eine wichtige Voraussetzung für die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion, und somit könnte die verminderte Hochregulation der Glykolysegene bei Hypoxie eine Ursache für die schlechtere antivirale Aktivität und die verringerte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion bei HCV-NK-Zellen sein.

In der HCV-Infektion kann es zu metabolischen Veränderungen kommen, die vor allem den Glukose-Stoffwechsel betreffen. So wurde in epidemiologischen Studien gezeigt, dass die HCV-Infektion mit einem erhöhten Risiko einer Insulinresistenz und einer Diabetes mellitus-Erkrankung einhergeht<sup>155,156</sup>. Kawaguchi et al. zeigten *in vitro* und *in vivo*, dass das HCV Core Protein die Expression von IRS-1 und -2 (Insulinrezeptor-Substrat 1 und 2) herunterreguliert<sup>157</sup>. Die Folge ist ein defektes Insulinsignalling, welches zu einer Insulinresistenz führt. Auch der Glukose-Stoffwechsel scheint in der HCV-Infektion dysreguliert zu sein. So wird der Glukosetransporter GLUT4 herabreguliert und gleichzeitig werden Gene für die Glukoneogenese angeschaltet<sup>158,159</sup>, so dass die Glukosekonzentration im Blut steigt und somit die Entstehung eines Diabetes mellitus begünstigt wird. An Herzmuskelzellen von diabetischen Ratten wurde gezeigt, dass diese im Vergleich zu gesunden Zellen durch Hypoxie in ihrer Funktion eingeschränkt werden<sup>160</sup>. Somit besteht die Möglichkeit, dass auch metabolisch veränderte NK-Zellen von HCV-Patienten eine höhere Anfälligkeit gegenüber Hypoxie aufweisen.

Interessanterweise scheint der gestörte Glukose-Metabolismus bei HCV-Patienten zumindest teilweise reversibel zu sein. So berichten Kawaguchi et al. in einer weiteren Arbeit, dass nach der erfolgreichen Ausheilung einer HCV-Infektion IRS-1 und -2 wieder hochreguliert werden und sich die Insulinresistenz verbessert<sup>161</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings nur NK-Zellen von chronisch infizierten HCV-Patienten untersucht, so dass hier nicht überprüft werden konnte, ob Zellen von Patienten mit einer ausgeheilten Hepatitis C weniger anfällig für funktionelle Einschränkungen durch Hypoxie sind.

Im Gegensatz zu der Theorie der schlechteren metabolischen Anpassung an anaerobe Bedingungen berichten Ripoli et al., dass die Expression von HCV-Proteinen zu einer Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und somit zu einer Hochregulation von Glykolysegenen führt<sup>162</sup>. Die Autoren führen dies auf die Beeinträchtigung der mitochondrialen Energiegewinnung durch oxidativen Stress zurück, welche durch

vermehrte Glykolyse kompensiert werden muss. Diese Daten wurden allerdings nicht in NK-Zellen, sondern in einer Osteosarkom-Zelllinie, die das HCV-Polyprotein exprimiert, erhoben. Die Hochregulation von HIF-1 $\alpha$  und den Glykolysegenen könnte also auf Grund eines direkten Kontakts mit dem HCV-Protein vermittelt werden, während in NK-Zellen, die nicht von HCV infiziert werden, ein indirekter Effekt zu vermuten ist. Zudem könnten die unterschiedlichen Beobachtungen in dieser Arbeit und in der Arbeit von Ripoli et al. auch durch die Unterschiede zwischen Lymphozyten und der Sarkom-Zelllinie bedingt sind.

Die chronische HCV-Infektion führt häufig zur Entwicklung einer Leberfibrose, bei der nach und nach funktionelles Lebergewebe durch Bindegewebe ersetzt wird. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Hypoxie bei der Fibrogenese eine besondere Rolle spielt. So wurde gezeigt, dass Hypoxie hepatische Sternzellen aktiviert, welche durch die Produktion von Kollagen und MMPs als hauptverantwortlich für die Fibroseentstehung gelten<sup>163</sup>. Dies geschieht HIF-1 $\alpha$ -abhängig durch die Induktion der Kollagen-Synthese<sup>105,164</sup>. Außerdem zeigten HIF-1 $\alpha$ -defiziente Mäuse eine verringerte Fibrose<sup>104</sup>.

NK-Zellen sind wichtige Regulatoren der Fibrogenese, da sie aktivierte Sternzellen abtöten können<sup>70,71,73</sup>. Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber hepatischen Sternzellen als Maß für deren antifibrotische Aktivität wurde (im Gegensatz zu ihrer antiviralen Aktivität) nicht durch Hypoxie beeinflusst. Es war weder eine veränderte NK-Zell-Degranulation noch ein verändertes Ausmaß der Lyse der Sternzellen zu beobachten. Dies war überraschend, da der Apoptose-auslösende Todesligand TRAIL durch Hypoxie herunterreguliert wurde. Dieser ist involviert in die antifibrotische Aktivität der NK-Zellen<sup>73</sup>.

Zu der Beeinflussbarkeit der NK-Zell-Zytotoxizität durch Hypoxie gibt es unterschiedliche Berichte. So wurde eine verringerte, gleichbleibende oder sogar gesteigerte Zytotoxizität beobachtet<sup>107-111</sup>. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich durch unterschiedliche Zielzellen, Inkubationszeiten, Sauerstoffkonzentrationen sowie Messmethoden bedingt. Die einzige Arbeit, in der als Zielzellen Leberzelllinien verwendet wurden, zeigte eine verringerte Zytotoxizität der NK-Zellen nach Inkubation in Hypoxie<sup>107</sup>. Dies ermöglicht jedoch keinen Vergleich mit hepatischen Sternzellen, da diese anderen entwicklungsgeschichtlichen Ursprungs als Hepatozyten sind und entsprechend andere Oberflächenmoleküle exprimieren<sup>165</sup>.

---

NK-Zellen scheinen somit auch unter den sauerstoffarmen Bedingungen in einer entzündeten Leber in der Lage zu sein, die Fibrogenese zu regulieren, indem sie aktivierte hepatische Sternzellen abtöten.

Sowohl die antivirale Aktivität wie auch die antifibrotische Aktivität von NK-Zellen korrelieren mit der Expression von aktivierenden Rezeptoren wie NKp46 und NKG2D. Erstaunlicherweise wird trotz der hypoxieinduzierten Herabregulation dieser Rezeptoren bei HCV-NK-Zellen (wie auch der Herabregulation von TRAIL, welcher für die antifibrotische Aktivität eine wichtige Rolle spielt) lediglich die antivirale Aktivität durch Hypoxie gehemmt, während die antifibrotische Aktivität unverändert bleibt. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass NK-Zellen für die Produktion von IFN $\gamma$  eine höhere Aktivierungsschwelle besitzen als für die Ausbildung einer zytotoxischen Antwort<sup>166</sup>. Deshalb könnte die durch die Hypoxie verminderte Rezeptorexpression zu einer verringerten IFN $\gamma$ -Sekretion und somit zu einer verminderten antiviralen Aktivität führen, während das Rezeptor-Signalling für die Ausbildung einer antifibrotischen Antwort noch ausreichend ist.

## 6.2 Der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen in der HIV-Infektion

Auch in der HIV-Infektion spielen NK-Zellen eine zentrale Rolle. Bestimmte NK-Charakteristika und die Expression bestimmter Rezeptoren wurden assoziiert mit dem Infektionsrisiko, der Geschwindigkeit der Progression zu AIDS und mit der Fähigkeit, die Viruslast sehr lange unter der Nachweisgrenze zu halten (*long-term non progressors*)<sup>74-77</sup>. Außerdem können sie die HIV-Replikation *in vitro* effektiv hemmen<sup>78</sup>.

Im sekundären lymphatischen Gewebe, dem Wirkungsort der NK-Zellen in der HIV-Infektion, liegen wie in der Leber verringerte Sauerstoffkonzentrationen vor. Deshalb sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Hypoxie auf NK-Zellen in der HIV-Infektion untersucht werden.

Als Zielzelle für die Koinkubationsversuche wurde die K562-Zelllinie verwendet. Diese myelogene Leukämie-Zelllinie exprimiert keine MHC-Moleküle. Auch die HIV-Infektion einer Zelle resultiert in der Herabregulation von MHC-Molekülen<sup>81</sup> und

daher eignen sich K562-Zellen sehr gut als Zielzellen, wenn NK-Zellen in der HIV-Infektion untersucht werden.

Zunächst wurde der Einfluss von Hypoxie auf die IFN $\gamma$ -Produktion von gesunden und HIV-NK-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich eine Herabregulation von IFN $\gamma$  ausschließlich dann, wenn die Zellen mit IL-2 präaktiviert wurden. Bei ruhenden Zellen hatte die Hypoxie keinen Einfluss. Diese Verminderung der IFN $\gamma$ -Produktion trat sowohl bei den Gesunden als auch bei HIV-Patienten mit und ohne Therapie auf. Die Ausgangswerte der IFN $\gamma$ -Produktion waren allerdings bei HIV-Patienten im Vergleich zu Gesunden niedriger, was mit zahlreichen Studien übereinstimmt<sup>85,86,167</sup>.

Dass die hypoxieinduzierte Verminderung der IFN $\gamma$ -Produktion ausschließlich in zytokinaktivierten Zellen zu beobachten war, wurde im ersten Teil der Arbeit in ähnlicher Weise gezeigt, auch wenn es sich um unterschiedliche Zielzellen handelt. Wie bereits in Kapitel 6.1 diskutiert, könnte die Ursache eine hypoxievermittelte Störung des IL-2-Signallings sein. Alternativ könnte auch der höhere Energiebedarf aktivierter Zellen und die nicht ausreichende Energieversorgung in Hypoxie dafür verantwortlich sein<sup>131,132</sup>.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die durch Hypoxie verringerte IFN $\gamma$ -Produktion mit einer verminderten Rezeptorexpression einhergeht. Hier zeigte sich bei den HIV-Patienten eine deutlich verminderte Expression von NKp46 und NKG2D nach Inkubation in Hypoxie, wobei im Fall von NKG2D die Verminderung erst bei Inkubation in 1% O<sub>2</sub> auftrat. Ob die Patienten eine Therapie erhielten, war dafür unerheblich. Bei den Gesunden konnte hingegen keine Veränderung durch Hypoxie beobachtet werden.

Bei den NK-Zellen der HCV-Patienten im ersten Teil der Arbeit gingen die funktionellen Veränderungen mit einer verminderten Anpassungsfähigkeit des Stoffwechsels einher. Daher sollte nun untersucht werden, ob auch die NK-Zellen der HIV-Patienten die Glykolysegene bei Hypoxiebedingungen weniger stark hochregulieren.

Hierzu ist zunächst anzumerken, dass zahlreiche Studien belegen, dass HIV bzw. bestimmte HIV-Proteine die Glykolyse hochregulieren, während die mitochondriale Zellatmung gehemmt wird<sup>168-171</sup>. Die meisten dieser Studien wurden jedoch mit infizierten oder transfizierten Zellen bzw. Zelllinien durchgeführt, wohingegen die NK-Zellen nur extrazellulär mit HIV-Proteinen in Kontakt kommen. Im Gegensatz dazu

---

wurde in einer anderen Studie eine Neuroblastomzelllinie extrazellulär mit dem viralen Protein gp120 stimuliert, woraufhin die Glykolyse vermindert wurde<sup>172</sup>.

In der vorliegenden Arbeit hingegen waren die Normoxie-Ausgangswerte der drei untersuchten, für die Glykolyse wichtigen Gene *TPI1*, *PDK1* und *PFKFB3* in den NK-Zellen von Gesunden und HIV-Patienten gleich hoch. Dies spricht dafür, dass die HIV-Infektion per se keinen Einfluss auf den Glykolyse-Stoffwechsel von NK-Zellen hat, wenn die Kultivierung bei 20% O<sub>2</sub> vorgenommen wird.

Wurden die NK-Zellen in Hypoxie kultiviert, waren NK-Zellen von Patienten unter Therapie, ebenso wie die von Gesunden, in der Lage, die Glykolysegene hochzuregulieren. Die NK-Zellen von virämischen, therapienaiven Patienten hingegen zeigten eine verminderte Fähigkeit, ihren Stoffwechsel an die Hypoxie anzupassen.

Dies ist interessant, da sich die NK-Zellen von HIV-Patienten mit und ohne Therapie im Einfluss von Hypoxie auf die IFN $\gamma$ -Produktion und die Rezeptorexpression nicht unterschieden. Die schlechtere metabolische Anpassungsfähigkeit der NK-Zellen von virämischen Patienten scheint also – im Gegensatz zu den NK-Zellen von HCV-Patienten – keinen Einfluss auf die hier untersuchten Funktionen zu haben. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Hypoxie bei HIV-NK-Zellen noch auf andere als die in dieser Arbeit untersuchten Stoffwechselwege einen Einfluss besitzt. Verschiedene Studien berichten z.B. über eine Herabregulation der mitochondrialen Gene durch die HIV-Infektion<sup>168,170</sup>, so dass auch die Gene für die oxidative Phosphorylierung als Hypoxie-Zielgene in Frage kommen.

Möglicherweise spielt bei den HIV-NK-Zellen auch eine grundlegende Störung eine Rolle, die durch die systemische Immunaktivierung bei der HIV-Infektion verursacht wird<sup>173,174</sup>. Dabei geht man von einer pathologischen Umverteilung der NK-Zell-Subsets aus, die unter anderem mit einer eingeschränkten antiviralen Aktivität einhergeht<sup>175</sup>. So könnten die durch Hypoxie bedingten Effekte weniger deutlich ausgeprägt sein als bei NK-Zellen von HCV-Patienten, weil die Zellen durch den bestehenden Immundefekt bereits so vorgeschädigt sind, dass die Beeinträchtigungen durch Hypoxie nicht zum Tragen kommen.

Eine Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse ergibt sich daraus, dass für die Untersuchung von NK-Zellen in der HIV-Infektion nicht, wie für die HCV-Infektion, ein Virusreplikationssystem zur Verfügung stand, in dem direkt die antivirale Aktivität der NK-Zellen getestet werden konnte. Dies könnte möglicherweise noch in zukünftigen

Untersuchungen etabliert werden, um herauszufinden, ob die schlechtere metabolische Anpassung der virämischen Patienten von einer verringerten antiviralen Aktivität bei Hypoxie begleitet ist. Des Weiteren konnten im zweiten Teil der Arbeit wegen der mangelnden Verfügbarkeit keine gewebeständigen NK-Zellen, z.B. aus Lymphknoten, untersucht werden, die die physiologische Relevanz der Daten bekräftigen könnten.

Die CD107a-Expression als Maß für die zytotoxische Aktivität der HIV-NK-Zellen wurde durch Inkubation in Hypoxie nicht verändert. Dies entspricht den Ergebnissen aus dem ersten Teil der Arbeit, wenngleich dort andere Zielzellen verwendet wurden. Die These, dass Zytotoxizität diejenige Aktivität von NK-Zellen darstellt, die die niedrigste Aktivierungsschwelle aufweist, und deshalb am wenigsten anfällig gegenüber Einschränkungen durch Hypoxie ist<sup>166</sup>, wird somit unterstützt.

Zwei Arbeiten, die ebenfalls die NK-Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen untersucht haben, kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Fink et al. beschreiben eine verringerte Lyse von K562-Zellen nach Inkubation in Hypoxie<sup>107</sup>. Allerdings wurden hier PBMC statt isolierter NK-Zellen verwendet. Somit könnten die beobachteten Effekte auch durch Interaktionen mit anderen PBMC oder von diesen produzierten Zytokinen begründet sein. Vasold et al. wiederum berichten über eine durch Hypoxie gesteigerte K562-Lyse<sup>111</sup>. Hier wurden längere Inkubationszeiten in Hypoxie verwendet, was die Diskrepanz erklären könnte.

### **6.3 Schlussfolgerung und Fazit**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass NK-Zellen von Gesunden, HCV- und HIV-Patienten durch physiologische Sauerstoffbedingungen auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden.

Bei der HCV-Infektion deuten die Daten darauf hin, dass NK-Zellen von HCV-Patienten – im Gegensatz zu denen von Gesunden – sehr sensibel gegenüber Hypoxie sind. Die antivirale Aktivität ist bereits bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen eingeschränkt. Mit fortschreitender Leberentzündung und den damit einhergehenden verringerten Sauerstoffkonzentrationen wird die antivirale Aktivität weiter verringert, was zu einer unzureichenden Immunantwort und damit zu einer



---

Chronifizierung der Infektion beitragen kann. Dieser Defekt in der antiviralen Aktivität von HCV-NK-Zellen ist möglicherweise durch eine nicht ausreichende metabolische Anpassung an die veränderte Umgebung bedingt. Die antifibrotische Aktivität der NK-Zellen ist im Gegensatz dazu nicht durch Hypoxie beeinträchtigt.

Bei der HIV-Infektion hingegen kann aus den in diesem Teil der Arbeit gewonnenen Daten kein einheitliches Bild über die Hypoxieempfindlichkeit der NK-Zellen gewonnen werden. NK-Zellrezeptoren werden bei allen HIV-Patienten herunterreguliert, während die schlechtere metabolische Anpassung nur bei therapie-naiven Patienten der Fall ist. Bei der IFN $\gamma$ -Sekretion sind die NK-Zellen von HIV-Patienten ähnlich stark betroffen wie die NK-Zellen von Gesunden. Die Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen hingegen wird durch Hypoxie nicht beeinträchtigt.

Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass bei den HIV-NK-Zellen möglicherweise eine grundlegende Störung vorliegt, die gravierender ist als die durch die Hypoxie verursachten Effekte und diese somit überlagert. Dies könnte durch die häufig beschriebene systemische Immunaktivierung bei der HIV-Infektion verursacht sein<sup>173,174</sup>. Dabei geht man von einer pathologischen Umverteilung der NK-Zell-Subsets aus, die unter anderem mit einer eingeschränkten antiviralen Aktivität einhergeht<sup>175</sup>.

Somit scheinen die physiologischen Sauerstoffkonzentrationen als Einfluss des Mikromilieus in den sekundären lymphatischen Geweben bei der HIV-Infektion eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Eine Gemeinsamkeit bei NK-Zellen von Gesunden, HCV- sowie HIV-Patienten besteht darin, dass die zytotoxische Aktivität nicht durch Hypoxie beeinflusst wird. Dies scheint durch die niedrige Aktivierungsschwelle bedingt zu sein, die in NK-Zellen für die Ausbildung der zytotoxischen Aktivität notwendig ist. Selbst wenn durch Inkubation in Hypoxie z.B. aktivierende Rezeptoren herunterreguliert werden, sind die aktivierenden Signale noch ausreichend für die Initiierung einer zytotoxischen Antwort.

In Übereinstimmung zu dieser Hypothese war die IFN $\gamma$ -Produktion, für die eine höhere Aktivierungsenergie benötigt wird, bei allen untersuchten Gruppen durch Hypoxie beeinträchtigt. Dies war jedoch bei Gesunden weniger stark ausgeprägt als bei HCV- und HIV-Patienten.

Bei zukünftigen Untersuchungen zur NK-Zell-Aktivität – sowohl bei der HCV- und der HIV-Infektion, als auch bei gesunden Spendern – sollten stets die physiologischen Sauerstoffkonzentrationen beim Versuchsaufbau berücksichtigt werden, insbesondere wenn die Zytokinproduktion untersucht wird. So kann eine durch hyperoxische Bedingungen verursachte Fehlinterpretation von Ergebnissen vermieden werden, was zu einem besseren Verständnis der NK-Zell-vermittelten Immunität bei Viruserkrankungen führen kann.

## 7 ANHANG

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Choo, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362 (1989).
2. WHO | Hepatitis C. *WHO* Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. (Accessed: 30th November 2015)
3. Westbrook, R. H. & Dusheiko, G. Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.* **61**, S58–68 (2014).
4. Han, J. H. *et al.* Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1711–1715 (1991).
5. de Lamballerie, X., Charrel, R. N., Attoui, H. & De Micco, P. Classification of hepatitis C virus variants in six major types based on analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B genome regions and complete polyprotein sequences. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 1), 45–51 (1997).
6. Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–5025 (2002).
7. Cormier, E. G. *et al.* CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7270–7274 (2004).
8. Evans, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
9. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12766–12771 (1999).
10. Takikawa, S. *et al.* Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.* **74**, 5066–5074 (2000).
11. Modrow, S. *Molekulare Virologie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2010).
12. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
13. WHO | HIV/AIDS. *WHO* Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>. (Accessed: 26th February 2016)
14. Lifson, A. R., Rutherford, G. W. & Jaffe, H. W. The natural history of human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **158**, 1360–1367 (1988).
15. Muñoz, A. *et al.* Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am. J. Epidemiol.* **130**, 530–539 (1989).
16. WHO | Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: what's new. *WHO* Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/arv/policy-brief-arv-2015/en/>. (Accessed: 3rd December 2015)
17. Robertson, D. L. *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55–56 (2000).
18. Dagleish, A. G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763–767 (1984).
19. Deng, H. *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661–666 (1996).
20. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872–877 (1996).
21. Hata, K. *et al.* Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **56**, 401–419 (1990).
22. Clément, M. V. *et al.* Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. *Res. Immunol.* **141**, 477–489 (1990).
23. McCann, F. E. *et al.* The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 2862–2870 (2003).

24. Zamai, L. *et al.* Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* **188**, 2375–2380 (1998).
25. Santoli, D., Trinchieri, G. & Koprowski, H. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **121**, 532–538 (1978).
26. Ortaldo, J. R. *et al.* Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. *Nature* **321**, 700–702 (1986).
27. Wright, S. C. & Bonavida, B. Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. VII. functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **138**, 1791–1798 (1987).
28. Wang, S.-H. *et al.* Natural killer cells suppress full cycle HCV infection of human hepatocytes. *J. Viral Hepat.* **15**, 855–864 (2008).
29. Bauer, S. *et al.* Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* **285**, 727–729 (1999).
30. Cosman, D. *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123–133 (2001).
31. Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157**, 4741–4745 (1996).
32. Bottino, C., Biassoni, R., Millo, R., Moretta, L. & Moretta, A. The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Hum. Immunol.* **61**, 1–6 (2000).
33. Vitale, M. *et al.* Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 233–242 (2001).
34. Mandelboim, O. *et al.* Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **409**, 1055–1060 (2001).
35. Sivori, S. *et al.* CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10116–10121 (2004).
36. Esin, S. *et al.* Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect. Immun.* **76**, 1719–1727 (2008).
37. Vieillard, V., Strominger, J. L. & Debré, P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10981–10986 (2005).
38. Anasetti, C. *et al.* Induction of calcium flux and enhancement of cytolytic activity in natural killer cells by cross-linking of the sheep erythrocyte binding protein (CD2) and the Fc-receptor (CD16). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **139**, 1772–1779 (1987).
39. Döhning, C. & Colonna, M. Human natural killer cell inhibitory receptors bind to HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* **26**, 365–369 (1996).
40. Long, E. O. *et al.* Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol. Rev.* **155**, 135–144 (1997).
41. Ortaldo, J. R., Lang, N. P., Timonen, T. & Herberman, R. B. Augmentation of human natural killer cell activity by interferon: conditions required for boosting and characteristics of the effector cells. *J. Interferon Res.* **1**, 253–262 (1981).
42. Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E. & Gillis, S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* **291**, 335–338 (1981).
43. Lieberman, M. D., Sigal, R. K., Williams, N. N. & Daly, J. M. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) augments natural killer cell and antibody-dependent tumoricidal response against colon carcinoma cell lines. *J. Surg. Res.* **50**, 410–415 (1991).
44. Carson, W. E. *et al.* Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* **180**, 1395–1403 (1994).
45. Tsutsui, H. *et al.* IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157**, 3967–3973 (1996).
46. Golden-Mason, L., Cox, A. L., Randall, J. A., Cheng, L. & Rosen, H. R. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology. Baltim. Md* **52**, 1581–1589 (2010).
47. Werner, J. M. *et al.* Innate immune responses in hepatitis C virus-exposed healthcare workers who do not develop acute infection. *Hepatology* **58**, 1621–1631 (2013).

48. Khakoo, S. I. *et al.* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* **305**, 872–874 (2004).
49. Amadei, B. *et al.* Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**, 1536–1545 (2010).
50. Pelletier, S. *et al.* Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J. Hepatol.* **53**, 805–816 (2010).
51. Vidal, S. M., Khakoo, S. I. & Biron, C. A. Natural killer cell responses during viral infections: flexibility and conditioning of innate immunity by experience. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 497–512 (2011).
52. Kokordelis, P. *et al.* An effective interferon-gamma-mediated inhibition of hepatitis C virus replication by natural killer cells is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C in human immunodeficiency virus-positive patients. *Hepatol. Baltim. Md* **59**, 814–827 (2014).
53. Alter, G. *et al.* Reduced frequencies of NKp30+ NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J. Hepatol.* **55**, 278–288 (2011).
54. Kawarabayashi, N. *et al.* Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* **32**, 962–969 (2000).
55. Morishima, C. *et al.* Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatol. Baltim. Md* **43**, 573–580 (2006).
56. Bonorino, P. *et al.* Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J. Hepatol.* **51**, 458–467 (2009).
57. Nattermann, J. *et al.* Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* **55**, 869–877 (2006).
58. De Maria, A. *et al.* Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur. J. Immunol.* **37**, 445–455 (2007).
59. Jinushi, M. *et al.* Negative Regulation of NK Cell Activities by Inhibitory Receptor CD94/NKG2A Leads to Altered NK Cell-Induced Modulation of Dendritic Cell Functions in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J. Immunol.* **173**, 6072–6081 (2004).
60. Sène, D. *et al.* Hepatitis C Virus (HCV) Evades NKG2D-Dependent NK Cell Responses through NS5A-Mediated Imbalance of Inflammatory Cytokines. *PLoS Pathog* **6**, e1001184 (2010).
61. Krämer, B. *et al.* Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 1201–1213 (2012).
62. Golden-Mason, L., Stone, A. E. L., Bambha, K. M., Cheng, L. & Rosen, H. R. Race- and gender-related variation in natural killer p46 expression associated with differential anti-hepatitis C virus immunity. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 1214–1222 (2012).
63. Bonavita, M. S. *et al.* Normalization of depressed natural killer activity after interferon-alpha therapy is associated with a low frequency of relapse in patients with chronic hepatitis C. *Int. J. Tissue React.* **15**, 11–16 (1993).
64. Corado, J. *et al.* Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin. Exp. Immunol.* **109**, 451–457 (1997).
65. Ahlenstiel, G. *et al.* Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* **138**, 325–335.e1–2 (2010).
66. Oliviero, B. *et al.* Natural Killer Cell Functional Dichotomy in Chronic Hepatitis B and Chronic Hepatitis C Virus Infections. *Gastroenterology* **137**, 1151–1160.e7 (2009).
67. Dessouki, O. *et al.* Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 331–337 (2010).
68. Yoon, J. C., Lim, J.-B., Park, J. H. & Lee, J. M. Cell-to-Cell Contact with Hepatitis C Virus-Infected Cells Reduces Functional Capacity of Natural Killer Cells. *J. Virol.* **85**, 12557–12569 (2011).
69. Maher, J. J., Bissell, D. M., Friedman, S. L. & Roll, F. J. Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J. Clin. Invest.* **82**, 450–459 (1988).
70. Melhem, A. *et al.* Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J. Hepatol.* **45**, 60–71 (2006).
71. Radaeva, S. *et al.* Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* **130**, 435–452 (2006).
72. Gao, B., Radaeva, S. & Jeong, W.-I. Activation of natural killer cells inhibits liver fibrosis: a novel strategy to treat liver fibrosis. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 173–180 (2007).

73. Glässner, A. *et al.* NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **92**, 967–977 (2012).
74. Lambotte, O. *et al.* Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS Lond. Engl.* **23**, 897–906 (2009).
75. Wren, L. H. *et al.* Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses associated with slow progression of HIV infection. *Immunology* **138**, 116–123 (2013).
76. Martin, M. P. *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* **31**, 429–434 (2002).
77. Boulet, S. *et al.* A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B\*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS Lond. Engl.* **22**, 1487–1491 (2008).
78. Alter, G. *et al.* Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J. Exp. Med.* **204**, 3027–3036 (2007).
79. Khayat, D. *et al.* Changes of soluble CD16 levels in serum of HIV-infected patients: correlation with clinical and biologic prognostic factors. *J. Infect. Dis.* **161**, 430–435 (1990).
80. Cerboni, C. *et al.* Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* **88**, 242–250 (2007).
81. Cohen, G. B. *et al.* The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**, 661–671 (1999).
82. Hu, P. F. *et al.* Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* **10**, 331–340 (1995).
83. Mavilio, D. *et al.* Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2886–2891 (2005).
84. De Maria, A. *et al.* The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur. J. Immunol.* **33**, 2410–2418 (2003).
85. Mavilio, D. *et al.* Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15011–15016 (2003).
86. Alter, G. *et al.* Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* **106**, 3366–3369 (2005).
87. Fausther-Bovendo, H., Vieillard, V., Sagan, S., Bismuth, G. & Debré, P. HIV gp41 engages gC1qR on CD4+ T cells to induce the expression of an NK ligand through the PIP3/H2O2 pathway. *PLoS Pathog.* **6**, e1000975 (2010).
88. Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. & Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 1239–1253 (2011).
89. Clark, L. C. Monitor and control of blood and tissue oxygen. *ASAIO J.* **2**, 41–48 (1956).
90. Stone, H. B., Brown, J. M., Phillips, T. L. & Sutherland, R. M. Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. Summary of a workshop held November 19-20, 1992, at the National Cancer Institute, Bethesda, Maryland. *Radiat. Res.* **136**, 422–434 (1993).
91. Vanderkooi, J. M., Maniara, G., Green, T. J. & Wilson, D. F. An optical method for measurement of dioxygen concentration based upon quenching of phosphorescence. *J. Biol. Chem.* **262**, 5476–5482 (1987).
92. Griffiths, J. R. & Robinson, S. P. The OxyLite: a fibre-optic oxygen sensor. *Br. J. Radiol.* **72**, 627–630 (1999).
93. Mik, E. G., van Leeuwen, T. G., Raat, N. J. & Ince, C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **97**, 1962–1969 (2004).
94. Gabalski, E. C. *et al.* Pretreatment and midtreatment measurement of oxygen tension levels in head and neck cancers. *The Laryngoscope* **108**, 1856–1860 (1998).
95. Ikejiri, A. *et al.* Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations. *Int. Immunol.* **24**, 137–146 (2012).
96. Caldwell, C. C., Tschoep, J. & Lentsch, A. B. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 457–464 (2007).
97. Braun, R. D., Lanzen, J. L., Snyder, S. A. & Dewhirst, M. W. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H2533–2544 (2001).

98. Kessler, M., Höper, J. & Krumme, B. A. Monitoring of tissue perfusion and cellular function. *Anesthesiology* **45**, 184–197 (1976).
99. Jungermann, K. & Kietzmann, T. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatol. Baltim. Md* **31**, 255–260 (2000).
100. Leary, T. S. *et al.* Measurement of liver tissue oxygenation after orthotopic liver transplantation using a multiparameter sensor. A pilot study. *Anaesthesia* **57**, 1128–1133 (2002).
101. Brooks, A. J., Hammond, J. S., Girling, K. & Beckingham, I. J. The effect of hepatic vascular inflow occlusion on liver tissue pH, carbon dioxide, and oxygen partial pressures: defining the optimal clamp/release regime for intermittent portal clamping. *J. Surg. Res.* **141**, 247–251 (2007).
102. Giatromanolaki, A. *et al.* Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  overexpression in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.* **56**, 209–213 (2003).
103. Colgan, S. P. & Taylor, C. T. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 281–287 (2010).
104. Moon, J.-O., Welch, T. P., Gonzalez, F. J. & Copple, B. L. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G582–592 (2009).
105. Corpechot, C. *et al.* Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **35**, 1010–1021 (2002).
106. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
107. Fink, T., Ebbesen, P., Koppelhus, U. & Zachar, V. Natural killer cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under in vivo oxygen conditions. *Scand. J. Immunol.* **58**, 607–612 (2003).
108. Sarkar, S. *et al.* Hypoxia induced impairment of NK cell cytotoxicity against multiple myeloma can be overcome by IL-2 activation of the NK cells. *PLoS One* **8**, e64835 (2013).
109. Balsamo, M. *et al.* Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2756–2764 (2013).
110. Loeffler, D. A., Juneau, P. L. & Heppner, G. H. Natural killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **48**, 895–899 (1991).
111. Vasold, J. *et al.* The bone marrow microenvironment is a critical player in the NK cell response against acute myeloid leukaemia in vitro. *Leuk. Res.* (2014). doi:10.1016/j.leukres.2014.12.001
112. Wang, G. L. & Semenza, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4304–4308 (1993).
113. Wenger, R. H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Gassmann, M. & Marti, H. H. Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int.* **51**, 560–563 (1997).
114. Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* **272**, 22642–22647 (1997).
115. Minchenko, O., Opentanova, I. & Caro, J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett.* **554**, 264–270 (2003).
116. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**, 177–185 (2006).
117. Gess, B., Hofbauer, K.-H., Deutzmann, R. & Kurtz, A. Hypoxia up-regulates triosephosphate isomerase expression via a HIF-dependent pathway. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **448**, 175–180 (2004).
118. Böyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* **97**, 7 (1968).
119. Binder, M. *et al.* Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras. *J. Virol.* **81**, 5270–5283 (2007).
120. Raleigh, J. A., Chou, S. C., Arteel, G. E. & Horsman, M. R. Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiat. Res.* **151**, 580–589 (1999).
121. Yu, C. R. *et al.* Differential utilization of Janus kinase-signal transducer activator of transcription signaling pathways in the stimulation of human natural killer cells by IL-2, IL-12, and IFN- $\alpha$ . *J. Immunol. Baltim. Md* **157**, 126–137 (1996).
122. Edlich, B. *et al.* Early changes in interferon signaling define natural killer cell response and refractoriness to interferon-based therapy of hepatitis C patients. *Hepatol. Baltim. Md* **55**, 39–48 (2012).

123. Lichtfuss, G. F. *et al.* Virologically Suppressed HIV Patients Show Activation of NK Cells and Persistent Innate Immune Activation. *J. Immunol.* **189**, 1491–1499 (2012).
124. Nolting, A. *et al.* MHC class I chain-related protein A shedding in chronic HIV-1 infection is associated with profound NK cell dysfunction. *Virology* **406**, 12–20 (2010).
125. Matusali, G. *et al.* Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, 2440–2450 (2013).
126. Sitkovsky, M. V. *et al.* Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 657–682 (2004).
127. Choukèr, A. *et al.* Critical role of hypoxia and A2A adenosine receptors in liver tissue-protecting physiological anti-inflammatory pathway. *Mol. Med. Camb. Mass* **14**, 116–123 (2008).
128. Yotnda, P., Wu, D. & Swanson, A. M. Hypoxic tumors and their effect on immune cells and cancer therapy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **651**, 1–29 (2010).
129. Duechler, M., Peczek, L., Szubert, M. & Suzin, J. Influence of hypoxia inducible factors on the immune microenvironment in ovarian cancer. *Anticancer Res.* **34**, 2811–2819 (2014).
130. Deng, B. *et al.* Intratumor hypoxia promotes immune tolerance by inducing regulatory T cells via TGF- $\beta$ 1 in gastric cancer. *PLoS One* **8**, e63777 (2013).
131. Roos, D. & Loos, J. A. Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes: II. Relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation on phytohaemagglutinin stimulation. *Exp. Cell Res.* **77**, 127–135 (1973).
132. Hume, D. A., Radik, J. L., Ferber, E. & Weidemann, M. J. Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation. *Biochem. J.* **174**, 703–709 (1978).
133. Jo, J. *et al.* Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology* **136**, 1391–1401 (2009).
134. Naldini, A., Carraro, F., Fleischmann, W. R. & Bocci, V. Hypoxia enhances the antiviral activity of interferons. *J. Interferon Res.* **13**, 127–132 (1993).
135. Vassilaki, N. *et al.* Low oxygen tension enhances hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **87**, 2935–2948 (2013).
136. Lane, B. R. *et al.* TNF-alpha inhibits HIV-1 replication in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages by inducing the production of RANTES and decreasing C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 3653–3661 (1999).
137. Seo, S. H. & Webster, R. G. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. *J. Virol.* **76**, 1071–1076 (2002).
138. Biermer, M., Puro, R. & Schneider, R. J. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid integrity through activation of NF-kappaB. *J. Virol.* **77**, 4033–4042 (2003).
139. Lee, J. *et al.* TNF- $\alpha$  Induced by Hepatitis C Virus via TLR7 and TLR8 in Hepatocytes Supports Interferon Signaling via an Autocrine Mechanism. *PLoS Pathog* **11**, e1004937 (2015).
140. Patzwahl, R., Meier, V., Ramadori, G. & Mihm, S. Enhanced Expression of Interferon-Regulated Genes in the Liver of Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection: Detection by Suppression-Subtractive Hybridization. *J. Virol.* **75**, 1332–1338 (2001).
141. Su, A. I. *et al.* Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15669–15674 (2002).
142. Bozzano, F. *et al.* Activating NK cell receptor expression/function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2905–2914 (2011).
143. Zhu, S. *et al.* Transcription of the activating receptor NKG2D in natural killer cells is regulated by STAT3 tyrosine phosphorylation. *Blood* **124**, 403–411 (2014).
144. Lai, C. B. & Mager, D. L. Role of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) in transcription regulation of natural cytotoxicity receptor 1 (NCR1/NKp46), an activating natural killer (NK) cell receptor. *J. Biol. Chem.* **287**, 7324–7334 (2012).
145. Lee, S. H., Kim, J., Kim, W.-H. & Lee, Y. M. Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells. *Oncogene* **28**, 184–194 (2009).
146. Gu, Q., Kong, Y., Yu, Z.-B., Bai, L. & Xiao, Y.-B. Hypoxia-induced SOCS3 is limiting STAT3 phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation in congenital heart disease. *Biochimie* **93**, 909–920 (2011).
147. Starkel, P., Saeger, C. D., Lebrun, V., Strain, A. J. & Horsmans, Y. Reduced Stat3 function and increased anti-apoptotic signals in HCV liver cirrhosis. *J. Hepatol.* **38**, 119 (2003).



148. Tacke, R. S., Tosello-Tramont, A., Nguyen, V., Mullins, D. W. & Hahn, Y. S. Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 10847–10855 (2011).
149. Takeda, K. *et al.* TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* **105**, 2082–2089 (2005).
150. Peng, H. *et al.* Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J. Clin. Invest.* **123**, 1444–1456 (2013).
151. Marquardt, N. *et al.* Cutting edge: identification and characterization of human intrahepatic CD49a+ NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 2467–2471 (2015).
152. Peng, H., Wisse, E. & Tian, Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell. Mol. Immunol.* (2015). doi:10.1038/cmi.2015.96
153. Nasimuzzaman, M., Waris, G., Mikolon, D., Stupack, D. G. & Siddiqui, A. Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1alpha and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. *J. Virol.* **81**, 10249–10257 (2007).
154. Chang, C.-H. *et al.* Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* **153**, 1239–1251 (2013).
155. Knobler, H. & Schattner, A. TNF- $\alpha$ , chronic hepatitis C and diabetes: a novel triad. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* **98**, 1–6 (2005).
156. Moucari, R. *et al.* Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* **134**, 416–423 (2008).
157. Kawaguchi, T. *et al.* Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am. J. Pathol.* **165**, 1499–1508 (2004).
158. Deng, L. *et al.* Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J. Virol.* **85**, 8556–8568 (2011).
159. Bose, S. K., Shrivastava, S., Meyer, K., Ray, R. B. & Ray, R. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *J. Virol.* **86**, 6315–6322 (2012).
160. Aomine, M., Nobe, S. & Arita, M. Increased susceptibility to hypoxia of prolonged action potential duration in ventricular papillary muscles from diabetic rats. *Diabetes* **39**, 1485–1489 (1990).
161. Kawaguchi, T. *et al.* Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 570–576 (2007).
162. Ripoli, M. *et al.* Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation. *J. Virol.* **84**, 647–660 (2010).
163. Wang, Y. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha and MAPK co-regulate activation of hepatic stellate cells upon hypoxia stimulation. *PLoS One* **8**, e74051 (2013).
164. Copple, B. L., Bai, S., Burgoon, L. D. & Moon, J.-O. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulates the expression of genes in hypoxic hepatic stellate cells important for collagen deposition and angiogenesis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **31**, 230–244 (2011).
165. Friedman, S. L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172 (2008).
166. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* **115**, 2167–2176 (2010).
167. Goeser, F. *et al.* HIV mono-infection is associated with an impaired anti-hepatitis C virus activity of natural killer cells. *AIDS Lond. Engl.* **30**, 355–363 (2016).
168. Ringrose, J. H., Jeeninga, R. E., Berkhout, B. & Speijer, D. Proteomic studies reveal coordinated changes in T-cell expression patterns upon infection with human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **82**, 4320–4330 (2008).
169. Liao, W. *et al.* Combined metabolomic and quantitative real-time PCR analyses reveal systems metabolic changes in Jurkat T-cells treated with HIV-1 Tat protein. *J. Proteome Res.* **11**, 5109–5123 (2012).
170. Barrero, C. A. *et al.* HIV-1 Vpr modulates macrophage metabolic pathways: a SILAC-based quantitative analysis. *PLoS One* **8**, e68376 (2013).
171. Hegedus, A., Kavanagh Williamson, M. & Huthoff, H. HIV-1 pathogenicity and virion production are dependent on the metabolic phenotype of activated CD4+ T cells. *Retrovirology* **11**, 98 (2014).
172. Vignoli, A. L. *et al.* Neuronal glycolytic pathway impairment induced by HIV envelope glycoprotein gp120. *Mol. Cell. Biochem.* **215**, 73–80 (2000).
173. Paiardini, M. & Müller-Trutwin, M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol. Rev.* **254**, 78–101 (2013).

174. Lugli, E. & Mavilio, D. Editorial: NK cell immune activation in HIV-1 infection: flipping the bad and good side of the same coin. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 1–3 (2014).
175. Brunetta, E., Hudspeth, K. L. & Mavilio, D. Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 1119–1130 (2010).

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>modular incubator chamber</i> . Quelle: brincubator.com. ....	30
Abbildung 2: Der Nachweis des hypoxischen Zellmilieus durch Pimonidazolfärbung. .....	41
Abbildung 3: Hypoxie hat keinen Einfluss auf die anti-HCV-Aktivität ruhender NK-Zellen von gesunden Spendern.....	43
Abbildung 4: Die antivirale Aktivität gesunder, IL-2-aktivierter NK-Zellen wird durch Hypoxie beeinträchtigt. ....	44
Abbildung 5: Der Einfluss von Hypoxie auf die CD25- und CD122-Expression von gesunden NK-Zellen.....	45
Abbildung 6: Die antivirale Aktivität gesunder, IFN $\alpha$ -aktivierter NK-Zellen wird durch Hypoxie beeinträchtigt. ....	46
Abbildung 7: Hypoxie besitzt keinen Einfluss auf die STAT-Expression in gesunden NK-Zellen.....	47
Abbildung 8: NK-Zellen von HCV-Patienten sind sensibler gegenüber einer hypoxievermittelten Beeinträchtigung ihrer antiviralen Aktivität als gesunde NK-Zellen.....	48
Abbildung 9: Hemmung der HCV-Replikation durch rekombinantes IFN $\gamma$ bei Hypoxie. .....	49
Abbildung 10: Hypoxie verringert den Anteil IFN $\gamma$ -positiver NK-Zellen nach Koinkubation mit HuH7-A2-Replicon-Zellen. ....	50
Abbildung 11: Das Ausmaß der IFN $\gamma$ -Produktion von HCV-NK-Zellen wird durch Hypoxie stärker beeinflusst als das gesunder NK-Zellen.....	51
Abbildung 12: IFN $\gamma$ ist nicht alleine für die NK-Zell-vermittelte Hemmung der Virusreplikation unter Hypoxie verantwortlich. ....	52
Abbildung 13: Die Expression von NKp46 und NKG2D nach Kultivierung in Hypoxie. .....	53
Abbildung 14: Der Zeitverlauf der NK-Zellrezeptor-Expression bei NK-Zellen von HCV-Patienten nach Kultivierung in Hypoxie.....	54
Abbildung 15: Hypoxie verändert nicht die Expression von NK-Zell-Rezeptorliganden auf HuH7-A2-Replicon-Zellen.....	55
Abbildung 16: Der Einfluss von Hypoxie auf intrahepatische NK-Zellen.....	56
Abbildung 17: Die Expression von HIF-1 $\alpha$ in NK-Zellen. ....	58

---

Abbildung 18: NK-Zellen von HCV-Patienten können ihren Stoffwechsel schlechter an niedrige Sauerstoffkonzentrationen anpassen.....	60
Abbildung 19: Die Expression von TRAIL und FasL auf NK-Zellen. ....	61
Abbildung 20: Der Einfluss von Hypoxie auf den Anteil CD107a <sup>+</sup> NK-Zellen bei Hypoxie.....	62
Abbildung 21: Die NK-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion bei HSC nach Inkubation in Hypoxie.....	63
Abbildung 22: Der Einfluss von Hypoxie auf die IFN $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen von Gesunden und HIV-Patienten.....	65
Abbildung 23: Hypoxie besitzt keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von HIV-NK-Zellen.....	66
Abbildung 24: Die NK-Zell-Rezeptorexpression bei HIV-Patienten wird durch Hypoxie vermindert.....	67
Abbildung 25: Hypoxie verändert nicht die Expression von NK-Zell-Rezeptorliganden auf K562-Zellen. ....	68
Abbildung 26: Die Expression von Glykolysegenen nach Inkubation in Hypoxie.....	69

---

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> (erworbenes Immunschwächesyndrom)
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
cART	<i>combined antiretroviral therapy</i> (kombinierte antiretrovirale Therapie)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CT	<i>cycle threshold</i>
d.h.	das heißt
DAA	<i>direct antiviral agents</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E:T Ratio	Effektor:Target Ratio
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
γ-GT	γ-Glutamyltransferase

---

GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
HCV	Hepatitis C-Virus
HDAC-1	Histondeacetylase 1
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSC	<i>hepatic stellate cell</i> (hepatische Sternzelle)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
kb	Kilobasen
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
L	Liter
LIL	<i>liver-infiltrating lymphocytes</i>
m	Meter
M	Molar
MFI	Median der Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC-A/B	<i>MHC class I related chains A and B</i>
min	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
n.s.	nicht signifikant
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i> (natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor)
NEA	nichtessentielle Aminosäuren
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDK-1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1
PFA	Paraformaldehyd
PFKFB-3	Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPI-1	Triosephosphatisomerase 1
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
U	<i>unit</i>
ULBP	<i>UL16 binding protein</i>
V	Volt
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
z.B.	zum Beispiel

## 7.4 Veröffentlichungen

Auszüge aus dieser Arbeit waren Bestandteil der folgenden Publikationen und Kongressbeiträge:

### Publikation als Erstautor:

Franziska Wolter\*, Andreas Glässner\*, Benjamin Krämer, Pavlos Kokordelis, Claudia Finnemann, Dominik Kaczmarek, Felix Goeser, Philipp Lutz, Hans Dieter Nischalke, Christian P. Strassburg, Ulrich Spengler, Jacob Nattermann;

Hypoxia impairs anti-viral activity of natural killer (NK) cells but has little effect on anti-fibrotic NK cell functions in hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2015 Dec;63(6):1334-44.

\*gleichberechtigte Erstautorenschaft

### Publikationen als Koautor:

Christian Körner, Katarina Riesner, Benjamin Krämer, Marianne Eisenhardt, Andreas Glässner, Franziska Wolter, Thomas Berg, Tobias Müller, Tilman Sauerbruch, Jacob Nattermann, Ulrich Spengler and Hans Dieter Nischalke;

TRAIL receptor I (DR4) polymorphisms C626G and A683C are associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma (HCC) in HCV-infected patients. *BMC Cancer.* 2012 Mar 8;12:85.

Andreas Glässner, Marianne Eisenhardt, Pavlos Kokordelis, Benjamin Krämer, Franziska Wolter, Hans Dieter Nischalke, Christoph Boesecke, Tilman Sauerbruch, Jürgen K. Rockstroh, Ulrich Spengler and Jacob Nattermann;

Impaired CD4+ T cell stimulation of NK cell anti-fibrotic activity may contribute to accelerated liver fibrosis progression in HIV/HCV patients. *J Hepatol.* 2013 Sep;59(3):427-33.

Hans Dieter Nischalke, Cordula Berger, Philipp Lutz, Bettina Langhans, Franziska Wolter, Marianne Eisenhardt, Benjamin Krämer, Pavlos Kokordelis, Andreas Glässner, Tobias Müller, Jonas Rosendahl, Janett Fischer, Thomas Berg, Frank Grünhage, Ludger Leifeld, Michael Soyka, Jacob Nattermann, Tilman Sauerbruch, Felix Stickel, Ulrich Spengler;

Influence of the CXCL1 rs4074 A Allele on Alcohol Induced Cirrhosis and HCC in Patients of European Descent. *PLoS One.* 2013 Nov 18;8(11):e80848.

Pavlos Kokordelis, Benjamin Krämer, Christian Körner, Christoph Boesecke, Esther Voigt, Patrick Ingiliz, Andreas Glässner, Marianne Eisenhardt, Franziska Wolter, Dominik Kaczmarek, Hans Dieter Nischalke, Jürgen K. Rockstroh, Ulrich Spengler, Jacob Nattermann;



---

An effective interferon-gamma-mediated inhibition of hepatitis C virus replication by natural killer cells is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C in human immunodeficiency virus-positive patients. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):814-27.

Marianne Eisenhardt, Andreas Glässner, Franziska Wolter, Benjamin Krämer, Pavlos Kokordelis, Hans Dieter Nischalke, Christoph Boesecke, Jürgen K. Rockstroh, Ulrich Spengler, Jacob Nattermann;

CD27(+)CD56Bright natural killer cells may be involved in spontaneous clearance of acute hepatitis C in HIV-positive patients. *AIDS*. 2014 Aug 24;28(13):1879-84.

Philipp Lutz, Kenneth Pfarr, Hans Dieter Nischalke, Benjamin Krämer, Felix Goeser, Andreas Glässner, Franziska Wolter, Pavlos Kokordelis, Jacob Nattermann, Tilman Sauerbruch, Achim Hoerauf, Christian P. Strassburg, Ulrich Spengler;

The ratio of calprotectin to total protein as a diagnostic and prognostic marker for spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis and ascites. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Nov 1;53(12):2031-9.

Pavlos Kokordelis, Benjamin Krämer, Christoph Boesecke, Esther Voigt, Patrick Ingiliz, Andreas Glässner, Franziska Wolter, Christian P. Strassburg, Ulrich Spengler, Jürgen K. Rockstroh, Jacob Nattermann;

CD3(+)CD56(+) Natural Killer-Like T Cells Display Anti-HCV Activity but Are Functionally Impaired in HIV(+) Patients With Acute Hepatitis C. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015 Dec 1;70(4):338-46.

Felix Goeser, Andreas Glässner, Pavlos Kokordelis, Franziska Wolter, Philipp Lutz, Dominik Kaczmarek, Carolynne Schwarze-Zander, Christoph Boesecke, Christian P. Strassburg, Jürgen K. Rockstroh, Ulrich Spengler, Benjamin Krämer, Jacob Nattermann;

HIV mono-infection is associated with an impaired anti-hepatitis C virus activity of natural killer cells. *AIDS*. 2016 Jan 28;30(3):355-63.

## Kongressbeiträge

- Vortrag bei der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungserkrankungen) 2014 in Leipzig

Titel: Einfluss von Hypoxie auf die antivirale und antifibrotische NK-Zell-Aktivität bei HCV-Patienten

- Poster bei der EASL (European Association for the Study of the Liver) 2014 in London

Titel: Liver normoxic conditions have little effect on antiviral and antifibrotic properties of natural killer cells

- Poster bei der AASLD (American Association for the Study of the Liver) 2014 in Boston

Titel: Anti-viral but not anti-fibrotic activity of natural killer cells from HCV patients is significantly reduced by liver normoxic conditions

- Poster bei der ISVHLD (International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease) 2015 in Berlin

Titel: Influence on liver normoxia on intra- and extrahepatic NK cell function in HCV infection

- Poster beim NK Cell Symposium 2015 in Göttingen

Titel: Hypoxia impairs anti-viral activity of natural killer (NK) cells in hepatitis C virus infection

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

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

Bonn den 21.03.2016

Franziska Wolter